

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades

**Analyse des Promotors und der Funktion des MADS-Box
Transkriptionsfaktors *ZmMADS2* aus *Zea mays* L.**

Des Fachbereichs Biologie
Der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Daniela Schreiber
Aus Hamburg

Hamburg
März 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. LÖRZ

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. WIENAND

Tag der Disputation: 04. April 2003

Hamburg, den 20. März 2003



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

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1 - 11
1.1. Entwicklung und Struktur von Maisblüten	1
1.2. Antheren- und Pollenreifung	3
1.3. Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum	6
1.4. Die Superfamilie der pflanzlichen MADS-Box Gene	7
1.5. Ziel der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12 - 29
2.1. Pflanzenmaterial	12
2.2. Chemikalien und Enzyme	12
2.3. Bakterienstämme und Vektoren	13
2.4. Standard PCR Methoden	13
2.4.1. Standard-PCR	13
2.4.2. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	14
2.4.3. Genome Walking	17
2.4.4. RT-PCR	17
2.4.5. Primer Extension	17
2.5. Klonierung und Analyse von DNA-Fragmenten	18
2.5.1. DNA Klonierung	18
2.5.2. Plasmidisolierung	18
2.5.3. DNA-Isolierung aus Maisgeweben	18
2.5.4. Elektrophorese	19
2.5.5. Southern Blot Analysen	19
2.5.6. Herstellung der Sonden	19
2.6. RNA-Isolierung und Analyse	20
2.6.1. RNA-Isolierung aus Maisgeweben	20
2.6.2. Northern Blot Analysen	20

2.7. DNA-Sequenzierung und –Analyse	21
2.8. Biolistische Transformation	21
2.8.1. Übersicht der zur transienten Transformation verwendeten Konstrukte	21
2.8.2. Herstellung der Konstrukte zur transienten Transformation	21
2.8.3. Transiente Expressionsanalysen in Pollen von Mais und Tabak	22
2.8.4. Optimierung der <i>in vitro</i> Pollenkeimung	24
2.8.5. Untersuchungen von Pollen mit dem Raster Elektronenmikroskop (REM)	25
2.8.6. Übersicht der zur stabilen Transformation verwendeten Konstrukte	26
2.8.7. Herstellung der Konstrukte zur stabilen Transformation	26
2.8.8. Biolistische Transformation von Maisembryonen und Analyse transgener Pflanzen	27
2.8.9. Fluoreszenzmikroskopie	28
2.9. Hefe Two-Hybrid-System	28
2.9.1. Hefeanzucht und Plasmidisolierung	28
2.9.2. Nachweis von Protein-Protein Interaktionen	28
3. Ergebnisse	30 - 58
3.1. <i>ZmMADS2</i> ist ein Mitglied der AGL17-Unterfamilie der MADS-Box Gene	30
3.2. <i>ZmMADS2</i> ist spezifisch während der Antheren- und Pollenreifung exprimiert	30
3.3. Genomische Struktur des <i>ZmMADS2</i> -Gens	32
3.3.1. Intronsequenzen	32
3.3.2. Promotorsequenz und Transkriptionsstart	34
3.3.3. Putative <i>cis</i> -Elemente	35
3.4. Untersuchungen zur Pollenkeimung und Optimierung eines Keimungs- mediums für Maispollen	37
3.5. Transiente Expressionsanalysen des <i>ZmMADS2</i> -Promotors in Pollen	42
3.5.1. Expressionsanalysen mit dem <i>Luciferase</i> Reportergen	42
3.5.2. Transiente Expression von β - <i>Glucoronidase</i> in Pollen von Mais und Tabak	45
3.6. Funktionsanalyse von <i>ZmMADS2</i> durch die Herstellung von Antisense-Pflanzen	47
3.7. <i>ZmMADS2</i> ist in Kernen der Anthere lokalisiert	51
3.8. Nachweis der Protein-Protein Interaktion in Hefe	56
3.9. Untersuchungen zur biotechnologischen Verwendbarkeit des <i>ZmMADS2</i> -Promotors	58

4. Diskussion	59 - 74
4.1. <i>ZmMADS2</i> enthält sieben Introns und zahlreiche metabolisch induzierte <i>cis</i> -Elemente im Promotor-Bereich	59
4.2. <i>ZmMADS2</i> gehört zur AGL17 Subfamilie der MADS-Box Gene und reguliert die Pollen- und Antherenreifung	63
4.3. <i>ZmMADS2</i> ist ein Marker für Apoptose während der Antherenreifung	68
4.4. Die Verwendung von PGM ermöglicht transiente Promotor-Analysen in Pollen von Mais und anderen Arten	71
4.5. Schlußfolgerung und Ausblick	72
5. Zusammenfassung	75 - 77
6. Literaturverzeichnis	78 - 88
Danksagung	89

2. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin	GAPDH	Glycerin-Aldehyd 3- Phosphat-Dehydrogenase
AS	Aminosäure	H	Histidin
bp	Basenpaare	h	Stunde
C	Cystein	I	Isoleucin
cDNA	complementäre DNA	i.d.R.	in der Regel
cpm	counts per minute	IMS	Intermikrosporangial Streifen
D	Aspartat	K	Lysin
DAPI	4',6-Diamidino-2- Phenylindol	kb	Kilobasen
dATP	desoxy-Adenosin- Triphosphat	kbp	Kilobasenpaare
dCTP	desoxy-Cytosin-Triphosphat	L	Leucin
DEPC	Diethylpyrocarbonat	M	Methionin
DAPI	4',6-Diamidine-2'- phenylindole dihydrochloride	min	Minute
dGTP	desoxy-Guanosin- Triphosphat	N	Asparagin
DMSO	Dimethylsulfoxyd	ORF	Open Reading Frame
DNA	Desoxyribonukleinsäure	P	Prolin
dNTP	desoxy Nucleotide Triphosphat	PBS	Phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol	PCR	Polymerase Ketten Reaktion
dTTP	desoxy-Thymidin- Triphosphat	PEG	Poly Ethylen Glycol
E	Glutamat	Pers. Mittlg.	Persönliche Mitteilung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PGM	Pollen Keimungsmedium
F	Phenylalanin	Q	Glutamin
FAM	5-Carboxyfluoreszein	R	Arginin
for	forward	rev	reversed
G	Glycin	rlu	relative light units
		RNA	Ribonukleinsäure
		RT	Reverse Transkription
		S	Serin
		sek	Sekunde
		s.o.	siehe oben

sog.	sogenannt
s.u.	siehe unten
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
T	Threonin
SSC	Natriumchlorid- Natriumcitrat
TE	Tris-EDTA
U	Units (Einheiten)
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich
V	Valin
W	Tryptophan
X	irgendeine Aminosäure
Y	Tyrosin
Z	Glutamat

1. Einleitung

1.1. Entwicklung und Struktur von Maisblüten

Blüten entwickeln sich durch die Umwandlung des apikalen Sproßmeristems zum Blütenmeristem, welches die Blütenorgane ausbildet. Bei *Zea mays* L. erfolgt diese Umwandlung schrittweise. Das vegetative Meristem wandelt sich zunächst zum Infloreszenz-Meristem, welches mehrere Seitenmeristeme ausbildet. Diese verzweigen sich in zwei Ährenmeristeme, die wiederum vier Blütenmeristeme ausbilden. Im Gegensatz zu *Arabidopsis* sind beim Mais nur wenige Mutationen charakterisiert, die die Umwandlung der Meristemidentität beeinflussen (McSteen et al., 2000). Bei den Mais-Mutanten *delayed flowering1* (*dlf1*) und *leafy1* (*lfy1*) werden zusätzliche Blätter gebildet (Neuffer et al., 1997). Die *indeterminate1* (*id1*)-Mutante bildet gar keine Blüten, oder vereinzelte blütenähnliche Strukturen mit vegetativer Charakteristik (Colasanti et al., 1998). Bei Mais entwickeln sich die männlichen Blütenstände an der Spitze der Pflanze aus dem Sproßspitzen-Meristem und die weiblichen Blütenstände aus Achsenmeristemen. Die männlichen Blütenstände bestehen aus einer zentralen Ähre, an deren Basis mehrere Seitenähren abzweigen. An jeder Ähre bilden sich Ährchen-Paare (Spikelets), die wiederum aus jeweils zwei Blütchen bestehen, die von zwei Hüllspelzen umgeben sind. In den weiblichen Blütenständen differenzieren sich aus den beiden Infloreszenz-Meristemen zwei Blüten, von denen die untere degeneriert und nur die obere Blüte zur Reife gelangt. Bei Mais arretiert in weiblichen Blüten die Bildung von Staubblättern und in männlichen Blüten die Bildung der Fruchtblätter und der Samenanlage. Bei der Mutante *ramosa1* ist die Meristemidentität bei der Umwandlung vom Seitenmeristem zum Ährenmeristem gestört, so daß statt Ährchen weitere lange Verzweigungen ausgebildet werden (Neuffer et al., 1997). Bei *Tasselseed4* werden zunächst mehrere Verzweigungen gebildet, bevor Ährchen entwickelt werden (Irish, 1997). Einige dieser Mutanten kodieren für sog. MADS-Box Transkriptionsfaktoren (siehe auch Kapitel 1.4.).

Der Übergang vom Ähren- zum Blütenmeristem ist auch in der Mutante *branched silkless1-2* (*bd1-2*) gestört. In *bd1-2*-Mutanten sind die MADS-Box Gene *ZAG1*, *ZAG2* und *ZMM2* spezifisch in Ährchen der weiblichen Blütenstände nicht exprimiert (Colombo et al., 1998). Während die Entwicklung der männlichen Blütenstände normal verläuft, sind in den weiblichen Blütenständen zum Zeitpunkt der Anthese noch viele Ährenmeristeme und Spelzblatt-ähnliche Strukturen vorhanden. An der Basis des Kolbens bilden sich

Verzweigungen. Für drei weitere MADS-Box Gene aus Mais (*ZMM6*, *ZMM8* und *ZMM14*) wird eine Funktion bei der Bestimmung der Anzahl von Ährchen, bzw. der Anzahl der Blüten pro Ährchen, diskutiert (Cacharrón et al., 1999).

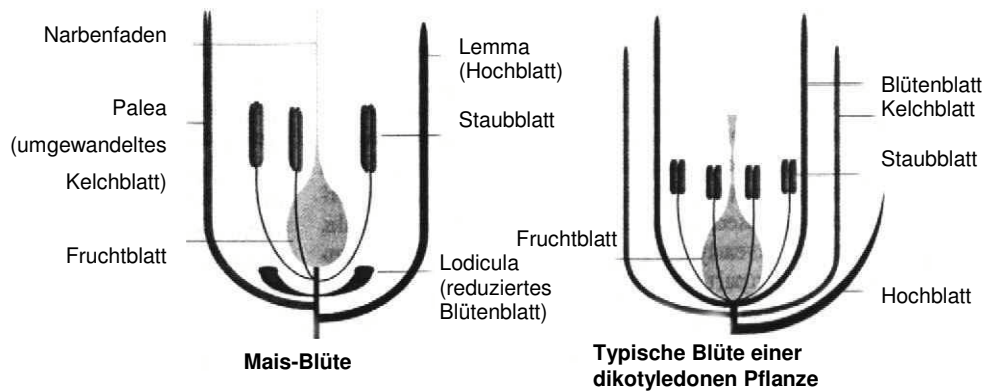


Abb. 1.1: Mais-Blüte im Vergleich zur typischen Blüte einer dikotyledonen Pflanze

Die schematische Darstellung einer Maisblüte und der typischen Blüte einer dikotyledonen Pflanze verdeutlicht morphologische Gemeinsamkeiten. Die Mais-Blüte ist aus Lemma, Palea, Lodicula (Schwellkörperchen) und drei Staubblättern, bzw. einem Fruchtblatt zusammengesetzt. Während der Blütenentwicklung wird die Bildung der Staubblätter im weiblichen Blütenstand und die Bildung des Fruchtblatts im männlichen Blütenstand arretiert. Die typische Blüte einer dikotyledonen Pflanze besteht aus Kelchblättern, Blütenblättern, Staubgefäßen und einem Fruchtblatt. Es wird angenommen, daß die Palea dem Kelchblatt entspricht und die Lodicula reduzierten Blütenblättern entsprechen. Verändert nach McSteen et al., 2000.

Abb. 1.1 zeigt den schematischen Aufbau einer Maisblüte im Vergleich zum typischen Aufbau der Blüte einer dicotyledonen Pflanze. Aufgrund von Ähnlichkeiten in Morphologie und Funktion wird vermutet, daß das Blatt-ähnliche Organ "Palea" beim Mais den Kelchblättern und die Lodicula (Schwellkörperchen) reduzierten Blütenblättern entsprechen. Staubblätter bestehen aus der Anthere und dem Filament, welches erstere mit Nährstoffen versorgt. In männlichen Blüten von *silky1* (*si1*) Mutanten sind die Staubblätter durch feminisierte Strukturen und die Lodicula durch Palea/Lemma-ähnliche Blättchen ersetzt. In weiblichen Blüten zeigen die Lodicula die selbe Transformation und es werden zusätzliche Fruchtblätter gebildet. *Si1* kodiert für einen MADS-Box Transkriptionsfaktor (Ambrose et al., 2000) und der beobachtete Phänotyp entspricht dem Verlust der B-Funktion von Blütenmeristem-Organisationsgenen bei dikotyledonen Pflanzen (siehe 1.4.). Die Hypothese, daß *si1* beim Mais die B-Klasse Funktion ausübt, wird durch Sequenzhomologien zu dem B-Klasse MADS-Box Gen *AP3* aus *Arabidopsis* gestützt (Ng und Yanofsky, 2001). Bei

Doppelmutanten von *sil* und dem Mais C-Klasse Gen *ZAG1* werden sich wiederholende Wirtel von Palea/Lemma-ähnlichen Organen ausgebildet (Kramer und Irish, 1999). Dies läßt den Schluß zu, daß die B- und C-Klasse Funktionen zwischen Mais und dikotyledonen Pflanzen konserviert sind.

1.2. Antheren- und Pollenreifung

Wie bereits oben beschrieben, entwickeln sich im männlichen Blütenstand Lemma, Palea, Lodicula und reproduktive Organe, bei Mais drei Antheren pro Blüte. Eng mit der Antherenreifung ist bei höheren Pflanzen die Entwicklung des männlichen Gametophyten (Pollen) verknüpft. Aus der Teilung von sporophytischen Zellen im Innern der unreifen Anthere gehen die Tapetum-Initialen und die Pollen-Mutterzellen hervor. Weitere Teilungen der Tapetum-Initialen führen zur Bildung der vier Schichten der Sporangienwand: Epidermis, Endothecium, Zwischenschicht und Tapetum (von außen nach innen, siehe Abb. 1.2). Durch die meiotische Teilung der Pollen-Mutterzellen werden die Tetraden von haploiden Zellen gebildet (Mikrosporengese), die nach dem Verdau der sie einbettenden Kallose als einzelne Mikrosporen in die Antherenkammer entlassen werden (McCormick, 1993). Die Mikrosporen entwickeln sich durch zwei mitotische Teilungen zu reifen Pollen (Mikrogametogenese). Die erste Mikrosporen-Teilung erfolgt inaequal und erzeugt eine große vegetative Zelle und innerhalb ihres Zytoplasmas eine kleine generative Zelle. Bei Mais erfolgt die zweite mitotische Teilung innerhalb der Anthere, wohingegen bei vielen anderen Pflanzen-Arten diese zweite Teilung erst innerhalb des wachsenden Pollenschlauchs geschieht (Bedinger, 1992; McCormick, 1993). Die innerste Zellschicht der Anthere, das Tapetum, spielt eine kritische Rolle sowohl bei der Freisetzung der Mikrosporen, als auch bei der Bildung der äußersten Pollenwand (Exine). Zellen des Tapetums sekretieren Kallase, um die Tetraden aus der sie umgebenden Kallosewand zu entlassen. Es wurde gezeigt, daß hierbei die zeitliche Koordination einen kritischen Punkt in der Mikrosporen-Entwicklung markiert. Vorläufermoleküle zur Synthese der Pollenwand werden ebenfalls vom Tapetum gebildet und die Überreste der Tapetum-Zellen dienen nach deren programmiertem Zelltod als Tryphine oder Pollenkitt (Bedinger, 1992).

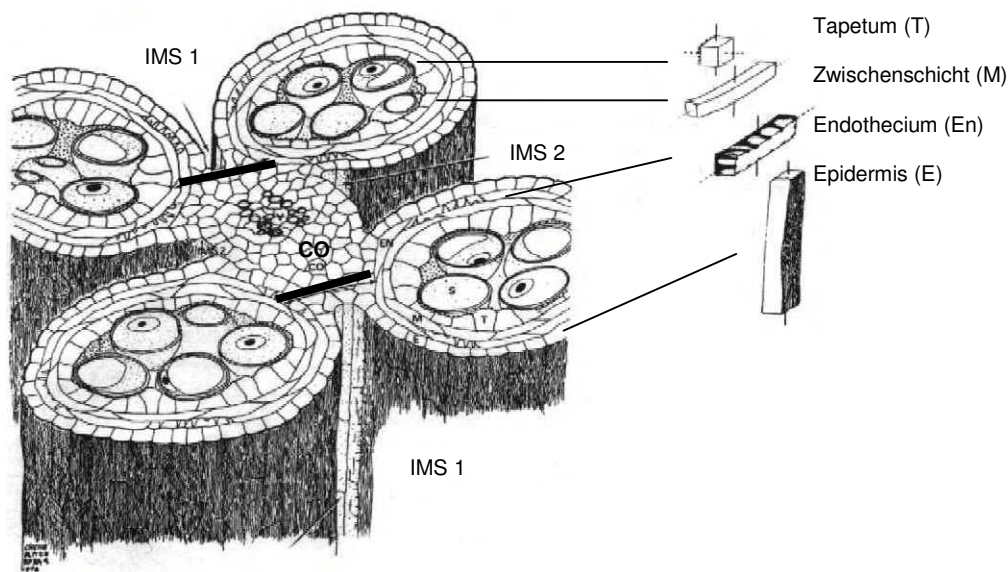


Abb. 1.2: Schematischer Querschnitt einer Anthere von *Zea mays* im Entwicklungsstadium VII

Die beiden Theken sind durch das Konnektiv (CO) miteinander verbunden. In der Mitte versorgen Leitgefäße die Anthere mit Nährstoffen. Diagonale Linien deuten die Stellen an, an denen sich die Intermikrosporangial Streifen (IMS 1) ablösen, um die Antherenkammern zu verbinden. Die IMS 2 bleiben mit dem Konnektiv verbunden. Rechts ist die räumliche Orientierung einzelner Zellen der Antherenwand dargestellt. Zeichnung verändert nach Cheng et al. (1979).

Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein genetisch festgelegter Prozeß, bei dem eine Zelle ihre eigene Zerstörung und die Wiederverwendbarkeit ihrer Komponenten dirigiert. Apoptose stellt bei Pflanzen, ebenso wie im Tiersystem, einen notwendig Schritt zur Gewebedifferenzierung dar. Z. B. setzt die funktionale Form von Xylemelementen den Tod von Zellen des Protoxylems voraus. Außerdem werden auf diese Weise Zellen entfernt, die nicht länger benötigt werden (Jones und Dangl, 1996; Pennel und Lamb, 1997; Lam et al., 2001). Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind Chromatin-Kondensation, DNA-Leiterbildung, die Bildung von Apoptosekörpern, Kernfragmentierung; sowie bei Pflanzen die Ablösung der Plasmamembran von der Zellwand (McCabe et al., 1997). Bei Pathogenbefall kommt es bei Pflanzen zur sogenannten "Hypersensitiven Reaktion" (HR). Am Ort des Eindringens des Schädlings sterben Zellen systematisch ab um eine weitere Infektion zu verhindern (Richberg et al., 1998). Im Zuge der Antherenentwicklung tritt der programmierte Zelltod nacheinander in den Schichten der Antherenwand auf. Das zeitlich mit der Pollenreife koordinierte Absterben von Zellen der Anthere scheint durch eine sequentielle Expression von Regulatorgenen dirigiert zu sein.

Während der Pollenreife werden die Mikrosporen mit Nährstoffen aus dem Tapetum versorgt. Mutationen, bei denen die Entwicklung des Tapetums gestört ist, führen zum

Abbruch der Gametogenese und zu männlicher Sterilität (Warmke und Lee, 1977; Cheng et al., 1979; Chaudhury, 1993; Okada et al., 1999; Wilson et al., 2001; Kapoor et al., 2002). So haben Cheng et al. (1979) den Phänotyp der Mais-Mutante *male sterility 10 (ms10)* eingehend untersucht. Kurz nach Entlassung der Mikrosporen aus der Antherenwand scheinen große, Vakuolen-ähnliche Strukturen die Kerne der Tapetumzellen zu umgeben. In fertilen Antheren beginnt diese Degeneration des Tapetums im Stadium VII der Antherenentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt ist das Tapetum in *ms10*-Antheren bereits vollständig abgebaut und die Degeneration der bis dahin unauffälligen Mikrosporen beginnt ebenfalls. Im Gegensatz zu fertilen Pollen, bilden *ms10* Pollen anschließend nur ansatzweise eine Pollenwand aus.

Während der letzten Phase der Pollenreifung (Stadium VIII der Antheren-Entwicklung nach Cheng et al., 1979) sind Tapetum und Zwischenschicht vollständig degeneriert und die Antherenkammern bestehen nur noch aus der Pollenwand Endothecium und Epidermis. Um ein Aufspringen der Antheren zu gewährleisten, bilden Zellen des Endotheciums Wandverdickungen aus Lignin und Zellulose aus. Durch das Austrocknen der Antherenwand entsteht an diesen Verdickungen eine tangentielle Zugspannung, die letztlich zum Aufspringen der Antheren und der Freilassung reifer Pollen führt (Goldberg et al., 1993). Bei Mais sind weitere männliche Sterilitäts-Mutanten beschrieben, bei denen Antheren- und Pollenreifung gestört sind (z.B. Beadle, 1932; Cheng et al., 1979; Albertsen und Phillips, 1981; Neuffer et al. 1997). Bei allen diesen Mutanten kommt es nicht zur Anthese und die Mikrosporen in den Antheren sind degeneriert. Hierfür verantwortliche Gene sind teilweise auf den Mais-Chromosomen lokalisiert wurden, molekulare Analysen liegen jedoch nicht vor. Für einige *Arabidopsis*-Mutanten wurde gezeigt, daß Defekte in der Hormonregulation, das Fehlen von Zellwandkomponenten oder die Misexpression eines MADS-Box Gens verantwortlich für das Ausbleiben von Reifestadien sind (zur Übersicht siehe Patterson, 2001). Bei der *ms35*-Mutante fehlen die Wandverdickungen im Endothecium und die Antheren springen nicht auf. Durch Bestäubung der Narben von *ms35*-Pflanzen mit Pollen aus mechanisch geöffneten Antheren ließ sich jedoch demonstrieren, daß die Pollenreifung in dieser Mutante nicht gestört ist (Dawson et al., 1999). Die ektopische Expression des MADS-Box Transkriptionsfaktors *AGL15* verhindert die Seneszenz des Perianths und die Abszission (Fernandez et al., 2000), während Antheren- und Pollenreife nicht beeinflusst sind. Bei den Mutanten *DELAYED DEHISCENCE1* und *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1* sind jeweils Enzyme des Jasmonatsäure-Wegs betroffen (Sanders et al., 2000; Ishiguro et al., 2001). Die Antheren springen nicht auf. Der Pollen erscheint funktional, ist jedoch nicht keimfähig.

1.3. Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum

Der Befruchtungsprozeß bei Pflanzen beginnt mit dem Kontakt eines teilweise dehydrierten Pollens mit dem Stigma einer passenden Blüte. Die Aufnahme von Wasser aus dem Stigma führt zur Rehydrierung des Pollenkorns und der Reaktivierung des Metabolismus. Bei einigen Arten unterliegt dieser Vorgang einer strengen Kontrolle, um Selbstbefruchtung zu verhindern (Herrero und Hormaza, 1996). Durch den Influx von Ca^{2+} in den Pollen wird der Stoffwechsel aktiviert. Die Reorganisation des Zytoplasmas führt zur Bildung eines Ca^{2+} -Gradienten mit der höchsten Konzentration am Porus (Franklin-Tong, 1999). An dieser Stelle wächst der Pollenschlauch aus dem Pollen-Korn heraus. Der Pollenschlauch wird aus einer Verlängerung der Intine, der innersten Schicht der Pollenwand, gebildet, die durch Kallose-Ablagerungen verstärkt wird (Johnson und McCormick, 2001). Durch polares Spitzenwachstum wächst der Pollenschlauch durch das Transmissionsgewebe zum Embryosack, wobei das Zytoplasma in der Spitze des wachsenden Pollenschlauchs lokalisiert ist. Bei der Mutante *raring-to-go* (*rtg*) bilden Pollen ohne vorherige Dehydrierung innerhalb der Anthere Kallose-Ablagerungen und Pollenschläuche aus (Johnson und McCormick, 2001). Im reifen Pollenkorn liegen bereits alle zur Keimung notwendigen Proteine vor. Die *de novo* Synthese von Proteinen, die während des Pollenschlauchwachstums benötigt werden, wird innerhalb von wenigen Minuten nach Keimungsbeginn initiiert (Mascarenhas, 1993). *In vitro* Untersuchungen zur Pollenkeimung haben gezeigt, daß die entsprechenden Transkripte schon im reifen Pollen vorhanden sind. Bei *Zea mays* wandern der Kern der vegetativen Zelle und die beiden Spermzellen etwa 2 h nach Beginn der Keimung in den Pollenschlauch ein (Heuer et al., 2000). Der Pollenschlauch wächst entlang des Transmissionsgewebes des Griffels und tritt über die Mikropyle in den Embryosack ein, wobei er eine der zwei Synergiden penetriert. Der Pollenschlauch platzt in der degenerierten Synergide und entläßt die beiden Spermzellen, von denen eine mit der Eizelle und die andere mit der Zentralzelle fusioniert. Aus der für Angiospermen charakteristischen doppelten Befruchtung gehen zum einen der Embryo, und zum andern das Endosperm hervor.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren sind im reifen Pollen-Korn exprimiert. Hierzu gehören zwei *myb*-verwandte Proteine (Yang et al., 2001), Zink-Finger Transkriptionsfaktoren (Kobayashi et al., 1998; Robson et al., 2001) sowie die MADS-Box Gene *DEFH125* (Zachgo et al., 1997), *AGL15* (Fernandez et al., 2000), *AGL18* (Alvarez-Buylla et al., 2000), *ZmMADS1* und *ZmMADS2* (Heuer, 1999 und Heuer et al., 2000).

1.4. Die Superfamilie der pflanzlichen MADS-Box Gene

Wie bereits mehrfach erwähnt, besitzen MADS-Box Gene zahlreiche Funktionen während der Blütenmeristem- und Organdifferenzierung. MADS-Box Gene repräsentieren die größte Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die im männlichen Gametophyten (Pollen) identifiziert wurden. MADS-Box Transkriptionsfaktoren repräsentieren eine Super-Genfamilie, die in allen bisher untersuchten Eukaryonten nachgewiesen wurde. Hierbei werden, anhand der Homologien innerhalb der MADS-Box, Gene vom Typ I und Typ II unterschieden (Alvarez-Buylla et al., 2000 in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*). Im Zusammenhang mit der Evolution der Landpflanzen wurde die Hypothese aufgestellt, daß evolutionäre Veränderungen der Morphologie, wie z. B. die Bildung von Blüten, mit Veränderungen von Entwicklungskontrollgenen einher gehen (Theißen und Saedler, 1995). Ursprung und Vielfalt der heute bekannten Pflanzenformen stehen in engem Zusammenhang mit der Phylogenie der MADS-Box Gene. Die Superfamilie der MADS-Box Gene repräsentiert im Bezug auf ihre Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Evolution der Pflanzen das Äquivalent der homöotischen (*Hox*) Genfamilie der Tiere und Pilze (Theißen et al., 2000). Der Begriff "MADS"-Box beschreibt eine hoch konservierte, DNA-bindende Domäne, die allen MADS-Box Genen gemeinsam ist. Der Name setzt sich aus den Abkürzungen der ersten in Pflanzen nachgewiesenen Vertreter dieser Super-Genfamilie, *AGAMOUS* aus *Arabidopsis thaliana* (Yanofsky et al., 1990) und *DEFICIENS* aus *Antirrhinum majus* (Sommer et al., 1990); sowie dem Hefe-Gen *MCM1* (*mini chromosome maintaining*) und dem menschlichen *SRF* (*serum response factor*) zusammen. Pflanzliche MADS-Box Transkriptionsfaktoren des Typs II sind durch die typische Abfolge ihrer funktionellen Domänen charakterisiert: stromabwärts der MADS-Box folgt die Linker- oder Inter-Region (I), darauf die Keratine-like (K)-Box und der C-Terminus. Einige MADS-Box Proteine unterscheiden sich von dieser Struktur durch das Fehlen der K-Box. Einige besitzen eine N-terminale Verlängerung (Yanofsky et al., 1990; Montag et al., 1995). Eine Besonderheit beim Mais sind die transponierten MADS-Box Elemente (*TMZI*-Elemente oder *ZEM*-Gene), die Eigenschaften von Transposons zeigen (Montag et al., 1995). Anhand des Vorhandenseins oder Fehlens der N-terminalen Struktur werden pflanzliche MADS-Box Gene vom Typ II in NMIKC- und in MIKC-Typ unterschieden (Theißen et al., 2000).

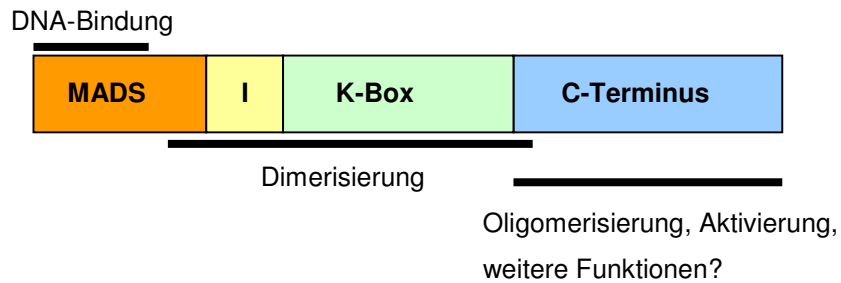


Abb. 1.3: Struktur eines typischen pflanzlichen MADS-Box Proteins vom MIKC-Typ (Typ II-Gruppe)

Die Anordnung der funktionellen Domänen ist innerhalb der Familie der MADS-Box Transkriptionsfaktoren vom MIKC-Typ bei Pflanzen konserviert. Die MADS-Box vermittelt die Bindung an DNA und ist teilweise, zusammen mit Inter-Region und K-Box, an der Dimerisierung beteiligt. Der C-Terminus ist spezifisch für Subfamilien und in Länge und Sequenz variabel. Diese Region vermittelt zum Teil die Bildung von Oligomer-Komplexen höherer Ordnung oder enthält eine Aktivierungsdomäne. Bei vielen MADS-Box Genen ist die Funktion des C-Terminus bisher nicht charakterisiert.

Die 56 Aminosäuren (AS) umfassende MADS-Box stellt den am höchsten konservierten und gemeinsamen Bereich aller MADS-Box Gene vom Typ I und Typ II dar. Die Länge der Inter-Region ist variabel (27-42 AS) und vermittelt gemeinsam mit der K-Box die Dimerisierung dieser Transkriptionsfaktoren. Der C-Terminus repräsentiert den am wenigsten konservierten Bereich der MADS-Box Proteine und sowohl Größe als auch Sequenz sind variabel. Homologien in diesem Bereich charakterisieren die Mitglieder der Unterfamilien. Die Funktion des C-Terminus besteht u. a. darin, die Bildung von Komplexen aus zwei Dimeren zu vermitteln (Honma und Goto, 2001).

MADS-Box Proteine binden als Dimere an sog. CArG-Boxen mit der Konsensus-Sequenz CC-(A/T)₆-GG. Die Affinität, mit der die Dimere an unterschiedliche CArG-Boxen binden, ist hierbei von der genauen Sequenz abhängig (Huang et al., 1996; West et al., 1998). Für das *AP3/PI* Heterodimer wurde jedoch kürzlich gezeigt, daß es an Promotorsequenzen binden kann, die keine CArG-Box enthalten (Zik und Irish, 2003). Sowohl im Hefe Two-Hybrid-System als auch in lebenden Pflanzenzellen wurde gezeigt, daß die Dimerisierung von MADS-Box Proteinen im Zytoplasma stattfindet und das Vorhandensein von Kernlokalisierungssequenzen innerhalb der MADS-Box beider Partner zum Kernimport erforderlich ist (McGonigle et al., 1996; Immink et al., 2002).

Anhand von Homologien der Proteine innerhalb der MADS-Box werden in Angiospermen zur Zeit folgende Unterfamilien unterschieden: *AGL6*, *AGL12*, *AGL15*, *DEFICIENS (DEF)*, *GLOBOSA (GLO)*, *SQUAMOSA (SQUA)* und *TM8*. Die *AGAMOUS (AG)*, *AGL2* und *TM3*-Unterfamilien wurden in Angiospermen und Gymnospermen und *AGL17* in Angiospermen

und Farnen identifiziert. *DEF/GLO*, *CGM5*, *CGM6*, *CGM13*, *GGM4*, *GGM7* und *GGM10* definieren Hauptvertreter der Unterfamilien der MADS-Box Gene in Gymnospermen, sowie *CRM1*, *CRM3*, *CRM6*, *CRM7* und *OPM4* Hauptvertreter der Unterfamilien bei Farnen (Theißen et al., 2000).

MADS-Box Transkriptionsfaktoren innerhalb einer Unterfamilie weisen eine höhere Sequenzhomologie zueinander auf, als zu anderen MADS-Box Genen der selben Art. Experimente mit dem Hefe Two-Hybrid-System haben gezeigt, daß Bindungspartner eines Proteins gegen die entsprechenden Homologe einer anderen Pflanze ausgetauscht werden können (z. B. Favaro et al., 2002; Immink und Angenent, 2002). Die Entwicklung von Infloreszenzen und Blüten höherer Pflanzen wird durch ein Netzwerk von regulatorischen Genen gesteuert. Sogenannte "Frühe und späte Blütengene" vermitteln die Reaktion auf externe Faktoren (wie z. B. die Tageslänge) und interne Faktoren (wie z. B. Gibberellin), in dem sie die Expression von Meristem-Identitätsgenen regulieren. Diese steuern die Umwandlung des apikalen Sproß-Meristems in ein Infloreszenz-Meristem und dessen Veränderung zum Blütenmeristem. In *Arabidopsis* wird der Übergang vom Sproß- zum Blütenmeristem negativ durch das MADS-Box Gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Michaels und Amasino, 1999; Tadege et al., 2001) und positiv durch den Zink-Finger Transkriptionsfaktor *CONSTANS (CO)* (Putterill et al., 1995) reguliert. Funktional wurde gezeigt, daß MADS-Box Gene die Entwicklung von Blüten, sowie vegetativen Pflanzenorganen steuern. Mitglieder der *SQUA*-Unterfamilie definieren die Identität der Blütenmeristeme. Ein Beispiel aus Mais ist *ZAP1* (Mena et al., 1995). Innerhalb des Blütenmeristems spezifizieren Organ-Identitätsgene die Unterteilung in vier Wirtel. Organ-Identitätsgene werden in die Klassen A, B und C unterteilt, wobei Gene der A-Klasse in den Wirteln 1 und 2, diejenigen der B-Klasse in Wirtel 2 und 3 und die der C-Klasse in den Wirteln 3 und 4 exprimiert sind. Die A-Gene definieren die Bildung von Kelchblättern (Palea beim Mais), A- und B-Gene die Bildung der Blütenblätter (beim Mais Lodicula), B- und C-Gene definieren die Bildung der Staubblätter und C-Gene die Bildung des Fruchtblatts (Coen und Meyerowitz, 1991). *APETALA1* aus *Arabidopsis* ist bisher das einzige MADS-Box Gen, für das eine A-Funktion über Mutationsanalyse nachgewiesen werden konnte (Mandel et al., 1992). In *Arabidopsis* erfüllen *APETALA3* (Jack et al., 1994) und *PISTILLATA* (Goto und Meyerowitz, 1994) aus den Unterfamilien *DEF* und *GLO* die B-Funktion. In Mais wird eine B-Funktion für *Silky1* vermutet (Ng und Yanofsky, 2001). Die C-Funktion wird in *Arabidopsis* von *AGAMOUS* (Yanofsky et al., 1990) ausgeübt, in Mais üben die eng verwandten *AG*-Homologe *ZAG1* und *ZMM2* diese Funktion aus (Mena et al., 1996). Anhand

von Studien bei Petunie wurde das ABC-Modell um eine D-Funktion erweitert. Die Gene *FBP7* und *FBP11* regulieren die Entwicklung der Samenanlagen (Angenent und Colombo, 1996). Eine weitere Klasse von Organ-Identitätsgenen bilden die *SEPALLATA* MADS-Box Transkriptionsfaktoren *SEPI*, 2 und 3 aus *Arabidopsis*. Triple-Mutanten dieser Gene bilden Blüten aus sich wiederholenden Kelchblättern aus, in denen die B- und C-Funktion ausgeschaltet, die Expression der B- und C-Gene jedoch unverändert ist (Pelaz et al., 2000). Diese Daten deuten darauf hin, daß die *SEP*-Proteine die B- und C-Funktion auf post-transkriptioneller Ebene, eventuell auf Basis der Komplexbildung, regulieren (Pelaz et al., 2000; Honma und Goto, 2001).

MADS-Box Gene steuern nicht nur die Entwicklung von Blüten, sondern auch diejenige von vegetativen Organen und Früchten. Diese sind bei *Arabidopsis* von zwei Fruchtkammern umgeben, die durch das Replum voneinander getrennt sind. An der Grenze zwischen diesen Strukturen differenziert ein schmales Band von Zellen zur Dehiszenz-Zone. Durch die Separation benachbarter Zellen in dieser Zone springen die Fruchtkammern auf und entlassen die Früchte. Die *SHATTERPROOF* MADS-Box Gene *SHP1* und *SHP2* bestimmen die Identität der Zellen, die für das Aufspringen der Fruchtkapsel bei *Arabidopsis* verantwortlich sind (Liljegren et al., 2000) Die Expression von *SHP1* und *SHP2* wird wiederum durch das MADS-Box Protein *FRUITFUL* reprimiert (Ferrandiz et al., 2000), welches auch die Entwicklung der Fruchtkapsel und der Blätter reguliert (Gu et al., 1998). In der Tomate wird die Identität der Zellen innerhalb der Abszissionszonen, die das Abwerfen der Früchte ermöglichen, durch das MADS-Box Gen *JOINTLESS* bestimmt (Mao et al., 2000). Die Mitglieder der *AGL17* Unterfamilie sind zum Teil in Wurzeln exprimiert (Zhang und Forde, 2000; Burgeff et al., 2002) oder in Wurzelknoten, die sich bei einer Infektion durch *Rhizobium* bei Leguminosen bilden (Heard et al., 1997). *PkMADS1* induziert die Bildung von Adventiv-Trieben bei *Paulownia kawakamii* (Prakash und Kumar, 2002). Das Transkript des *Arabidopsis* MADS-Box Gens *AGL16* akkumuliert in Schließzellen und Trichomen der Blätter (Alvarez-Buylla et al., 2000). *DEFH125* (Zachgo et al. 1997), *ZmMADS1* und *ZmMADS2* (Heuer et al., 2000) sind spezifisch in reifen Pollen von *Antirrhinum*, bzw. Mais exprimiert. In dieser Arbeit wurde die Funktion von *ZmMADS2* näher charakterisiert.

1.5. Ziel der Arbeit

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte zuerst die genomische Struktur des MADS-Box Gens *ZmMADS2* aus Mais aufgeklärt, sowie regulatorische Bereiche stromaufwärts des Transkriptionsstarts eingegrenzt werden. Die Funktion von *ZmMADS2* sollte durch die Herstellung von transgenen "knock-out" Pflanzen in einem Antisense-Ansatz analysiert werden und die Lokalisierung des Proteins sollte durch die stabile Transformation von Maispflanzen mit einem *ZmMADS*-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors erfolgen. Interessant war in hierbei vor allem die Frage nach der Lokalisation von *ZmMADS2* innerhalb der Anthere, des reifen Pollenkorns, sowie im wachsenden Pollenschlauch. In einem weiteren Ansatz sollte die biotechnologische Verwendbarkeit des *ZmMADS2*-Promotors untersucht werden. Da frühere Arbeiten eine spezifische, hohe Expression von *ZmMADS2* im reifen Pollen und im wachsenden Pollenschlauch ergaben (Heuer, 1999), sollten regulatorische Bereiche innerhalb des *ZmMADS2*-Promotors durch transiente Transformations-Experimente mit verschiedenen *ZmMADS2*-Promotor Deletionen analysiert werden. Zur Durchführung der transienten Transformation sollte zuerst ein Standard-Protokoll entwickelt werden. Abschließend sollte eine Anwendbarkeit des *ZmMADS2*-Promotors zur Herstellung männlich steriler Maispflanzen durch die Herstellung transgener Pflanzen untersucht werden, die das *Barnase*-Gen unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors exprimieren.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial stammt von der *Zea mays* L. Inzuchtlinie A188 (Green und Philips, 1975). Zur Transformation von Maisembryonen wurden Hybride der Linien A188 und H99 verwendet. Versuche zur Pollenkeimung wurden mit Pollen der Mais Inzuchtlinien A188, H99, AC3572C, B73, Hi-II, Q2 und Tx232, der *Nicotiana tabacum* Linie SR1, sowie Pollen verschiedener Linien von *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Columnea oesterdiana*, *Nicotiana tabacum*, *Pennisetum americanum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Tradescantia* sp. und *Vicia faba* durchgeführt. *Zea mays* und *Pennisetum americanum* wurden im Gewächshaus bei 16 h Licht (26°C) und 8 h Dunkelheit (16°C) kultiviert. *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Columnea oesterdiana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* und *Tradescantia* sp. wuchsen im Gewächshaus bei 12 h Licht (18°C) und 12 h Dunkelheit (15°C). Die Lichtstärke betrug 24.000-25.000 Lux bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 bis 95%. Pollen von *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* und *Vicia faba* wurden im Botanischen Garten in Hamburg gesammelt

2.2. Chemikalien und Enzyme

Alle Experimente wurden, soweit erforderlich, mit autoklavierten Materialien unter semi-sterilen, bzw. sterilen Bedingungen durchgeführt. Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Medien für die Gewebekultur, Pollenkeimung und Hefekultur wurden steril filtriert. Es wurden ausschließlich Chemikalien mit hohem Reinheitsgrad (zur Analyse) verwendet. Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Appligene (Heidelberg), Biometra (Göttingen), BIOzym (Oldendorf), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Clontech (Palo Alto), Fluka (Neu-Ulm), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen (De Schelp), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Merck-Schuchard (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalmbach/Taunus), Peqlab (Erlangen), Pharmacia (Freiburg), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth

(Karlsruhe), Seakem (USA), Serva (Heidelberg), Sigma (München) und Stratagene (Heidelberg).

2.3. Bakterienstämme und Vektoren

Folgende Bakterienstämme und Vektoren wurden für allgemeine Klonierungen verwendet. Spezialvektoren sind gesondert aufgeführt.

E. coli-Stämme

XL1-Blue-MRF' (Bullock *et al.*, 1987)

XL10 Gold Kan (Stratagene)

TOP10 F' (Invitrogen)

Vektoren

PCR-Blunt-II TOPO (Invitrogen)

TOPO TA (Invitrogen)

pBluescript (Stratagene)

pUC 18/19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

pLitmus (NEB)

2.4. Standard PCR Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendete molekulare Analysemethoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Sambrook *et al.*, (1989) durchgeführt. Bei Verwendung von Kits wurde den Herstellerangaben gefolgt.

2.4.1. Standard-PCR

Die standardmäßige Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde, soweit nicht anders beschrieben, in 50 µl Ansätzen nach folgendem Schema durchgeführt: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, je 200 µM 5'- und 3'-Primer, 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1

U *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase. Im Verlauf der Arbeit wurden DNA-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller jeweils mit den zugehörigen Puffern verwendet. Ansätze mit DNA-Polymerasen ohne Antikörper wurden erst in den Thermocycler gestellt, wenn dieser eine Temperatur von über 80°C erreicht hatte. Als Template wurden je nach Anwendung etwa 10 pg bis 100 ng DNA eingesetzt. Reaktionsparameter wurden wie folgt eingestellt: 1 min. 96°C (Aufschmelzen der Doppelstränge), 30 Zyklen mit 20 sek. 94°C, 30 sek. spezifische Annealingtemperatur der verwendeten Primer, 1 min. (*Taq*-), bzw. 2 min. (*Pfu* DNA-Polymerasen) pro 1 kb Amplikon bei 72°C, zusätzlich 3 min. –7 min. 72°C zur Vervollständigung der Amplifikate. Der Reaktionsstop erfolgte bei 4°C. Die Reaktionen wurden im Trio-Block-Thermal-Cycler (Biometra) durchgeführt.

2.4.2. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in 5'-3'- Orientierung angegeben.

Vektorprimer

BT	GGAAACAGCTATGACCATG	(19 mer)
MB	GTAAAACGACGGCCAGT	(17 mer)
Ubi-D	CACACACACAACCAGATCTC	(20 mer)
UbiC	GTAGATAATGCCAGCCTGTTA	(21 mer)
UbiR1	GAGCATCGACAAAAGAAACAG	(21 mer)

Klonierung der Intron Sequenzen

AEx3	GCAAAGGGAGGCAGCAAGC	(19 mer)
Ex3-nebo1	AAGTTGTGCAGTTGTTGTCTCA	(22 mer)
Ex3-nebo2	AGGGACTGCAGTTCTTTGACA	(21 mer)
Ex3-nebo3	ACACCACGCAGGCTTGTTTC	(20 mer)
Ex3-netnu	CTGCAAAGTTGAATGGAGTCG	(21 mer)
Ex3-unten	TCGCCAAGAAAATGATGAGTTAC	(23 mer)
Ex3-oben	TCGGCAGTTGACGGGAGAT	(19 mer)
In-24	AGAGCTGAAATAGAACATGACCTACC	(26 mer)
In-25	GTCTCCCCTTGTCGGTCCACATTC	(24 mer)
In-26	GTCCAATTTTGCAACGTGGAGGC	(23 mer)

In-27	ACAGCGGGTACTGTTGTGTTAGG	(23 mer)
In-28	GAAGATGGCCAAGGTCGATCAAAC	(24 mer)
In-29	CATAGGGCACCTATAGGCATTGC	(24 mer)
In-33	CCTGCATTTGGATGTTGCATGC	(22 mer)
In-34	GTGCTTCTGTCTCTGAACACTC	(22 mer)
Intron12	ACTGACATTTGTGCTGTGTGCAGC	(24 mer)
Intron 21	GTCACATCAACAAGCGTCCTACC	(23 mer)
In 22	TCCAGCTGCTTGATCTTTTCTA	(22 mer)
Intron 32	TGTTCAAATGCAAATGCAAATGCACC	(26 mer)
Tnorf1	CGGCCTATAGCTAGCTCTCTTCTTGACCCT	(27 mer)
Tnorf2	GCTAAGGAGCGAGAGGTTGTGGTTGTGG	(28 mer)
Pec2	CTCCCTTGGGAAACCTGCTGCCTTTGAG	(28 mer)

Primer zur Bestimmung des Transkriptionsstarts

Extension Fam-CAAAGAAGGTAAGGAGGAGGAGAT (24 mer)

Fam ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der im Sequenzierer detektiert werden kann

Primer zur Herstellung von Konstrukten zur transienten Transformation

3'Xho for	TTCCTCGAGAAGAGTAAACTGCC	(21 mer)
Bait for	CTATAGGCCGGTGATCAATGG	(21 mer)
Bait rev	CTTCTCGAGTGGAAATTAATTGCAATCC	(27 mer)
Luc2	GCCTTATGCAGTTGCTCTCC	(20 mer)
Nco rev	CTTCCCCTCCCCATGGATC	(20 mer)
P control	GAACCATTGGGCCCACTTGC	(20 mer)
Prom1	AAGCTTGTAAGACCTCGACCGGAA	(25 mer)
Prom2	AAGCTTAGCTCAAATACGTAACAAAG	(26 mer)
Prom2!	AGAAGCTACTACGCCCTGCAG	(21 mer)
Prom3	AAGCTTTCATTAGCACGGCCAT	(22 mer)
Prom4	TAGGGGTAATGAGTCTAGACGGC	(23 mer)
Prom5	GGGGAAAGTCTAGACTCGCAAG	(22 mer)

Primer zur Herstellung von Konstrukten zur stabilen Transformation

GfpNco	CCATGGGCAAGGGCGAG	(17 mer)
M2Bcl	TGATCATGGGGAGGGGAAAGATC	(23 mer)
M2fPe	TCTCGGCTAGCTTCCTC	(17 mer)
M2Pf	TCTAGAGAAGCTGTCGTGTTC	(21 mer)
M2Pr1	GCTAAGGAGCGAGAGGTT	(18 mer)
M2Pr2	TCATGAATCTCCGGCCTATAGC	(22 mer)
M2rBsph	TCATGAGTGGAATTAATTGCAATCCTAGC	(29 mer)
M2Xho	CTCGAGTGGAATTAATTGCAATCCTAGC	(28 mer)
McFi	CAGTTATAGATCGGTACGGC	(20 mer)
MiF	GGTCAAGAAGAGAGCTAGC	(19 mer)
MiR	CTCCGAGTTGGGATTTGC	(18 mer)
MP2	GGTTGTATCTTTGCTTTTACCC	(22 mer)
MPRi	GCTGGTGCTAGAGTACTC	(18 mer)
NoEco	GAATTCCCGATCTAGTAAC	(19 mer)

Genspezifische ZmMADS2-Primer

In control	AAAATGCAATCGATAACCCAAACT	(24 mer)
Up control	AGCAAGTAGCAGATAGGGGAAAGT	(24 mer)
Lo control	GCCGGGCCTTTCTTTATGTT	(20 mer)

Primer zur Sondenherstellung

Barn3 for	GTGCAGGTAACCTTGCAGAC	(20 mer)
Barn3 rev	CAAGACCGGCAACAGGATTG	(20 mer)
GFP con for	CTTGA ACTCAGCACACTGCC	(20 mer)
GFP 2 rev	TCTTG TAGTTCCCGTCACC	(19 mer)
MADS3'for	AGAAGAGTAAA ACTGCCGTCT	(21 mer)
MADS3'rev	AGCAACATCTGCACCATTTTG	(21 mer)
Pe for	AGAAACCAGAGATGTTCCAG	(20 mer)
Pe rev	CAACATCTGCACCATTTTG	(19 mer)

RT-PCR

Oligo-DT	TTTTTTTTTTTTTTTTTVV	(18 mer)
----------	---------------------	----------

2.4.3. Genome Walking

Die Genome Walking Technik wurde zur Bestimmung der Sequenz des Promotors und des Intron 2 von *ZmMADS2* eingesetzt. Genomische DNA-Banken von *Zea mays* wurden mit dem Genome Walker KitTM (PT1116-1, Clontech) nach den Herstellerangaben erstellt, zusätzlich wurde eine weitere DNA-Bank mit *HincII*-Fragmenten hergestellt. Den PCR-Ansätzen wurden 5% DMSO zugesetzt. Amplifikationen wurden mit Advantage *Tth*-DNA-Polymerase (Clontech) und dem zugehörigen Puffer im DNA-Thermal-Cycler (Perkin Elmer, USA) mit folgenden Parametern durchgeführt: 5 Zyklen mit 25 sek. bei 94°C und 3 min. bei 70°C, 25 Zyklen mit 25 sek. bei 94°C und 3 min. bei 67°C, 7 min. bei 67°. Der Reaktionsstop erfolgte bei 4°C. 1 µl des Ansatzes wurde als Template in der zweiten Amplifikation eingesetzt: 7 Zyklen mit 25 sek. bei 94°C und 3 min. bei 72°C, 35 Zyklen mit 25 sek. bei 94°C und 3 min. bei 67°C, 7 min. bei 67°C. Der Reaktionsstop erfolgte bei 4°C. Resultierende Fragmente wurden in den Vektor PCR-Blunt-II TOPO (Invitrogen) kloniert (siehe 2.6.1.).

2.4.4. RT-PCR

Zur reversen Transkription wurde 1 µg Gesamt RNA 15 min. bei Raumtemperatur mit 10 U DNase I verdaut und mit einem Oligo DT Primer für 60 min. bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionspuffer war wie folgt zusammengesetzt: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP's, 50 U SuperScriptII Reverse Transcriptase (GibcoBRL), 10 U RNasin (Promega) und 10 mM DTT. Anschließend wurde eine Standard-PCR mit den genspezifischen Primern Ubi-D (*Ubiquitin* 5'UTR) und Ex3-unten (*ZmMADS2* K-Box) durchgeführt (siehe 2.5.2.).

2.4.5. Primer Extension

Die Bestimmung des Transkriptionsstarts von *ZmMADS2* wurde mit einem Primer Extension Kit (Promega) durchgeführt. Der hierzu verwendete Primer 'Extension' wurde mit FAM markiert (siehe 2.5.2.) und die Größe des Produkts der reversen Transkription in einem 8% igen Polyacrylamid-Harnstoff Gel in einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied

Biosystems) bestimmt. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte mit dem Marker "Gene Scan 500 (TAMRA) Size Standard" (Applied Biosystems).

2.5. Klonierung und Analyse von DNA-Fragmenten

2.5.1. DNA Klonierung

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden, je nach verwendetem Enzym, die Vektoren pCR TOPO TA (für *Taq*-) oder pCR-Blunt-II TOPO (für *Pfu*-DNA-Polymerasen) nach den jeweiligen Protokollen des Herstellers (Clontech, Gibco, Stratagene) verwendet. Mitgelieferte *E. coli* Stämme (Top 10 F') wurden auf LB-Medium mit Kanamycin selektiert. In diesem System entfällt ein "blue-white" Screening. Kolonien wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in einen vorbereiteten Standard PCR-Ansatz (25 µl) überführt (siehe 2.4.1.). Nach bestätigter Integration des Amplikons wurden die entsprechenden Kolonien in LB-Medium mit Kanamycin kultiviert.

2.5.2. Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mit einem Minipräp-Kit (Qiagen oder Peqlab) nach den Angaben des Herstellers. Plasmide zur biologischen Transformation wurden nach dem Maxipräp-Protokoll (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) aus je 400 ml Bakterienkultur isoliert. Diese Präparationen enthielten ausreichend Material für alle im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Transformationen.

2.5.3. DNA-Isolierung aus Maisgeweben

Genomische DNA wurde nach der Methode von Dellaporta et al. (1983) isoliert und über Nacht bei 37°C mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Jeweils 10 µg der verdauten DNA wurden in einem 0,8 % igen Agarose-Gel mit 3 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) in TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) bei 80 mV elektrophoretisch aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard wurde mit *Eco*471 geschnittene Lambda-DNA (MBI Fermentas) verwendet.

2.5.4. Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden, je nach Fragmentgröße, in 0,8 - 2% igen Agarosegelen mit 3 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) pro 100 ml Gel in 1 x TAE Puffer (Sambrook et al., 1989) bei 80 – 120 mV aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente entweder ausgeschnitten und mit EasyPure (Biozym) aufgereinigt oder das Gel zum Blotting eingesetzt (2.5.5.).

2.5.5. Southern Blot Analysen

Transfer von DNA aus Agarose-Gelen für Southern-Blot Analysen erfolgte über Nacht mit 0,4 M NaOH auf Hybond-N⁺ Membranen (Amersham) nach Sambrook et al. (1989). Die Filter wurden für 3 h bei 64°C mit 100 mg/ml Heringssperma (HS) -DNA in CHURCH-Puffer (0,5 M NaH₂PO₄ (pH 7,2), 7% SDS, 1 mM EDTA) vorhybridisiert. Die HS-DNA wurde vorher für 10 min. bei 95°C denaturiert. Nach der Vorhybridisierung wurde eine radioaktiv markierte Sonde mit einer Sondenkonzentration von 10⁶ cpm/ml zugegeben und über Nacht bei 64°C hybridisiert. Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurden die Filter 4x mit zunehmender Stringenz gewaschen (je 15 Min. in 2x, 1x, 0,5x und 0,2x SSC mit jeweils 0,1% SDS). Die Exposition der Filter auf X-Omat-AR-Filme (Amersham) erfolgte in Kassetten mit Verstärkerfolien bei -70°C.

2.5.6 Herstellung der Sonden

Die Herstellung radioaktiver Sonden erfolgte mittels Amplifikation von Plasmid-DNA der zu detektierenden Konstrukte mit den Primern GFP for und GFP rev3 für pDNS-1 und pDNS-3 sowie Barn for und Barn rev für pDNS-2 in Standard-PCR Ansätzen (siehe 2.4.1). Zur Detektion des Antisense-Konstrukts wurde als Sonde der Ubiquitin-Promotor mit den Primern UbiC und Ubi1R aus Ubi-Cass amplifiziert. Zum Nachweis der Expression von *ZmMADS2* in verschiedenen Geweben von *Zea mays* wurden ein Teil des C-Terminus und 3'UTR mit den Primern Pe for und Pe rev aus pTL1-22 amplifiziert (Heuer, 1999). Die Fragmente wurden in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem EasyPure Kit (Biozym) isoliert und aufgereinigt. Die DNA-Fragmente wurden mit [³²P]^α-dCTP (6000 Ci/mmol, Amersham) mit

dem Prime-It II-Random-Primer-Labeling Kit (Stratagene) entsprechend den Herstellerangaben radioaktiv markiert und über Nuc-Trap-Push-Säulen (Stratagene) gereinigt.

2.6. RNA-Isolierung und Analyse

2.6.1. RNA-Isolierung aus Maisgeweben

Grob zerkleinerte Blätter, reife Pollen und Antheren verschiedener Entwicklungsstadien wurden mit sterilen Mörsern in flüssigem Stickstoff pulverisiert und die RNA nach der Trizol Methode (Gibco) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Um den Zeitraum der *ZmMADS2*-Expression genauer einzugrenzen, wurden die Antheren in drei Fraktionen nach Cheng et al. (1979) unterteilt: Fraktion VIIIa enthielt Antheren des Zwei-Zell Stadiums mit beginnender Tapetum-Degeneration, Antheren der Fraktion VIIIb hatten die vollständige Größe erreicht und zeigten eine grüne Farbe, in Fraktion VIIIc waren die Antheren rot, das Tapetum war vollständig degeneriert. Die Ablösung der Intermikrosporangialen Streifen (siehe Abb. 1.1) war noch nicht erfolgt.

2.6.2. Northern Blot Analysen

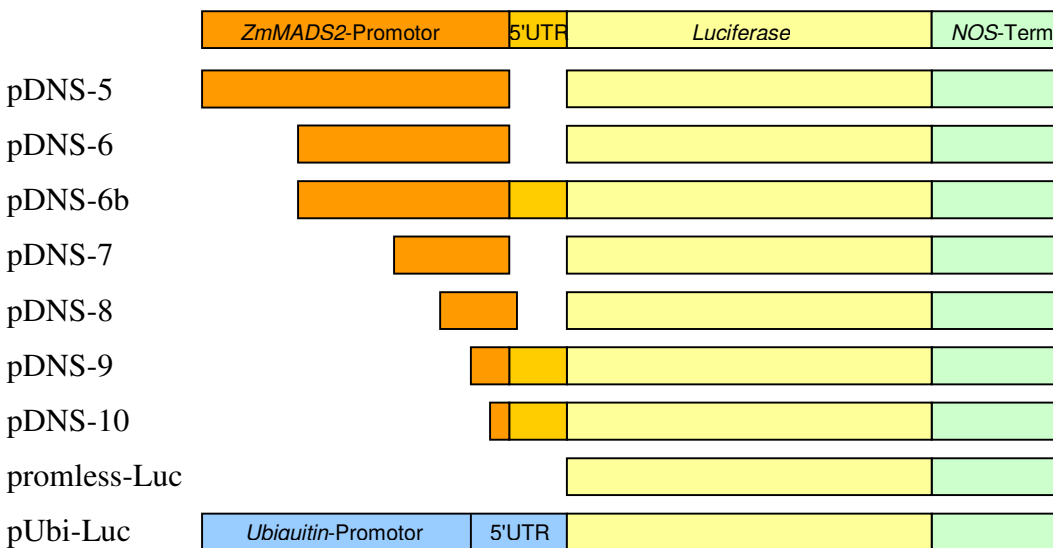
Jeweils 10 µg RNA der oben aufgeführten Maisgewebe und 0.2–10 kb RNA Marker (Sigma) wurden in 2 µl 10x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd (37%), 10 µl Formamid und 0,5 µl Ethidiumbromid für 15 min. bei 65°C inkubiert und nach Zugabe von je 2 µl RNA-dye (50% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau) in einem Agarosegel (1,85g Agarose, 95 ml H₂O, 20 ml Formaldehyd (37%) und 12,5 ml 10x MOPS-Puffer) bei 120 mV elektrophoretisch aufgetrennt. Die Übertragung der RNA auf Hybond-N⁺-Membrane (Amersham) erfolgte ü.N. mit 10x SSC. Anschließend wurde die RNA mit 300 mJoule in einem Stratalinker 1800 (Stratagene) fixiert. Vorhybridisierung, Sondenhybridisierung und Exposition erfolgten wie unter 2.5.5. beschrieben.

2.7. DNA-Sequenzierung und -Analyse

Sequenzierungen wurden mit einem ABI PRISM 377 Sequencer durchgeführt. Zur Sequenzierung von klonierten PCR-Fragmenten wurden Vektorprimer eingesetzt, zur Kontrolle der Konstrukte für die transiente Transformation Luc2 und der jeweilige 5'-Primer (Prom1, Prom2, Prom2!, Prom4 und Prom5). Die Konstrukte zur stabilen Transformation von unreifen Maisembryonen wurden mit folgenden Primern sequenziert: M2Bcl und M2Xh0 (pDNS-4); MP2 und McFi (pDNS-1); Mp2, M2fPe und M2Pr1 (pDNS-3) sowie M2fPe, M2Pr1 und Mp2 (pDNS-2). Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurde das DNA Star Software-Paket (Lasergene) verwendet. Der *ZmMADS2*-Promotor wurde mit Hilfe der PLACE Datenbank (Higo und Ugawa, 1999) und dem MatInspector Programm (Genomatix Software, Quandt et al., 1995) untersucht.

2.8. Biolistische Transformation

2.8.1. Übersicht der zur transienten Transformation verwendeten Konstrukte



2.8.2. Herstellung der Konstrukte zur transienten Transformation

Zur Herstellung des Konstrukts pDNS-5, welches die gesamte bekannte Promotorsequenz von *ZmMADS2* enthält, wurde das aus dem Genome Walking gewonnene DNA-Fragment (Klon

Pvu5) mit *PvuII* und *NheI* verdaut und anschließend in die entsprechenden Restriktions-Schnittstellen eines promotorfreien Luciferase-Vektors (R. Brettschneider, unveröffentlichter Vektor) ligiert. Dieses Konstrukt enthielt 1502 bp des Promotors sowie 36 bp des 5' untranslatierten Bereichs (5'UTR) von *ZmMADS2* und wurde als Vorlage zur Amplifikation weiterer Deletionskonstrukte verwendet. Mit den Primern Prom1 (pDNS-6), Prom2 (pDNS-7) und Prom2! (pDNS-8) wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII*, bzw. *PstI* am 5'-Ende des Amplikons an den Positionen -1038, -497, bzw. -327 relativ zum Transkriptionsstart eingefügt. Der Gegenprimer LUC2 ist innerhalb der kodierenden Sequenz der Luciferase stromabwärts einer *XbaI* Schnittstelle lokalisiert. Nach dem Doppelverdau des Amplikons und des promotorfreien Konstrukts wurden beide Fragmente ligiert. Zur Herstellung von pDNS-6b wurde die 5'UTR von *ZmMADS2* mit *NheI* aus dem cDNA-Konstrukt pTL1-22 (S. Heuer, 1999) ausgeschnitten und in korrekter Orientierung in pDNS-6 eingefügt. Dieses Konstrukt wurde als Vorlage zur Amplifikation von pDNS-9 und pDNS-10 verwendet. Mit den hierzu eingesetzten Primern Prom4 (pDNS-9) und Prom5 (pDNS-10) wurde jeweils eine *XbaI* Schnittstelle an den Positionen -210, bzw. -67 eingefügt und die Fragmente analog zu pDNS-6 bis pDNS-8 in den promotorfreien Luciferase-Vektor (s.o.) eingefügt.

Zur Herstellung des Konstrukts *pZmMADS2::GUS* wurden der Promotor und die 5'UTR von *ZmMADS2* mit den Primern Prom1 und Nco rev aus pDNS-6b amplifiziert. Hierbei wurde eine Restriktionsschnittstelle für *NcoI* am ATG Start-Codon eingefügt. Der *Ubiquitin*-Promotor wurde mit *HindIII* und *NcoI* aus *pUbi::Gus* (Christensen et al., 1996) ausgeschnitten und statt dessen das *ZmMADS2*-Promotor Fragment in diese Schnittstellen inseriert. Alle klonierten Fragmente wurden vor der weiteren Verwendung sequenziert.

2.8.3. Transiente Expressionsanalysen in Pollen von Mais und Tabak

Zur Analyse des *ZmMADS2*-Promotors wurden reife Pollen von Mais und Tabak transient mit sieben Promotor-Deletionskonstrukten transformiert und die Aktivität zweier Reportergene gemessen. Als positive Kontrolle wurde in jedem Experiment die Aktivität von Luciferase, bzw. β -Glucoronidase unter Steuerung des *Ubiquitin*-Promotors aus Mais gemessen (Konstrukt: *pUbi::Luc*, Christensen et al., 1996). Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität (Negativkontrolle) wurde ein Konstrukt ohne Promotor eingesetzt, welches die kodierende Sequenz der "Firefly" Luciferase sowie den Terminator des *Nopaline Synthase* Gens aus Mais

enthält (de Wet et al., 1987). Stromaufwärts der *Luciferase* Sequenz wurde ein *NheI*-Adaptor eingefügt (Konstrukt: promless *Luc*). Dieses Konstrukt wurde von Dr. R. Brettschneider zur Verfügung gestellt.

Um geeignete Parameter für die Transformation von Maispollen zu bestimmen, wurde zunächst eine biolistische Transformation (PDS 1000/He gun, BioRad) mit *pUbi::Luc* bei verschiedenen Gasdrücken durchgeführt. Maispollen wurden zwischen 14.00 und 17.00 Uhr direkt auf Petri-Schalen mit festem PGM (siehe 2.7.6.) gesammelt. Die Platten wurden nebeneinander auf ein Tablett gestellt und unter die herabfallenden Pollen einer kurz geschüttelten Maispflanze gehalten. Auf diese Weise wurde eine gleichmäßige Verteilung der Pollen erreicht. Die Transformation erfolgte unmittelbar nach Sammlung der Maispollen. Die Vorbereitung der verwendeten Goldpartikel (0.2-2 μm , Heraeus) als Trägermaterial der Konstrukte wurde, wie bei Brettschneider et al. (1997) beschrieben, durchgeführt. Die Transformation mit jeweils 500 ng Plasmid-DNA erfolgte bei 1350, 1550, 1800 und 2000 psi. Der Abstand zwischen Berstscheibe und Makrocarrier betrug 2,0 cm, zwischen Makrocarrier und Stop-Gitter 1,5 cm, zwischen Stop-Gitter und Oberfläche der Petri-Schale 5,5 cm. Um den benötigten Gasdruck von 1800 bis 2000 psi zu reduzieren, wurde der Makrocarrier um 2 mm näher an die Berstscheibe gebracht. Zur Analyse der Markergen-Expression verschiedener Deletionskonstrukte wurde die transiente Transformation mit den optimierten Einstellungen bei 1550 psi durchgeführt.

Die transiente Transformation von Tabakspollen erfolgte analog zur Maispollen Transformation, mit dem Unterschied, daß hier ein Gasdruck von 1350 psi ausreichend war. Tabakspollen wurden vor der Transformation etwa 60 Minuten in PGM bis zum Beginn der Pollenkeimung inkubiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich Blattspitzen von etwa vier cm^2 und ca. 2 cm lange Wurzelspitzen von jungen Maispflanzen der Inzuchtlinie A188 analog zu Tabakspollen bei einem Druck von 1350 psi transformiert.

Der Nachweis von Luciferase-Aktivität in Pollen, Blattspitzen und Wurzeln von Mais und Tabak wurde mit dem Luciferase Assay System (Promega) durchgeführt. Pollen wurde etwa 16 Stunden nach Keimungsbeginn vorsichtig mit einem Spatel von den PGM-Platten in eisgekühlte 2 ml große Reaktionsgefäße überführt. Blattspitzen und Wurzelabschnitte wurden mit einem Skalpell abgeschnitten. Die Proben wurden 1 min. mit einem Hand-Homogenisator (Micropistil, Eppendorf) zerkleinert und nach Zugabe von 100 μl Lyse-Reagenz ("Cell Culture Lysis Reagent", Promega) durch kräftiges vortexen aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g für 1 min. wurden die Überstände in sterile Reaktionsgefäße

überführt und anschließend die Luciferase-Aktivität in einem Lumometer (Berthold) gemessen.

Die Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität in Pollen erfolgte nach dem Protokoll von Jefferson et al. (1987) in einem Fluorometer (Fluoroscan II, Labsystems). Der Aufschluß der Proben wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zur histochemischen Lokalisierung von β -Galaktosidase Aktivität in Pollen wurden die Proben etwa 16 h nach der biolistischen Transformation mit 1 mg/ml X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) nach Jefferson et al. (1987) in Färbepuffer mit 0,5 mM Kalium-Ferri/Ferrozyanid überschichtet. Die Färbung wurde nach ein- bis zweitägiger Inkubation bei 37°C unter einem Lichtmikroskop visualisiert und auf Diafilm (Kodak), bzw. digital dokumentiert.

2.8.4. Optimierung der *in vitro* Pollenkeimung

Zur Durchführung der Promotor-Analysen wurde zunächst ein Protokoll für ein Pollenkeimungsmedium erstellt, in dem Pollen von *Zea mays* sowie anderen Pflanzenarten zu 50% bis 100% keimfähig sind. Hierzu wurde ein Keimungsmedium für *Tradescantia sp.* (10% Saccharose, 0,01% Borsäure, 0,1% Hefe Extrakt, 10 mM CaCl₂ and 0,05 mM KH₂PO₄) nach Mascarenhas (1966) schrittweise modifiziert. Die optimale Zusammensetzung des Mediums wurde anhand der Keimungsraten von Maispollen bestimmt. Anschließend wurde die Keimfähigkeit von Pollen verschiedener anderer Spezies bestimmt. Das optimierte Keimungsmedium "Pollen Germination Medium", PGM wurde doppelt konzentriert aus den folgenden Komponenten angesetzt: 10% Saccharose (Roth), 0,005% H₃BO₃ (Sigma-Aldrich), 10 mM CaCl₂ (Sima-Aldrich). 0,05 mM KH₂PO₄ (Merck-Schuchardt), 6% PEG 4000 (Merck-Schuchardt). Nach Zugabe aller Komponenten wurde das Medium für 10 min. auf 70°C auf einem Magnetrührer erhitzt und anschließend steril filtriert. Zur Herstellung von Flüssigmedium wurde PGM 1:1 mit sterilem H₂O verdünnt. Festes Medium wurden nach Zugabe des gleichen Volumens 0,6% Agar ("Agar Agar Molecular biology grade", AppliChem) zur Endkonzentration von 0,3% angesetzt und in Petri-Schalen gegossen.

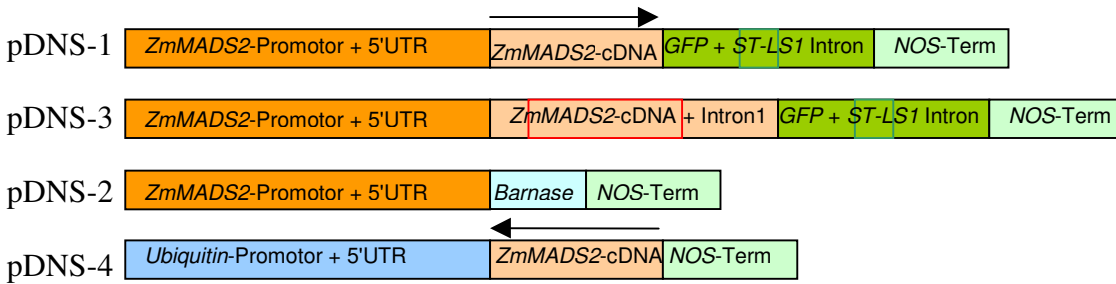
Zur Feststellung der Keimungsraten wurden Pollen verschiedener Inzuchtlinien von *Zea mays* und *Nicotiana tabacum* in Eppendorff-Reaktionsgefäßen gesammelt und mit 2 ml flüssigem Keimungsmedium versetzt. Jeweils 200 μ l wurden auf festes Medium pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Keimungsraten durch Auszählen unter dem optischen Mikroskop bestimmt. Die Feststellung der Keimfähigkeit von

Pollen der Arten *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Columnnea oesterdiana*, *Pennisetum americanum*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Tradescantia sp.* und *Vicia faba* erfolgte analog, wobei hier Pollen in Papiertüten gesammelt und anschließend mit einem Pinsel durch Abklopfen über der Platte auf das Medium appliziert wurden.

2.8.5. Untersuchungen von Pollen mit dem Raster Elektronenmikroskop (REM)

Pollen von Mais, Tabak und *Tradescantia palludosa* wurden gesammelt (siehe 2.8.4.) und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Da sich beim Zentrifugieren von kleinen Pollen, wie Tabak und *Tradescantia*, nur ein geringer Anteil im Pellet sammelt, wurden die drei Arten gemischt. Nach Zugabe von 1 ml 10 % KOH und kräftigem vortexen wurden die Proben 10 min. im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Pollen durch eine kurze Zentrifugation bei 12.000 x g pellettiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Proben 2 x in dest. H₂O und 1 x in Eisessig gewaschen. Nach Abnehmen der Überstände wurden die Pollen 4 min. in Acetolyse-Gemisch (9 Teile Essigsäureanhydrid und 1 Teil Schwefelsäure) im Wasserbad gekocht. Nach 2 maligem Waschen in dest. H₂O wurden die Proben in 96% igen Alkohol aufgenommen und auf Probenhalter pipettiert. *Arabidopsis*-Pollen wurden nach dem "Critical Point"-Verfahren, modifiziert nach Gerstenberger und Leins (1978), getrocknet. Hierzu wurden reife Antheren und Pistillen mit aufsitzenden Pollen in Probenkörbchen überführt. Diese wurden für eine h in Fixativ (5 ml 37 % Formalin, 5 ml 96 % ige Essigsäure, 56 ml 96 % Ethanol und 34 ml destilliertes H₂O) inkubiert. Anschließend wurden die Probenkörbchen für drei h und über Nacht jeweils in frisches Fixativ überführt. Nach Inkubation für 1 h in FDA (Formaldehyd-Dimethyl-Acetal) wurden die Proben in die auf 10°C abgekühlte Kammer des Kritisch-Punkt-Apparates (CPD 030, Balzers) überführt und vollständig getrocknet. Die Proben wurden aus den Körbchen entnommen und auf Probenhalter gebracht. Nach Bedampfen mit Gold in einem Sputtergerät (SCD 050, Balzers) wurden die Pollen in einem Scanning Raster Elektronenmikroskop (XL-20, FEI) bei 8 kV visualisiert und die Aufnahmen elektronisch gespeichert.

2.8.6. Übersicht der zur stabilen Transformation verwendeten Konstrukte



2.8.7. Herstellung der Konstrukte zur stabilen Transformation

Alle zur stabilen Transformation von Mais-Embryonen verwendeten Konstrukte wurden von DNA Cloning Service (Dr. H. Schmidt) im Auftrag hergestellt. Zur Herstellung des Antisense-Konstrukts pDNS-4 wurde die cDNA Sequenz von *ZmMADS2* mit den Primern M2Bcl und M2Xho aus dem Plasmid pTL1-22 (S. Heuer, 1999) amplifiziert und in Gegensinn-Orientierung in die *Bam*HI und *Sal*I Schnittstellen des Vektors pUbi-Cass (Christensen et al., 1996) integriert.

Für das *ZmMADS2*::GFP Fusions Konstrukt pDNS-1 wurden die *gfp* kodierende Sequenz inklusive des *ST-LS1* Introns und der *NOS*-Terminator mit den Primern GfpNco und NoEco aus dem Plasmid pMon30049 (Pang et al., 1996) amplifiziert. Das Fragment wurde in die *Nco*I und *Eco*RI Schnittstellen des Vektors pLitmus (NEB) integriert. Der *ZmMADS2*-Promotor wurde aus Pvu5 mit den Primern M2Pf und M2Pr1 amplifiziert. Die kodierende Sequenz von *ZmMADS2* wurde aus pTL1-22 mit den Primern M2fPE und M2rBspH amplifiziert und das entstandene Fragment terminal mit *Xba*I und *Bsp*HI geschnitten. Das geschnittene Fragment aus Promotor und cDNA wurde in die *Xba*I und *Nco*I Schnittstellen des GFP-Vektors kloniert. Zur Herstellung von pDNS-3 wurden Promotor, 5'UTR und Exon 1 aus pDNS-1 amplifiziert. Das Intron 1 von *ZmMADS2* wurde aus dem Klon Hinc9 mit den Primern Mif und Mir amplifiziert. Die stromabwärts gelegene Sequenz der *ZmMADS2*-cDNA sowie die GFP kodierende Sequenz und der *NOS*-Terminator wurden aus pDNS-1 mit den Primern Mfi und M2rBspH amplifiziert. Die drei DNA-Fragmente wurden durch Overlap-PCR mit den Primern M2Pf und M2rBspH amplifiziert und das entstandene Fragment terminal mit *Xba*I und *Bsp*HI geschnitten. Das resultierende Fragment wurde in die *Xba*I und *Nco*I Schnittstellen des Gfp-Vektors integriert.

Zur Herstellung des *Barnase*-Konstrukts pDNS-2 wurde der *ZmMADS2*-Promotor mit den Primern M2Pf und M2Pr2 amplifiziert und über die angefügten *Xba*I und *Bsp*HI Schnittstellen in die *Xba*I und *Nco*I Schnittstellen des Vektors L29-Bain (DNA Cloning Service) integriert.

2.8.8. Biolistische Transformation von Maisembryonen und Analyse transgener Pflanzen

Zur Analyse der Funktion von *ZmMADS2* wurden Antisense-Pflanzen der Inzuchtlinie A 188 durch Transformation mit dem Konstrukt pDNS-4 erstellt (siehe 2.7.5.). Um die Lokalisierung des Proteins während der Mikrogametogenese und in den Antheren zu untersuchen, wurden Embryonen von Hybridpflanzen der Inzuchtlinien A188 und H99 mit den Konstrukten pDNS-1 und pDNS-3 (siehe 2.7.5.) transformiert. Beide Konstrukte enthalten ein *ZmMADS2*-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors. Zur Analyse einer möglichen kommerziellen Anwendung von *ZmMADS2* wurden Hybridpflanzen mit dem *Barnase*-Gen unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors transformiert (Konstrukt pDNS-2, siehe 2.7.5.).

Zur Transformation wurden unreife Embryonen (12 d nach Bestäubung, Größe etwa 1-1,5 mm) der Inzuchtlinie A188 und Kreuzungen der Linien A188 x H99 isoliert. Embryonen wurden 7 bis 11 d vorkultiviert und 4 h vor Beschuß auf osmotisches Medium überführt (nach Brettschneider et al., 1997). Plasmide der unter 2.7.5. aufgeführten Konstrukte wurden in Kombination mit dem p35S::BAR-Konstrukt (Becker et al., 1994) als Selektionsmarker an Gold-Microcarrier (0,2-2 µm) gebunden und für die biolistische Transformation der unreifen Embryonen mit einer PDS 1000/He-Gun (BioRad) eingesetzt. Gewebekultur und Selektion wurde wie bei Brettschneider et al. (1997) beschrieben durchgeführt.

Pflanzen aus den Transformationsversuchen wurden in Southern- und Northern-Blot Analysen, bzw. mittels RT-PCR, auf die Integration der Transgene und deren Expression analysiert. Die Expression des Antisense-Konstrukts in schwach exprimierenden transgenen Pflanzen (DNS-4.3a,b,c,d und DNS-4.4) erfolgte mit den Primern UbiD und Ex3-unten.

2.8.9. Fluoreszenzmikroskopie

Pollen und Antherenpräparate von transgenen und Wildtyp-Pflanzen wurden mit dem Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss) mit der Auflicht-Fluoreszenzmethode untersucht. Hierzu wurden die Proben mit der N HBO 103 Fluoreszenzleuchte bestrahlt und die Emission bei 510 nm (GFP), bzw. 461 nm (DAPI) visualisiert. Zur Dokumentation wurden Aufnahmen mit der CAMEDIA C-4040 ZOOM Digitalkamera (Olympus) gemacht und elektronisch gespeichert. Die Bilddateien wurden mit "Paint Shop Pro" (Jasc Software) zur Kontrastanhebung nachbearbeitet.

2.9. Hefe Two-Hybrid-System

2.9.1. Hefeanzucht und Plasmidisolierung

Anzucht und Selektion von Hefekulturen erfolgten nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen). Zum Studium von Protein-Protein Interaktionen wurde das Hybrid Hunter Yeast Two-Hybrid System Version A (Invitrogen) verwendet. L40-Hefezellen wurden in YPDA (20 g/l Pepton, tryptisch verdaut, 10 g/l Hefeextrakt, pH5,8; nach Autoklavieren Zugabe von 50 ml 50% Dextrose und 40 mg/l Adenin) bei 30°C kultiviert und nach dem Protokoll von Agatep et al. (1998) transformiert. Die Selektion auf Transformanten mit verschiedenen Konstrukten erfolgte durch Entfernung einzelner Aminosäuren im Medium. Selektion auf den "Prey"-Vektor pYESTrp erfolgte durch Weglassen von L-Tryptophan. Durch Zugabe von 300 µg/ml Zeocin wurde auf den "Bait"-Vektor pHybLex/Zeo selektiert.

2.9.2. Nachweis von Protein-Protein Interaktionen

Zur Untersuchung, ob ZmMADS2 im Hefe Two-Hybrid System Homodimere bilden kann, wurde jeweils ein "Bait"- und ein "Prey"-Konstrukt mit dem ORF von *ZmMADS2* erzeugt. Zur Herstellung des "Bait"-Konstrukts wurden an die kodierende Sequenz von *ZmMADS2* mit den Primern Bait for und Bait rev terminal Schnittstellen für *XhoI* und *BclI* angefügt und das resultierende Fragment nach Standard-PCR (2.5.2.) und Restriktion in die *XhoI* und *BglII* Schnittstellen von pHybLex/Zeo (Invitrogen) integriert. Hierbei wurde der ORF *ZmMADS2*

mit der LexA DNA-Bindungsdomäne (im Folgenden ZmMADS2-BD genannt) fusioniert. Für das "Prey"-Konstrukt wurden mit den Primern Prey for und Prey rev analog wie oben beschrieben *Bst*XI und *Xho*I Schnittstellen angefügt und der ORF von *ZmMADS2* in die entsprechenden Schnittstellen von pYESTrp (Invitrogen) eingefügt. Erfolgreich transformierte Hefezellen exprimieren ein Fusionsprotein aus ZmMADS2 und der B42 Aktivierungsdomäne (im Folgenden ZmMADS2-AD genannt). Beide Konstrukte wurden zunächst in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf Low-Salt LB-Medium mit 100µg/ml Zeocin angezogen. Kompetente L40 Hefe-Zellen wurden anschließend mit dem Bait- oder dem Prey-Vektor transformiert und auf Selektionsmedium ohne Histidin auf Autoaktivierung überprüft. Anschließend wurden verschiedene Ko-Transformationen mit ZmMADS2-BD und ZmMADS2-AD, pHybLex/Zeo-Fos und pYESTrp-Jun, sowie pHybLex/Zeo-Fos und pYESTrp-Lamin durchgeführt. Transformanten wurden auf YPDA angezogen und einzelne Klone auf Selektionsmedium mit Zeocin ohne Tryptophan und ohne Histidin überführt. Nach einer Wachstumsperiode von 4 – 6 d bei 30°C wurde ein Filter-Lift Assay nach Hybrid Hunter Protokoll (Invitrogen) durchgeführt. Da Hefekulturen bei Vorhandensein einer externen Aminosäurenquelle, z. B. abgestorbene Zellen in schnell wachsenden Kolonien, Plasmid-DNA leicht verlieren, wurde die Integration der Plasmide vor der Übertragung auf Nylonmembrane mittels PCR überprüft. Kulturen, denen eins oder beide Konstrukte fehlten, wurden im β -Galactosidase Assay nicht ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. *ZmMADS2* ist ein Mitglied der AGL17-Unterfamilie der MADS-Box Gene

Datenbank-Analysen der Aminosäuresequenz von *ZmMADS2* mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) zeigten hohe Homologien zu Mitgliedern der AGL17-Unterfamilie der MADS-Box Gene. Die größte Ähnlichkeit besteht zu dem aus der genomischen Sequenz von Reis abgeleiteten Protein OSJNBa0072F16.17 (Accession Nummer AL606460.2, im Folgenden OSJNBa genannt) und DEFH125 aus *Antirrhinum majus*. *ZmMADS2* und OSJNBa sind zu 78% homolog, *ZmMADS2* und DEFH125 zu 63%. Außerhalb der hoch konservierten MADS-Box beträgt die Homologie zu OSJNBa 71% und zu DEFH125 54%. Homologien weiterer Mitglieder der AGL17-Unterfamilie zu *ZmMADS2* lagen zwischen 61% und 48%, außerhalb der MADS-Box konnten Ähnlichkeiten zwischen 52% und 40% festgestellt werden. Aus den oben angeführten Daten wurde mit Hilfe des CLUSTALW-Programms und der TreeView-Software ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Zur Abgrenzung der AGL17-Unterfamilie von den übrigen Gruppen wurden MADS-Box Gene mit einbezogen, die weitere Unterfamilien repräsentieren. Neben den jeweiligen Namensgebern aus *Arabidopsis* oder *Antirrhinum* sind MADS-Box Gene aus Mais dargestellt. Subfamilien, deren Mitglieder ausschließlich in Farnen oder Gymnospermen nachgewiesen wurden, sind nicht repräsentiert. Die Aminosäuresequenz von IbMADS (MADS-Box Gen aus *Ipomoea batatas*) wurde aus dem Transkript abgeleitet. OSJNBa, At3g und das MsMADS-Fragment stehen für putative Proteine, deren Aufbau aus genomischen Sequenzen von *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, bzw. *Medicago sativa* vorhergesagt wurden.

3.2 *ZmMADS2* ist spezifisch während der Antheren- und Pollenreifung exprimiert

Die kodierende Sequenz von *ZmMADS2* wurde ursprünglich aus einer cDNA-Bibliothek reifer Mais-Pollen gewonnen und nach detaillierten Expressionsanalysen als spätes Pollengen charakterisiert (S. Heuer, 1999, Heuer et al., 2000). Hierbei wurde die spezifische Expression

von *ZmMADS2* in reifen Pollen, während des Pollenschlauchwachstums und durch RT-PCR in Wurzelspitzen nachgewiesen. Da aus der Literatur einige Beispiele später Pollengene bekannt sind, die neben einer Expression im männlichen Gametophyten eine Expression in sporophytischen Geweben der reifen Anthere zeigen, wurden in dieser Arbeit weitere Untersuchungen zum Nachweis des Transkripts vorgenommen. Mittels Northern-Blotting konnten neben der Bestätigung der vorliegenden Daten eine ansteigende Expression von *ZmMADS2* in der reifen Anthere während der letzten zwei d vor Anthese sowie eine schwache Expression in Wurzelspitzen nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Während der Antherenentwicklung konnte das *ZmMADS2*-Transkript zuerst im mittleren Stadium 8, zwei D vor Anthese, detektiert werden. In diesem Stadium haben die noch grün gefärbten Antheren ihre vollständige Größe erreicht, Tapetum und Zwischenschicht sind degeneriert und die Entwicklung der Pollen (Mikrogametogenese) ist fast abgeschlossen. Die stärkste Expression von *ZmMADS2* innerhalb der reifen Anthere wurde im späten Stadium 8, einen Tag vor Anthese, in rot gefärbten Antheren nachgewiesen. Beim Aufspringen der Anthere in Stadium 9 akkumuliert das *ZmMADS2*-Transkript in reifen Pollen. Die *ZmMADS2*-Expression in Wurzelspitzen ist sehr schwach und vergleichbar mit der Expression in Antheren des mittleren Stadiums 8. in Wurzeln ohne Spitzen konnte eine Expression erst nach längerer Exposition nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

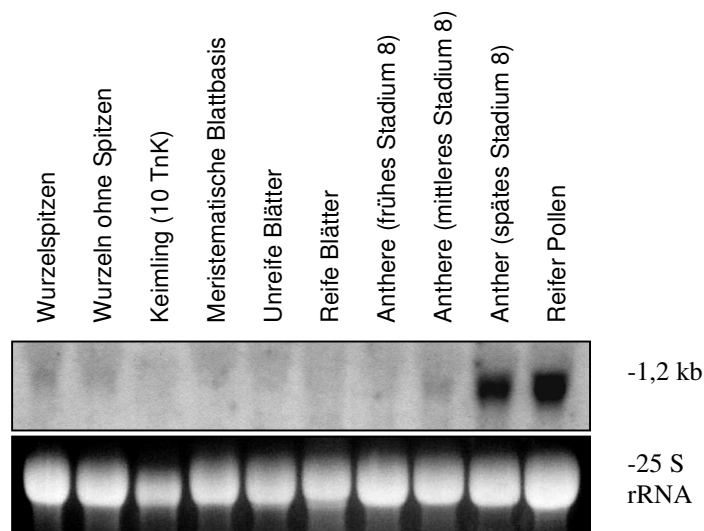


Abb. 3.1: Expression von *ZmMADS2* in Maisgeweben

ZmMADS2 ist in vegetativen und reproduktiven Geweben von Mais exprimiert. Je 20 µg RNA wurden in einem 1,5% igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Das 1244 bp große Transkript wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, die einen Teil des C-Terminus und die 3'UTR von *ZmMADS2* zwischen den Primern Pe for und Pe rev beinhaltet, detektiert.

3.3. Genomische Struktur des *ZmMADS2*-Gens

3.3.1. Intronsequenzen

Das *ZmMADS2* Gen aus *Zea mays* gehört zum MIKC-Typ (ohne N-terminale Extension) pflanzlicher MADS-Box Transkriptionsfaktoren. Das Protein ist in vier funktionale Domänen unterteilt: die hoch konservierte MADS-Box (*MCM*, *AG*, *DEFA*, *SRF*), die Linker- oder Intersequenz (I), die ebenfalls hoch konservierte K-Box (Keratine like Box) und einem hoch variablen C-Terminus (Heuer, 1999). Zur Aufklärung der genomischen Struktur von *ZmMADS2* wurden aus der cDNA-Sequenz die Primer AEx3, Ex3-oben und Ex3-unten als forward-Primer, sowie Ex3-nebo1, Ex3-nebo2, Ex3-nebo3, Ex3-netnu und MADS3'rev als reverse Primer abgeleitet und in unterschiedlichen Kombinationen zur genomischen PCR eingesetzt. Die Amplifikate wurden in den in den pCR Blunt II TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Auf diese Weise konnte die DNA-Sequenz der Introns 3 bis 7 bestimmt werden. Da die Sequenz der MADS-Box hoch konserviert ist, konnten im Bereich der MADS-Box keine Oligonukleotide zur spezifischen Amplifikation genomischer Intron-DNA abgeleitet werden. Aus diesem Grunde wurde das Genome Walking von der bekannten 5'UTR-Sequenz ausgehend in beide Richtungen (stromauf- und stromabwärts) durchgeführt. Die genspezifischen Primer Front1 und Front2 wurden in einer geschachtelten PCR zur Bestimmung der Sequenz der Introns 1 und 2 eingesetzt. Das hiermit generierte Fragment (Klon Hinc9) enthielt 217 bp von Intron 2. Da eine genomische PCR mit dem hieraus abgeleiteten Primer In-21 und verschiedenen Gegenprimern ergebnislos verlief, wurden weitere Primer aus der Sequenz der Introns 2 (In-22, In-24, In-25, In-28, In-29) und des Introns 3 (In-31, In-32, In-33) abgeleitet und im Genome Walking eingesetzt. Hiermit konnten von Intron 2 insgesamt 1737 bp am 5'-Ende und 628 bp am 3'-Endes isoliert werden. Eine weitere genomische PCR zu Bestimmung der fehlenden Sequenz mit den Primern In-29 und In-27 (abgeleitet aus dem 3'-Ende des Intron2) blieb ohne Ergebnis. Insgesamt wurden 7149 bp des *ZmMADS2*-Gens kloniert (Gene Bank Accession Nummer AY227363, siehe auch Apex 1).

Abb. 3.2 zeigt die Untergliederung von *ZmMADS2* in acht Exons und sieben Introns. Intron 2 (I2 in Abb. 3.2A) ist mit seiner ungewöhnlichen Größe von mehr als 2,3 kbp ungewöhnlich groß. Die MADS-Box liegt auf Exon 1 und wird durch Intron 1 von der Linker- oder Inter-Sequenz getrennt, an deren Ende sich wiederum ein Intron befindet. Die K-Box und der C-

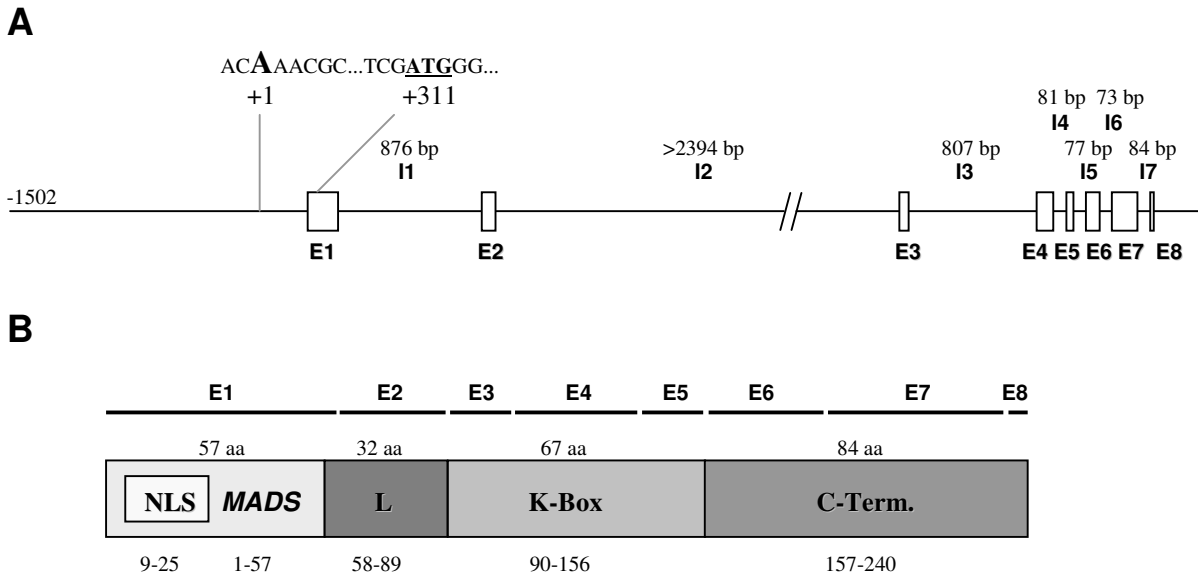


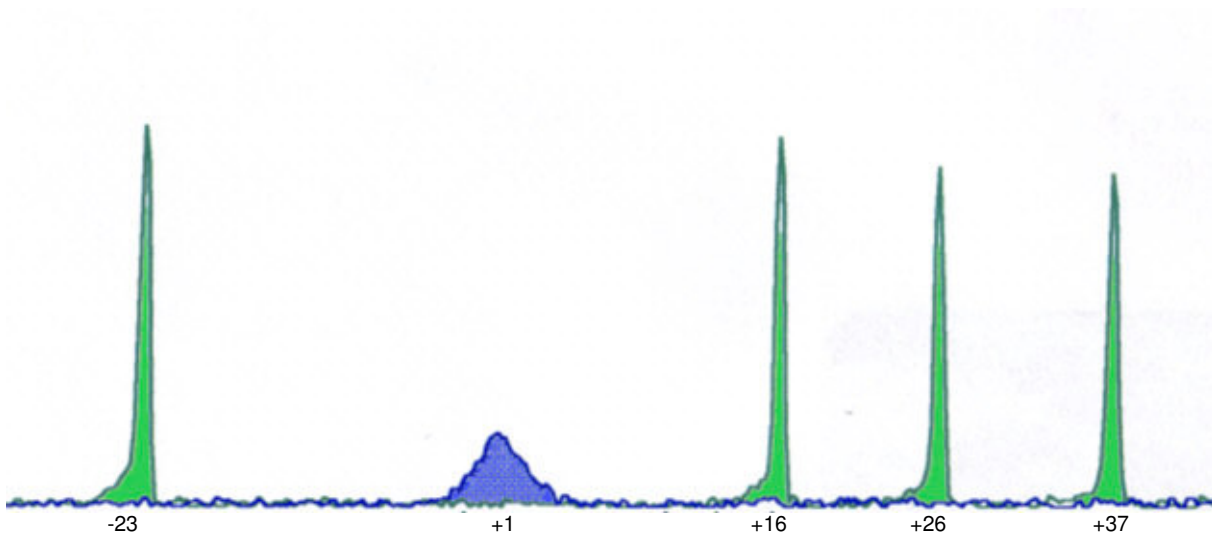
Abb. 3.2: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *ZmMADS2* aus *Zea mays* L.

A zeigt einen Überblick über die Verteilung der regulatorischen, kodierenden und nicht-kodierenden Bereiche innerhalb der bekannten 7149 bp großen genomische Sequenz. Mittels Genome Walking wurden 1502 bp des *ZmMADS2*-Promotors isoliert. Die Lage des Transkriptionsstartpunkts 311 bp stromaufwärts des ATG START Codons wurde mittels Primer Extension bestimmt (siehe 3.3.2). Die das ATG START Codon umgebende Sequenz TCGATGGG entspricht der Konsensus-Sequenz für monokotyledone Pflanzen. Die Größe und Position der Introns relativ zu den Proteindomänen entspricht der für MADS-Box Gene vom MIKC-Typ typischen Anordnung. Eine Ausnahme bildet das mit mehr als 2,3 kbp ungewöhnlich große Intron 2 (I2), dessen DNA-Sequenz nicht vollständig bestimmt wurde. **B** zeigt die Größe und Lokalisierung der Protein-Domänen von *ZmMADS2*, die Lage der Kernlokalisierungs-Sequenz, sowie die Verteilung der Exons (E1 bis E8) relativ zu den Domänen. Die Größe der Domänen ist in Aminosäuren oberhalb der Boxen angegeben.

Terminus von *ZmMADS2* sind jeweils auf drei Exons verteilt, die von kurzen Introns unterbrochen werden (Abb. 3.2.B). Spleißstellen von Introns im Zellkern besitzen kurze, hoch konservierte Konsensus-Sequenzen, die überwiegende Mehrzahl dieser Introns beginnt mit den Basen Guanin und Thymin und endet auf Adenin Guanin (Luehrsen et al., 1994). Außer Intron 2 erfüllen alle *ZmMADS2*-Introns die GT-AG Regel. Das Ausschneiden der Introns aus dem Primärtranskript erfolgt in zwei Schritten: der beim Spleißen am linken Ende entstehende 5'-Terminus bindet über eine 5'-2'-Bindung an das Adenin einer konservierten Sequenz, die etwa 20 bis 40 bp stromaufwärts der rechten Spleißstelle lokalisiert ist. Hierbei entsteht die Lariat (Lassoschlinge) Struktur. Im Gegensatz zu Hefe, ist bei höheren Eukaryonten innerhalb dieser Sequenz lediglich die bevorzugte Verwendung von Purinen oder Pyrimidinen konserviert, der Konsensus lautet hier Py N Py Py Pu A Py. Eine entsprechende Sequenz

befindet sich in allen Introns von *ZmMADS2* an der erwarteten Position. In einem zweiten Schritt wird an der rechten Spleißstelle geschnitten, das Lariat wird freigesetzt und die Exons miteinander verbunden (Lal et al., 1999).

3.3.2. Promotorsequenz und Transkriptionsstart



GCGCCAAGAAAAGCCATCGTTCTTCCCAC**A**AACGCACACATAGAAGCATCATTCCCCTCTCTCGGCTAGCTT

Abbildung 3.3: Bestimmung des Transkriptions-Startpunkts von *ZmMADS2*

1 µg RNA aus reifen Pollen von *Zea mays* L. (Inzuchtlinie A188) wurde mit dem *ZmMADS2*-spezifischen FAM-markierten Oligonukleotid Extension in cDNA umgeschrieben und die Größe des Produkts in einem 8% igen denaturierenden Harnstoffgel bestimmt. Anhand der Lage des Primers innerhalb der Sequenz von *ZmMADS2* und der Produktlänge wurde der Transkriptionsstart bestimmt. Die blaue Spitze markiert *ZmMADS2*-spezifische FAM-Fluoreszenz und die grünen Spitzen markieren Signale des Größenstandards Gene Scan-500 (TAMRA) Size Standard (Applied Biosystems).

Zur Gewinnung der Promotor-Sequenz wurden die zu Front1 und Front2 revers-komplementären Primer Tnorf1 und Tnorf2 eingesetzt. Das Genome Walking wurde jeweils in sechs verschiedenen genomischen DNA-Banken (*Dra*I, *Eco*RI, *Hinc*II, *Pvu*II, *Sca*I, *Stu*I) von *Zea mays* A188 durchgeführt. Aus der Bank *Dra*I konnte ein Fragment von 1012 bp (Klon Dra) und aus der Bank *Pvu*II ein Fragment von 1732 bp Größe isoliert werden (Klon Pvu5). Die Klone enthielten jeweils 230 bp bereits bekannter Sequenz aus dem 5'UTR und 1502 bp (Pvu5), bzw. 782 bp (Dra) unbekannte Sequenz stromaufwärts der 5'UTR.

Der Transkriptions-Startpunkt von *ZmMADS2* wurde durch Primer Extensions Analyse definiert und liegt 311 bp stromaufwärts des ATG START Codons (Abb. 3.3). Die Kontextsequenz des Translations-Initiations Codons TCGATGGG entspricht dem Konsensus für Monokotyledone Pflanzen (A/G)(A/C)NATGGC (Joshi et al., 1997).

3.3.3. Putative cis-Elemente

Der *ZmMADS2*-Promotor wurde als genomisches Fragment verschiedener Größe durch Genome Walking isoliert. Das größte Fragment enthielt 1502 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (Klon Pvu5, siehe Abb. 3.2A). Analysen der *ZmMADS2*-Promotor Sequenz anhand der PLACE Datenbank und des MatInspector Programms zeigten die Verteilung putativer regulatorischer Elemente im Promotor von *ZmMADS2* (Abb. 3.4) und allgemeiner Transkriptionsfaktoren. In dem Bereich etwa 20 bis 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts konnte keine typische TATA-Box lokalisiert werden. Als alternative, sogenannte Core-Transkriptionsregulationssequenzen befinden sich innerhalb der *ZmMADS2*-Promotor Sequenz insgesamt neun CAAT-Boxen. Die dem Transkriptionsstart am Nächsten gelegene CAAT-Box befindet sich an Position -147 relativ zum Startpunkt. Eine GC-Box (CCCGCCC) befindet sich an der konservierten Position -36 (Abb. 3.4B). *Cis*-Elemente, die die Expression der späten Pollengene *lat52* (AGAAA) aus Tomate (Bate und Twell, 1998) und *g10* (GTGA) aus Tabak (Rogers et al., 2001) steuern, finden sich annähernd statistisch über die *ZmMADS2*-Promotor Sequenz verteilt. Mehrere Wurzel-spezifische *cis*-Elemente (ATATT) befinden sich zwischen den Positionen -1301 und -419 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (Abb. 3.4A). Putative Bindungsstellen für Faktoren, die eine Induktion bei Trockenheit (TAACTG), durch Abszisinsäure (ACACNNG) oder durch Auxin (TGTCTC) vermitteln, befinden sich an den Positionen -811 (CAGTTA) in Box IV, -321 (GAGACA) und -214 (TCTGGGC) in Box II. Zwei G-Boxen, die gemeinsam mit ihren "Coupling"-Elementen eine Induktion durch Abszisinsäure oder Zuckermangel vermitteln, befinden sich an den Positionen -1481 (Abszisinsäure; CACGTG) in Box V, -603 und -483 (Zuckermangel; ACGTA) in Box III. Ein anderes Zuckermangel sensitives Element befindet sich an Position -303 (AATAGAAAA) in Box II. Putative "Coupling"-Elemente der beiden G-Boxen (CGACG) sind an den Positionen -846 in Box IV, -240 in Box II, +199 und +202 in Box 0 lokalisiert. Weitere Analysen mit der GeneQuest Software (Lasergene) zeigten

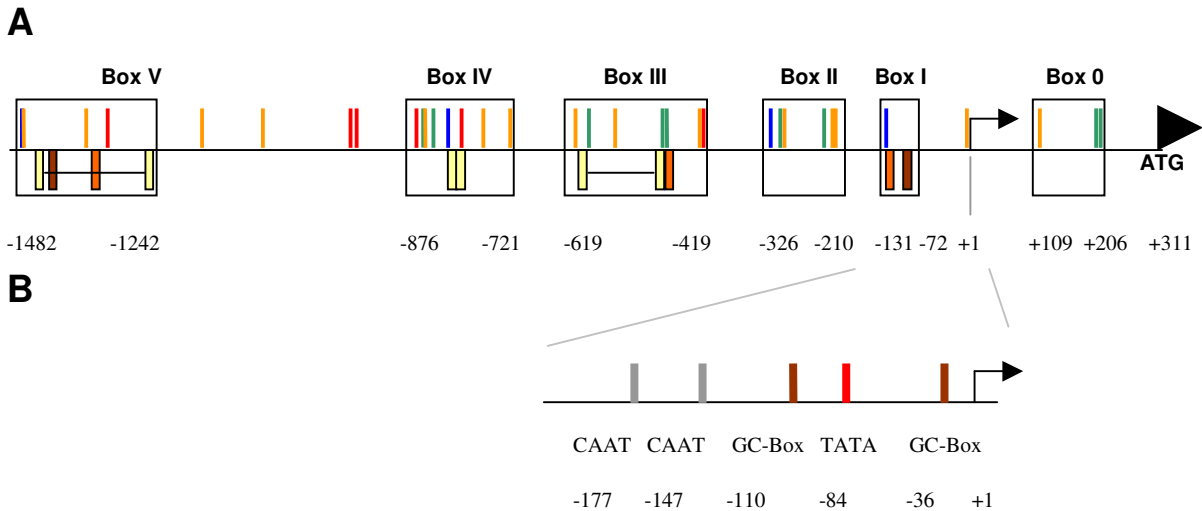
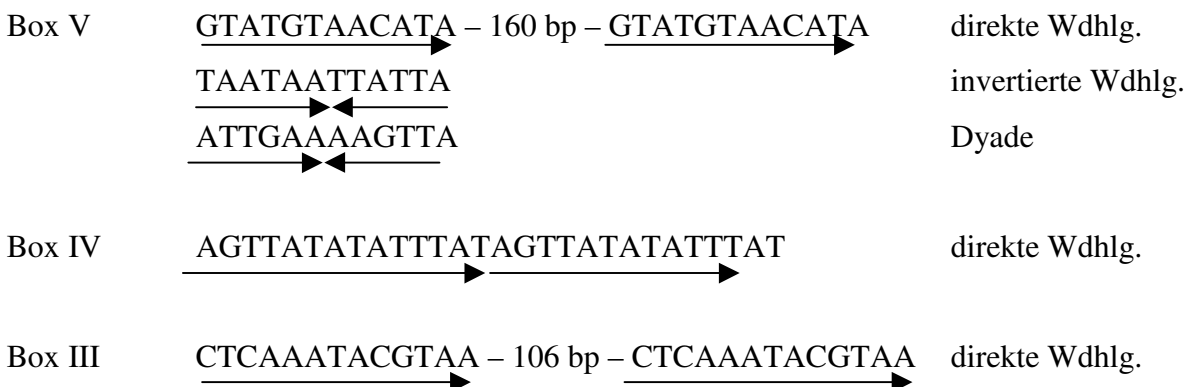


Abbildung 3.4: Verteilung putativer *cis*-Elemente und repetitiver Sequenzen stromaufwärts des ATG START Codons von *ZmMADS2*.

A: Die horizontale Linie symbolisiert 1502 bp des *ZmMADS2*-Promotors sowie 310 bp der 5'UTR. Der Pfeil gibt den Transkriptionsstartpunkt an, die gefüllte Pfeilspitze zeigt den Beginn des kodierenden Bereichs. Putative regulatorische Elemente sind in Boxen zusammengefaßt und farblich markiert: Cis-Elemente, die eine Induktion bei Zuckermangel bewirken, sind grün dargestellt, solche die eine Reaktion auf Auxin, Trockenheit oder Abszisionsäure vermitteln in blau, Wurzel-spezifische Elemente in rot und Motive zur späten Pollen-spezifischen Expression sind in orange angezeigt. Unterhalb der horizontalen Linie sind repetitive Elemente gezeigt: direkte Sequenz-Wiederholungen sind in gelb dargestellt, wobei räumlich getrennte Wiederholungssequenzen mit einer horizontalen Linie verbunden sind. Invertierte Wiederholungen sind braun dargestellt und Dyaden in dunkel orange. **B:** Lokalisierung putativer Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren. Unter der Bezeichnung ist die jeweilige Position relativ zum Startpunkt angegeben. CAAT-Boxen sind in grau dargestellt, GC-Boxen in braun und die TATA-Box in rot. Lediglich die zweite GC-Box liegt an der erwarteten Position etwa 40 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts, die anderen Elemente sind ungewöhnlich weit entfernt.

verschiedene repetitive Elemente innerhalb der Promotor-Sequenz von *ZmMADS2* innerhalb der Boxen V, IV, III und I (Abb. 3.4):



Box I TGCGCGCGCGCGCGCGT; CCCTCCTCCTCCC Dyaden

Interessanterweise enthält die Box II, die sich in transienten Transformationsanalysen als maßgeblich für die Pollen-spezifische Expression erwies (siehe 3.4.2.), keine repetitiven Elemente.

3.4. Untersuchungen zur Pollenkeimung und Optimierung eines Keimungsmediums für Maispollen

Die transiente Transformation von Pollen mit Reportergenen unter der Kontrolle von Promotor-Deletionskonstrukten ist eine schnelle und einfache Methode um regulatorische Elemente in Promotoren zu identifizieren. Um dieses elegante Verfahren beim Mais durchführen zu können, wurde zunächst ein geeignetes Medium für die *in vitro* Pollenkeimung entwickelt. Hierzu wurden die Bestandteile eines für den Modellorganismus *Tradescantia sp.* entwickelten Keimungsmediums (Mascarenhas, 1966; siehe 2.4.2) schrittweise modifiziert. Das Ziel war Keimungsraten von über als 90% für Maispollen zu erhalten.

Basierend auf dem von Mascarenhas (1966) beschriebenen Keimungsmedium wurden Platten mit festem Medium hergestellt und frisch gesammelter Pollen von Mais darauf appliziert. In wenigen Ansätzen war eine Keimungsrate von etwa 80% zu beobachten. In den meisten Fällen platzten die Pollen kurz nach Rehydrierung. Kontrollexperimente mit Pollen von *Tradescantia palludosa* zeigten durchgehend Keimungsraten zwischen 90% und 100%. Unter der Annahme, daß das beobachtete Platzen der Pollenschläuche bei Mais durch den niedrigen osmotischen Druck des Keimungsmediums verursacht wurde, habe ich zunächst der Saccharosegehalt in 2% Schritten von 6% bis 20% variiert. Bei einem Saccharosegehalt von 16% wurde eine durchschnittliche Keimungsrate von 50% der Maispollen beobachtet. Dieses Ergebnis wurde durch eine genauere Untersuchung in 0,5% Schritten bestätigt. Anschließend wurde der Gehalt an Borsäure analog in einem Bereich von 0,0025% bis 0,2% H₃BO₃ variiert. Bei einem Borsäuregehalt von 0,005% wurden durchschnittliche Keimungsraten von über 90% erreicht (siehe auch Tabelle 3.1). Konzentrationen der Kalziumquelle unter 10 mM CaCl₂ hemmten die Keimung vollständig. Bei sehr hoher Kalzium-Konzentration von 100 mM CaCl₂ war in einzelnen Experimenten eine Verzweigung der Pollenschläuche zu

beobachten. Modifikationen der Konzentrationen von KH_2PO_4 und des Hefeextrakts beeinflussten die Keimungsrate nicht, weshalb die ursprünglichen Konzentrationen von 10 mM CaCl_2 und 0,05 mM Kalium-Phosphatpuffer beibehalten und auf Zugabe von Hefeextrakt ganz verzichtet wurde.

Auf festem Medium mit 1% Agar konnten Keimungsraten von über 90% beobachtet werden. Die Pollenschläuche platzten jedoch etwa nach 60 min. beim Eindringen in das Medium. Eine geringere Agar-Konzentration führte zu einer Ansammlung von Schweißwasser um die Pollenkörner herum, welche sofort platzten. Um das Medium zu stabilisieren, wurde der Gehalt an Saccharose schrittweise durch PEG 4000 substituiert. Eine Variation der Konzentration von PEG 4000 zwischen 1% und 10% in 1 % Schritten und einem entsprechenden Saccharosegehalt von 6% bis 15% ergab eine optimale Zusammensetzung aus 6% PEG 4000 und 10% Saccharose. Die Verwendung von PEG mit höherem oder niedrigerem Molekulargewicht führte zu nicht zufriedenstellenden Resultaten. Das optimierte Keimungsmedium für Maispollen wurde PGM (für engl. "Pollen Germination Medium") genannt. Festes PGM wurde mit 0,3% Agar angesetzt.

	12% Saccharose	14% Saccharose	16% Saccharose
	0,01% H_3BO_3	0,01% H_3BO_3	0,01% H_3BO_3
Gekeimte Pollen	36 %	26 %	50 %
Nicht gekeimte Pollen	21 %	50 %	45 %
Geplatzte Pollen	43 %	24 %	5 %
	16% Saccharose	16% Saccharose	16% Saccharose
	0,0075% H_3BO_3	0,005% H_3BO_3	0,0025% H_3BO_3
Gekeimte Pollen	63 %	94 %	47 %
Nicht gekeimte Pollen	35 %	3 %	3 %
Geplatzte Pollen	2 %	3 %	50 %

Tabelle 3.1: Optimierung eines Keimungsmediums für Maispollen

Durch schrittweise Modifikation eines Keimungsmediums nach Mascarenhas (1966) wurden die optimalen Saccharose- und Borsäure-Konzentrationen für Maispollen ermittelt. Gekeimte, nicht gekeimte und geplatzte Pollen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und die Keimungsraten ermittelt.

Neben Arten mit universell keimfähigen Pollen, wie z. B. Tabak, ist für einige Arten eine Abhängigkeit der Keimfähigkeit von Umgebungsfaktoren bekannt. Die Keimfähigkeit von Weizenpollen ist beispielsweise auf ein Zeitfenster von zwei h nach Sonnenaufgang

beschränkt (J. Kumlehn und S. Sprunck, persönliche Mitteilung). Um eine Abhängigkeit der Keimfähigkeit von Maispollen von der Tages- oder Jahreszeit zu untersuchen, wurden über einen Zeitraum von 12 Monaten Maispollen der Inzuchtlinie A188 zu unterschiedlichen Tageszeiten (zwischen 9.00 Uhr und 19.00 Uhr) frisch gesammelt. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen der Tages- oder Jahreszeit und der Keimfähigkeit der Pollen festgestellt werden. In allen Experimenten hatten mehr als 90% der Pollen in flüssigem sowie auf festem PGM etwa 16 h nach Keimungsbeginn lange und stabile Pollenschläuche ausgebildet, in denen Zytoplasmaströmung beobachtet werden konnte (Abb. 3.5B). Nach Lagerung von Maispollen für 24 h bei Raumtemperatur zeigte sich keine Verminderung der Keimfähigkeit. 48 h Trockenlagerung führt zu Keimungsraten von etwa 50%. Mit zunehmender Lagerungsdauer nahm die Keimfähigkeit dann rapide ab. Optisch hatte das Zytoplasma der vegetativen Zelle bei am Nachmittag gesammelten Pollen eine höhere Viskosität als bei Pollen, die am Vormittag gesammelt wurden. Zwischen 14.00 Uhr und 17.00 Uhr im Gewächshaus gesammelte Pollen erwiesen sich als am Besten geeignet zur biolistischen Transformation (siehe 3.5.1.), da weniger Pollen nach Beschuß platzten.

Um eine generelle Anwendbarkeit von PGM zur *in vitro* Keimung von Pollen verschiedener Spezies zu untersuchen, wurde Pollen von Gewächshauspflanzen der Arten *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Columnea oesterdiana*, *Nicotiana tabacum*, *Pennisetum americanum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Tradescantia sp.* und verschiedener Inzuchtlinien von *Zea mays* sowie einiger Pflanzenarten aus dem Botanischen Garten in Hamburg gesammelt (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* and *Vicia faba*). Zum Vergleich wurden die Pollen aller Arten auf PGM und dem von Mascarenhas (1966) beschriebenen Keimungsmedium aufgebracht. Die durchschnittlichen Keimungsraten von jeweils zehn Experimenten pro Art sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt, wobei jeweils die am häufigsten beobachtete Keimungsrate hervorgehoben ist. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden Keimungsraten von 70% bis 100% für Maispollen der Linien A188, AC3572C, B73, H99, Hi-II, Q2 und Tx232 sowie für Pollen von *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Columnea oesterdiana* (Abb. 3.5F), *Nicotiana tabacum* (Abb. 3.5E), *Pisum sativum*, *Vicia faba* und verschiedener Spezies von *Tradescantia* (*T. paludosa* (Abb. 3.5I), *T. spathacea* und *T. zebrina*) festgestellt. Pollen von *Pennisetum americanum*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum* zeigten Keimungsraten zwischen 50% und 80% (Tabelle 3.2). Pollen von Weizen platzten kurz nach Applikation auf beiden Medien, Pollen von Lilie und Reis keimten nicht.

Spezies	PGM	Mascarenhas
<i>Arachis hypogaea</i>	80 – 100%	10 – 50%
<i>Columnea oesterdiana</i>	95 – 100%	95 – 100%
<i>Nicotiana tabacum</i>	80 – 100%	80 – 100%
<i>Pennisetum americanum</i>	40 – 50%	20 – 30%
<i>Phaseolus vulgaris</i>	50 – 60%	30 – 40%
<i>Pisum sativum</i>	75 – 100%	70 – 80%
<i>Solanum lycopersicum</i>	50 – 80%	30 – 60%
<i>Solanum tuberosum</i>	50 – 80%	30 – 60%
<i>Tradescantia paludosa</i>	80 – 100%	80 – 100%
<i>Vicia faba</i>	90 – 100%	50 – 70%
<i>Zea mays</i>	80 – 100%	0 – 80%

Tabelle 3.2: Keimungsraten von Pollen verschiedener Arten auf PGM im Vergleich zu einem von Mascarenhas (1966) beschriebenen Keimungsmedium

Alle Pflanzenarten zeigten durchschnittlich höhere Keimungsraten auf PGM als auf dem Vergleichsmedium, ausgenommen *Tradescantia*. In wenigen Experimenten bildeten bis zu 80% der Maispollen stabile Pollenschläuche auf dem Vergleichsmedium aus. Diese Rate entspricht der niedrigsten beobachteten Keimungsrate auf PGM. Die angegebenen Werte entsprechen einem Durchschnitt von jeweils 10 Experimenten.

Im Vergleich zu dem von Mascarenhas beschriebenen Keimungsmedium für *Tradescantia* zeigten Pollen aller untersuchten Pflanzenarten höhere Keimungsraten auf PGM, ausgenommen *Tradescantia sp.*, welche auf beiden Medien sehr hohe Keimungsraten aufwies. Pollen von *Zea mays* wiesen in einzelnen Experimenten hohe Keimungsraten auf dem Vergleichsmedium auf, weitaus häufiger war ein sofortiges Platzen der Pollenkörner nach Rehydrierung zu beobachten. Pollen von Weizen, Lilie und Reis entwickelten auf dem Vergleichsmedium ebenfalls keine Pollenschläuche.

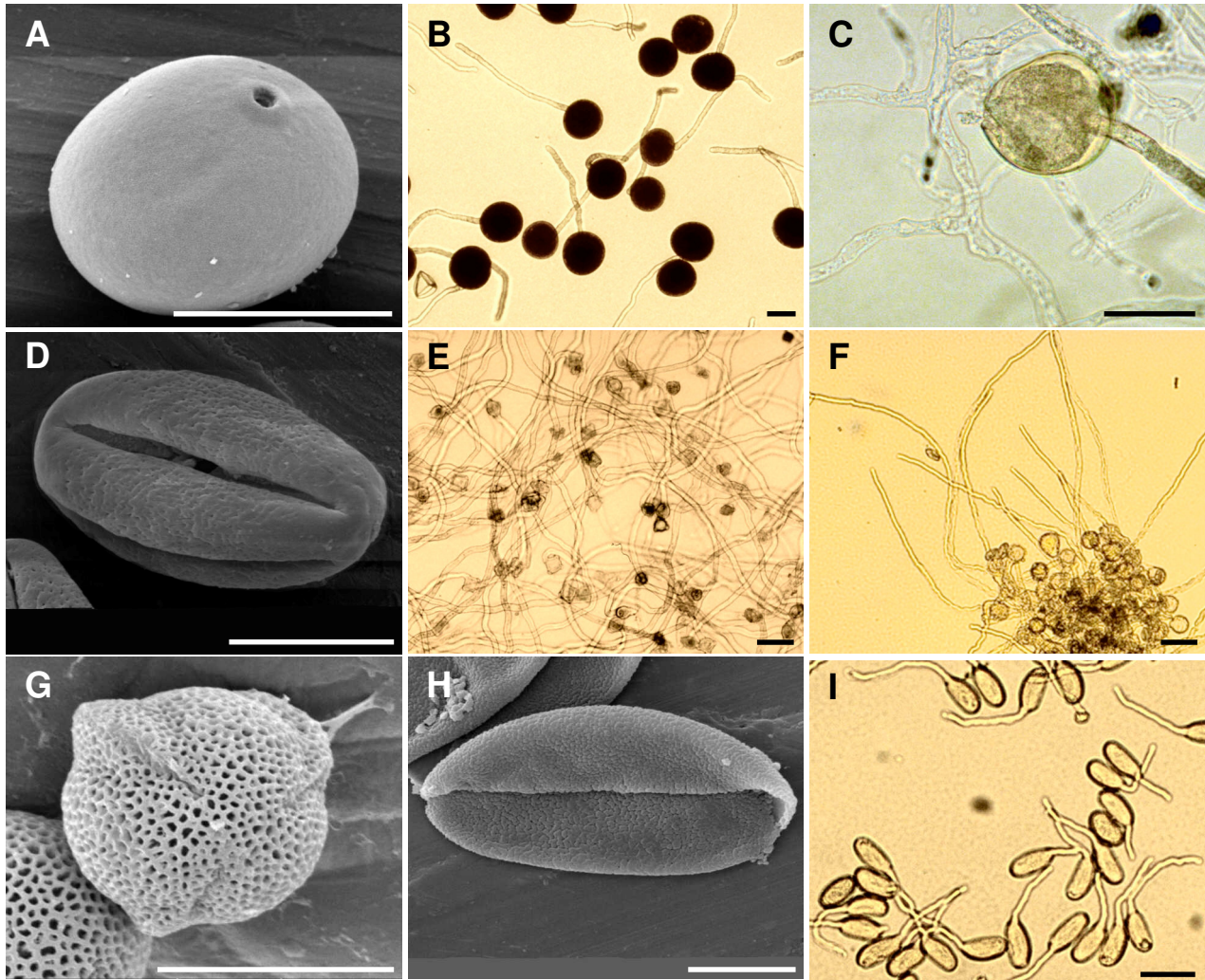


Abbildung 3.5: Keimfähigkeit von Pollen auf PGM

Pollen verschiedener Pflanzenarten (siehe Tabelle 3.2) zeigten Keimungsraten zwischen 50% und 100% nach Inkubation auf festem und in flüssigem PGM (Pollen Keimungsmedium) bei Raumtemperatur. Gezeigt ist die Pollenkeimung auf festem Medium. **A:** Raster Elektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines ungekeimten Maispollens; **B:** Maispollen etwa zwei Stunden nach Keimungsbeginn; **C:** Bei einer CaCl_2 -Konzentration von 100 mM im Medium zeigte sich eine Verzweigung der Pollenschläuche; **D:** Tabakpollen im REM und **E:** etwa 16 h nach Keimungsbeginn; **F:** Pollen von *Columnea oesterdiana* etwa 16 h nach Keimungsbeginn; **G:** REM-Aufnahme eines *Arabidopsis*-Pollens; **H:** Pollen von *Tradescantia paludosa* im REM und **I:** etwa eine Stunde nach Keimungsbeginn. Balken in A, B, C, E, F und I = 50 μm ; Balken in D, G und H = 10 μm

3.5. Transiente Expressionsanalysen des *ZmMADS2*-Promotors in Pollen

Die Aktivität des *ZmMADS2*-Promotors in reifen Pollen und während des Pollenschlauch-Wachstums wurde mit Hilfe der *Luciferase* (*Luc*) und β -*Glucoronidase* (*GUS*) Reportergene in transient transformierten Pollen von Mais und Tabak analysiert.

Zur Etablierung eines Standard-Protokolls für die transiente Transformation von Maispollen wurden zunächst die Versuchsbedingungen optimiert. Hierzu wurde die Aktivität des *Luciferase*-Reportergens unter der Kontrolle des stark exprimierten *Ubiquitin*-Promotors aus Mais nach Beschuß bei 1350, 1550, 1800 und 2000 psi bestimmt. Die höchste Aktivität konnte nach Transformation bei Gasdrucken von 1800 und 2000 psi gemessen werden. Einzelne Meßwerte nach Beschuß bei niedrigeren Gasdrucken waren nicht reproduzierbar. Da die hohen Druckwerte von 1800 und 2000 psi nur bei voller Gasflasche erreicht werden konnten, wurde durch schrittweise Annäherung des Makrocarriers an die Berstscheibe der optimale Abstand von 1,8 cm ermittelt. Die biolistische Transformation von Maispollen mit den Konstrukten *pUbi::Luc*, *promless::Luc*, *pUbi::GUS* and *pZmMADS2::GUS* und den *ZmMADS2*-Promotor Deletionskonstrukten pDNS-5 bis pDNS-10 (siehe Abb. 2.1) wurden bei einem Druck von 1500 psi unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Tabakpollen und Blattspitzen wurden bei 1350 psi transformiert.

3.5.1. Expressionsanalysen mit dem *Luciferase* Reportergen

Die höchste *Luciferase*-Aktivität konnte nach Transformation mit pDNS-6b in Pollen von Mais und Tabak gemessen werden. Im Vergleich zu *pUbi::Luc* betrug die *Luciferase* Aktivität in Maispollen nach Beschuß mit pDNS-6b 39%. Abb. 3.6 zeigt die Pollen-spezifische Expression des *ZmMADS2*-Promotors. Im Gegensatz zum *Ubiquitin*-Promotor, der sowohl in Blättern als auch in Pollen von Mais exprimiert ist, nicht aber in Tabakspollen, ist der *ZmMADS2*-Promotor spezifisch im Pollen beider Pflanzen aktiv. Die im Tabak gemessenen Werte betragen durchschnittlich das dreißigfache der Meßwerte im Mais. Eine Ko-Transformation mit *pUbi::GUS* konnte nicht zur Standardisierung verwendet werden, da die gemessene Chemolumineszenz von β -*Glucoronidase* nicht mit den *Luciferase* Meßwerten korrelierte. Da der *Ubiquitin*-Promotor in Pollen von Tabak nicht exprimiert wird, wurde die Expressionsstärke der Deletionskonstrukte im Verhältnis zu pDNS-6b gemessen. Abhängig

von der Transformationseffizienz der einzelnen Versuche, wiesen die Meßwerte erhebliche Unterschiede auf. Die Relation der Werte zueinander innerhalb eines Ansatzes war jedoch immer gleich, so daß in Abb. 3.7 relative Expressionswerte angegeben sind. Aus diesem Grund wurden in fünf unabhängigen Experimenten jeweils sechs Platten mit keimenden Pollen pro Konstrukt transformiert. Als Positiv-Kontrolle wurden in jedem Experiment jeweils vier Proben mit *pUbi::Luc* und als Negativ-Kontrolle zwei Proben mit promless *Luc* transformiert.

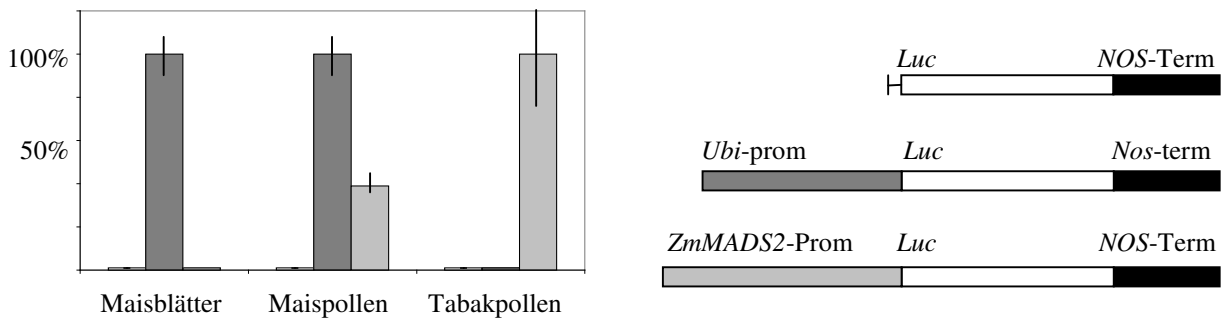


Abb. 3.6: Expression des *ZmMADS2*-Promotors in Pollen und Blättern von Mais und Tabak im Vergleich zur Expression des *Ubiquitin*-Promotors aus Mais

Reife Pollen von Mais und Tabak sowie junge Blätter von Mais wurden jeweils mit einem promotorlosen Konstrukt, *pUbi::Luc* und *pZmMADS2::Luc* transformiert (rechts). Links ist die Pollenspezifische Expression des *ZmMADS2*-Promotors im Vergleich zum *Ubiquitin*-Promotor dargestellt. Die relative Expressionsstärke des *ZmMADS2*-Promotors im Vergleich zu *Ubiquitin* beträgt hier durchschnittlich 39%. Die Meßwerte der Luciferase Aktivität waren in Tabakpollen durchschnittlich 30x so hoch wie in Maispollen.

Das Konstrukt *pDNS-6b* enthält 1038 bp des *ZmMADS2*-Promotors sowie den gesamten 5'UTR-Bereich. Im Vergleich zu den weiteren Deletionskonstrukten war die Expression von *pDNS-6b* in allen Transformationsexperimenten am stärksten. In Maispollen war die gemessene Aktivität von *pDNS-5*, *pDNS-6* und *pDNS-7* mit durchschnittlich 80% bis 95% etwas geringer als für *pDNS-6b*. In einzelnen Experimenten wurden Werte zwischen 50% und 100% gemessen. Die Expressionsstärke von *pDNS-8* betrug 35% bis 70% relativ zu *pDNS-6b* (Tabelle 3.2 und Abb. 3.4). Nach Beschuß mit den Konstrukten *pDNS-9* und *pDNS-10* konnte eine Luciferase Aktivität festgestellt werden, die nur geringfügig über dem mit dem promotorlosen Konstrukt ermittelten Hintergrund lag.

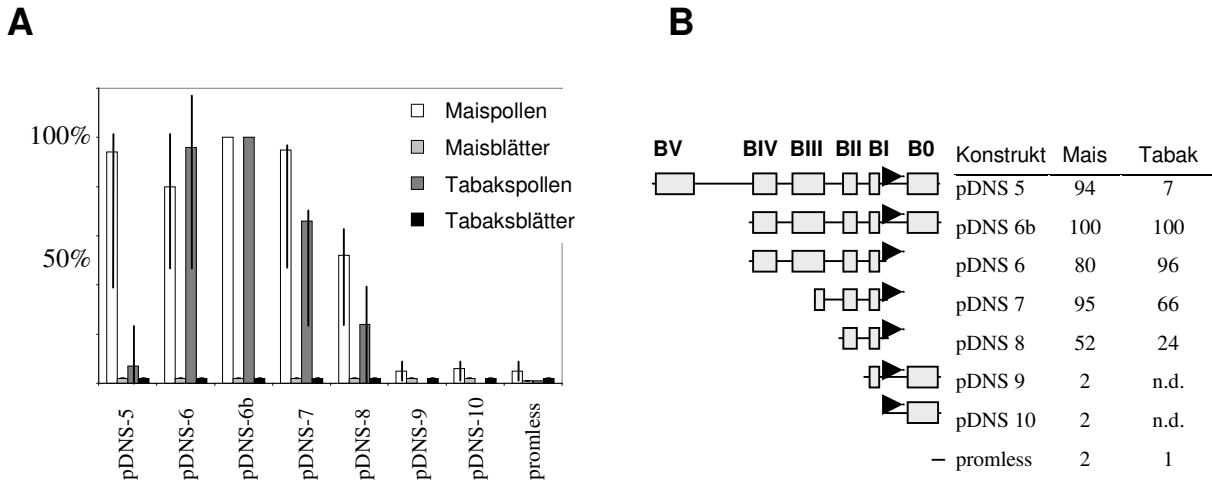


Abbildung 3.7: Expression von Luciferase unter der Kontrolle von Deletionen des *ZmMADS2*-Promotors in Pollen und Blättern von Mais und Tabak

A: Aktivität von Luciferase in Pollen und Blättern von Mais und Tabak nach transienter Transformation mit *ZmMADS2*-Promotor Deletionskonstrukten. Die Luciferase-Aktivität ist relativ zu dem am stärksten exprimierten Konstrukt pDNS-6b angegeben. Die Höhe der Säulen zeigt den Durchschnitt aus jeweils 10 Experimenten an, vertikale Linien geben den Bereich der tatsächlichen Meßwerte an. **B:** Boxen und putative *cis*-Elemente innerhalb der verwendeten Deletionskonstrukte (siehe Abb.3.5). Rechts ist die relative Expression der Konstrukte in Pollen von Mais und Tabak als Durchschnittswert aus jeweils 10 Experimenten angegeben. N. d.: nicht determiniert.

In Tabakspollen lag die Expression von pDNS-6 bei durchschnittlich 96% und in einzelnen Experimenten bis zu 20% über derjenigen von pDNS-6b. Die Expressionsstärke von pDNS-7 reichte von 30% bis 70% mit einem Durchschnitt von 66%, diejenige von pDNS-8 lag bei durchschnittlich 24% in einem Bereich zwischen 10% und 50%. Im Gegensatz zu Mais lag die Expression von pDNS-5, dem Konstrukt mit dem größten Promotorfragment, in Tabakspollen zwischen 3% und 25% (durchschnittlich 7%). Aus Zeitgründen wurde der Beschuß von Tabakspollen mit den Konstrukten pDNS-9 und pDNS-10 nicht häufig genug wiederholt, um die Expressionsstärke bestimmen zu können. In einzelnen Experimenten lag diese im Bereich von pDNS-8. In beiden Pflanzen konnte nach Transformation mit den *ZmMADS2*-Promotor Deletionskonstrukten keine Luciferase Aktivität oberhalb des Hintergrundwertes in Blättern festgestellt werden (Abb. 3.7).

Anhand dieser Daten konnte die Pollenspezifität des *ZmMADS2*-Promotors untermauert, sowie der hierfür verantwortliche Sequenzabschnitt eingegrenzt werden. Cis-Elemente, die eine spezifische Expression von *ZmMADS2* im Pollen dirigieren, befinden sich hauptsächlich innerhalb der Box II (siehe Abb. 3.4A) zwischen den Positionen –302 und –210. Interessant

ist in diesem Zusammenhang, daß die Box II als einzige keine repetitiven Elemente enthält. Weitere Cis-Elemente, die die Expressionsstärke modulieren, sind in der Box III zwischen den Positionen -497 und -419 lokalisiert.

3.5.2. Transiente Expression von β -Glucoronidase in Pollen von Mais und Tabak

Analog zur Expressionsanalyse mit dem *Luciferase* Reporter gen wurden Pollen von Mais und Tabak mit dem β -Glucoronidase Reporter konstrukt (p*Ubi::GUS* und p*ZmMADS2::Gus*) transformiert. Die Expressionsstärke des *ZmMADS2*-Promotors in transienten Experimenten war relativ schwach in Maispollen (Abb. 3.8A bis 3.8D). Eine Blaufärbung war nur bei wenigen Pollen zu beobachten. Nach Transformation mit p*ZmMADS2::Gus* zeigten Tabakspollen hingegen eine intensive Färbung innerhalb des Pollenschlauchs. (Abb. 3.8E und 3.8F). Analysen in Pollen beider Arten 16 h nach Keimungsbeginn zeigten β -Glucoronidase Aktivität innerhalb des Zytoplasmas der vegetativen Zelle. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit p*ZmMADS2::GUS* zeigten Maispollen nach Transformation mit p*Ubi::GUS* neben der β -Glucoronidase-Aktivität im Pollenschlauch auch eine Blaufärbung im Pollenkorn (Abb. 3.8A und 3.8B). In Abb. 3.8B wird neben der Färbung auch die schwer durchdringende dicke Exine des Maispollens veranschaulicht. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der *ZmMADS2*-Promotor während des Pollenschlauchwachstums aktiv ist. Zusätzlich wurde gezeigt, daß der 5'UTR von *ZmMADS2* für den Transport des Transkripts in die Pollenschlauchspitze verantwortlich ist.

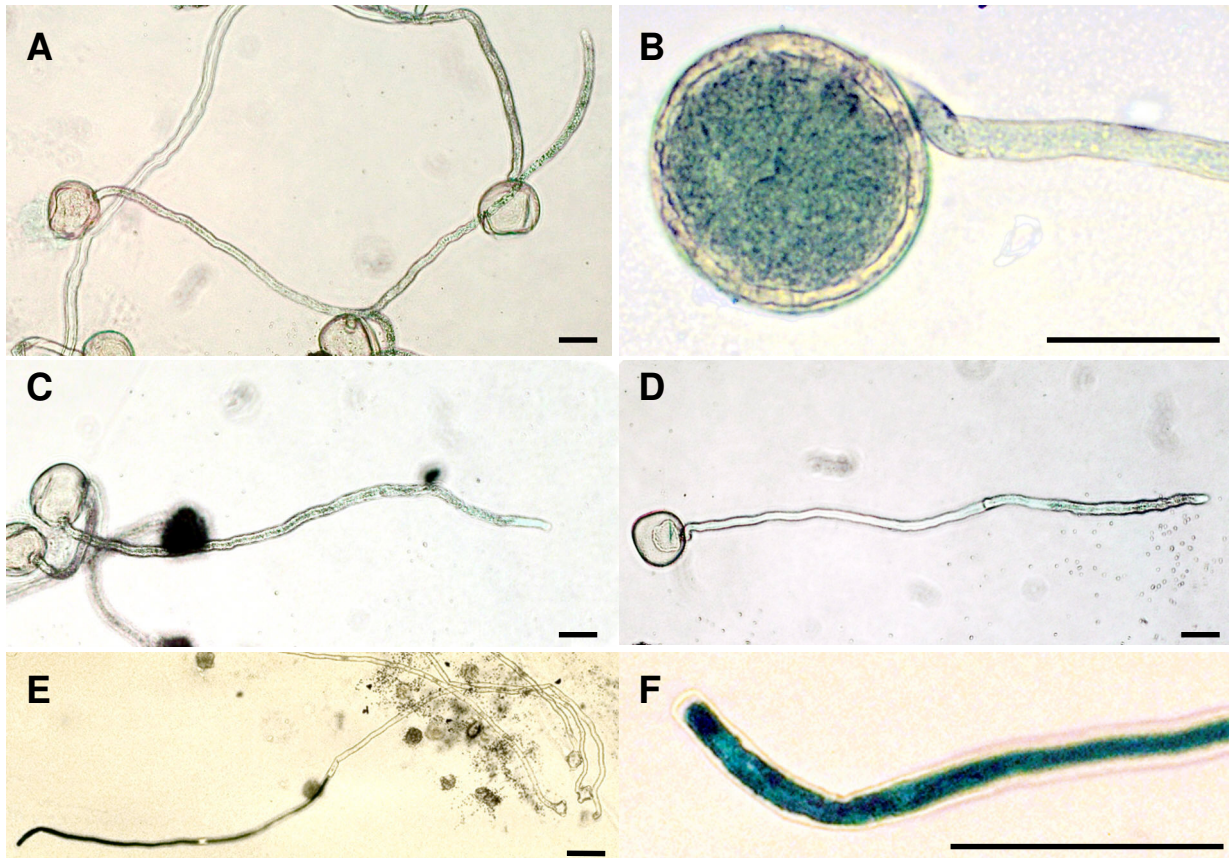


Abbildung 3.8: Nachweis von β -Glucuronidase (*GUS*) Aktivität in transient transformierten Pollen

Pollen von Mais und Tabak wurden mit *pUbi::GUS* oder *pZmMADS2::GUS* biolistisch transformiert und über Nacht auf festem PGM inkubiert. Die histochemische Lokalisierung des Reportergens erfolgte mit X-Gluc nach Inkubation über Nacht bei 37°C.

A: Maispollen etwa 16 h und **B:** etwa drei Stunden nach Transformation mit *pUbi::GUS*. Das Reportergen ist sowohl im Pollenschlauch als auch im Pollenkorn nachweisbar. **C:** Maispollen etwa zwei Stunden nach Transformation mit *pZmMADS2::GUS*. *GUS*-Aktivität ist ausschließlich im Pollenschlauch detektierbar. **D:** Etwa 16 h nach Keimungsbeginn ist der *ZmMADS2*-Promotor im wachsenden Pollenschlauch aktiv. **E:** Tabakpollen etwa 16 h nach Transformation mit *pZmMADS2::GUS*. Wie im Maispollen, ist der *ZmMADS2*-Promotor während des Pollenschlauch-Wachstums aktiv. Intensive Signale des Reportergens sind im Zytoplasma der vegetativen Zelle detektierbar. **F:** Detail der Spitze des Pollenschlauchs aus E. Balken = 50µm.

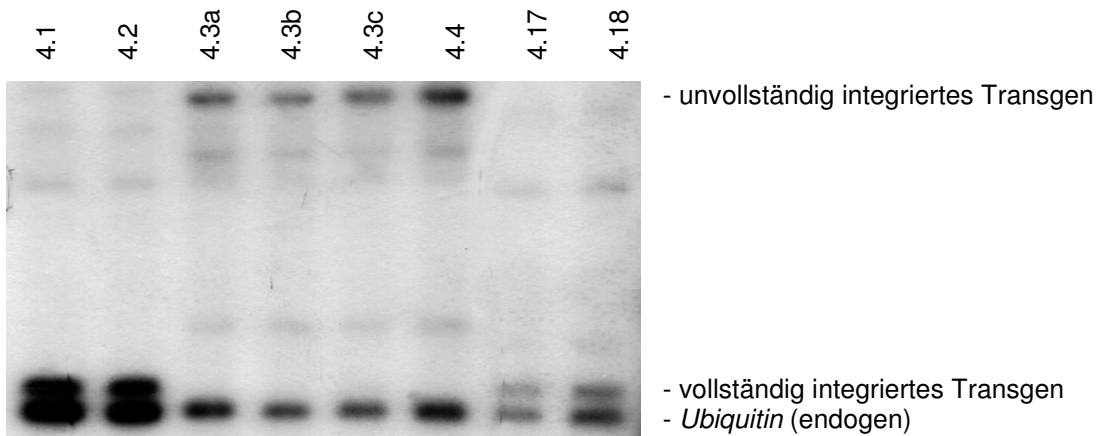
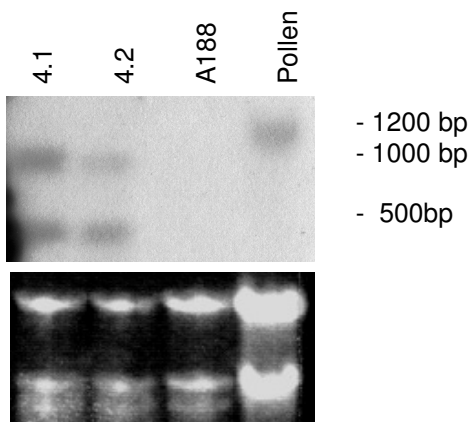
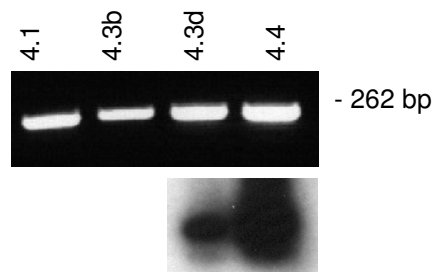
3.6. Funktionsanalyse von *ZmMADS2* durch die Herstellung von Antisense-Pflanzen

Zur Untersuchung der Funktion des späten Pollengens *ZmMADS2* wurden mit der Antisense-Technik sog. "knock-out" Pflanzen generiert. Von regenerierten Pflanzen aus 1783 beschossenen Embryonen der Inzuchtlinie A188 erwiesen sich 18 Linien als transgen nach zweimaligem Basta® Spray-Test. Neun Pflanzen aus sechs Linien hatten das Transgen integriert, wobei vier Linien eine vollständige und zwei Linien eine unvollständige Integration zeigten. Abb. 3.9A zeigt den Nachweis der Integration aller erhaltenen T0-Linien im Southern Blot. Hierbei wurde ein Teil des *Ubiquitin*-Promotors zwischen den Primern UbiC und UbiR1 verwendet. Bei den Pflanzen DNS-4.1, DNS-4.2, DNS-4.17 und DNS-4.18 erscheint das Signal des vollständig integrierten Konstrukts oberhalb des endogenen Signals. Bei Pflanzen der Linien DNS-4.3 und DNS-4.4 ist ein Signal im höheren Fragmentlängen-Bereich detektierbar. Die Expression von *ZmMADS2*-Antisense cDNA wurde für die vier Linien mit dem vollständig integrierten Konstrukt im Northern Blot nachgewiesen (Abb. 3.9B). Es wurde RNA aus Blättern eingesetzt, da *ZmMADS2* in diesem Gewebe nicht exprimiert ist (siehe auch Abb. 3.1 und 3.9B, Spur A188). Zwei transgene Pflanzen, DNS-4.2 und DNS-4.17, zeigten einen Phänotyp, der dem Wildtyp entsprach. Die beiden anderen transgenen Pflanzen, DNS-4.1 und DNS-4.18, waren kleinwüchsig (Wuchshöhe etwa 50 cm), männlich und weiblich steril.

	Beschossene Embryonen	Basta®-resistente Regenerate	Transgene Linien	Effizienz
Okt. – Dez. 1999	896	5	0	0%
Jan./Feb. 2000	887	15	6	0,7%

Tabelle 3.3: Effizienz der biolistischen Transformation von unreifen Maisembryonen mit pDNS-4

Insgesamt 1783 unreife Embryonen der *Zea mays* Inzuchtlinie A188 wurden mit einem *ZmMADS2*-Antisense Konstrukt (pDNS-4) zwischen Oktober 1999 und Februar 2000 transformiert. Aus 887 im Januar und Februar 2000 beschossenen Embryonen konnten 15 Basta®-resistente Linien regeneriert werden. Hiervon hatten vier Linien das Transgen vollständig und zwei Linien unvollständig integriert.

A**B****C****Abbildung 3.9: Analyse der *ZmMADS2*-Antisense Pflanzen**

A: Southern Blot von acht Basta-resistenten Maispflanzen, die das Antisense-Konstrukt pDNS-4 integriert haben. Genomische DNA wurde mit *Xho*I und *Hae*III verdaut. Mit dieser Enzymkombination wurde das *pUbi::ZmMADS2-AS*-Fragment fast komplett herausgeschnitten. Nach Hybridisierung mit einer *Ubiquitin*-Promotor spezifischen Sonde war neben dem endogenen Ubiquitin-Signal ein Fragment von 1490 bp Größe des Antisense-Konstrukts in DNA der Pflanzen 4.1, 4.2, 4.17 und 4.18 detektierbar. Bei den Pflanzen der Linien 4.3 und 4.4 erschienen Signale bei höheren Fragmentgrößen, was auf eine unvollständige Integration hindeutet. Die Pflanzen 4.2 und 4.17 zeigten einen WT-Phänotyp, die übrigen Pflanzen waren männlich und weiblich steril. Die Pflanzen 4.1 und 4.18 erreichten außerdem nur eine Wuchshöhe von etwa 50 cm. **B:** In Northern Blot Analysen konnten Doppelsignale in RNA aus Blattspitzen der Pflanzen 4.1 und 4.2 detektiert werden, außerdem schwache Signale bei 4.17 und 4.18 (nicht gezeigt). In RNA aus reifen Maispollen erschien das Signal des endogenen Transkripts bei 1,2 kbp Größe. **C:** RT-PCR mit RNA der Pflanzen 4.1, 4.3b, 4.3c und 4.4. Die Amplikons wurden durch die Verwendung der Primer UbiD und Ex3 unten hergestellt und entweder Sequenziert (4.1 und 4.3b) oder geblottet (4.3d und 4.4).

Da eine Expression des unvollständig integrierten Transgens in den Linien DNS-4.3 und DNS-4.4 im Northern Blot nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Blattspitzen dieser Pflanzen durchgeführt. Mit den hierzu eingesetzten Primern UbiD und Ex3 unten konnte ein Teil des *Ubiquitin*-Promotors und der C-Terminus des *ZmMADS2*-Gens aus RNA aller untersuchten Pflanzen amplifiziert werden (Abb. 3.9C). Zum Nachweis der Spezifität der PCR-Produkte wurden zwei der Amplikons (DNS-4.1 und DNS-4.3b) aus dem Gel isoliert und sequenziert. Zwei weitere Banden wurden mittels Southern Blotting auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer *ZmMADS2* C-Terminus-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Sequenzierung der beiden Amplikons aus DNS4.1 und DNS4.3b zeigte, daß die Transkripte aus beiden Pflanzen zu 100% homolog waren. Es konnte so gezeigt werden, daß auch die Pflanzen DNS-4.3a bis d und DNS-4.4 das Antisense-Transkript synthetisierten und prozessierten, da ein "Leader-Intron" herausgespleißt wurde. Die Pflanzen DNS-4.3a, b, c, d und DNS-4.4 zeigten eine normale Wuchshöhe und waren männlich und weiblich steril. Weibliche Sterilität dieser Antisense-Pflanzen äußerte sich durch ein Ausbleiben des Kornansatzes nach Bestäubung mit fertilen WT-Pollen. An der Pflanze DNS-4.17 entwickelte sich lediglich ein Korn. Nachkommen aus Selbstbestäubung der T1-Generation entsprachen dem Wildtyp. Da zum Zeitpunkt der Blüte auch Probleme beim Bestäuben von WT-Kolben auftraten, ist die Ursache für die weibliche Sterilität vermutlich durch exogene Faktoren begründet.

Alle sieben männlich sterilen Pflanzen zeigten im Gegensatz zu Kontrollpflanzen einen Arrest in der Entwicklung der Blütenstände einen Tag vor Anthese. Die männlichen Blüten blieben über mehrere Wochen geschlossen, Austrocknung und Aufspringen der Antheren, sowie eine Verlängerung der Filamente wie beim Wildtyp, waren nicht zu beobachten. Abb. 3.10A zeigt den Blütenstand einer Antisense-Pflanze (DNS-4.3b) im Vergleich zum Wildtyp (A188, Abb. 3.10B). In Abb. 3.11C sind geschlossene männliche Infloreszenzen des Wildtyps (oben) und einer Antisense-Pflanze (unten) dargestellt. Es ist kein Unterschied erkennbar. Mais-Ähren enthalten zwei Blüten, die einen unterschiedlichen Entwicklungsstand zeigen. Im Gegensatz zum Wildtyp, sind die beiden Blüten innerhalb der AS-Infloreszenz gleich weit entwickelt (Abb. 3.10D). Die Entwicklung der Antheren beider Blüten ist einen Tag vor der Anthese arretiert. Die Entwicklung von Antheren über drei d bis zur Anthese (mittleres Stadium 8, spätes Stadium 8 und Stadium 9) ist in Abb. 3.10E gezeigt. Die Antheren der männlich sterilen "knock-out" Pflanzen ist im späten Stadium 8 arretiert (Abb. 3.10E rechts). Die Antherenentwicklung bei Antisense-Pflanzen ist also kurz vor Öffnung der Pore arretiert, während WT-Antheren aufspringen und reife Pollen entlassen. Die Entwicklung der

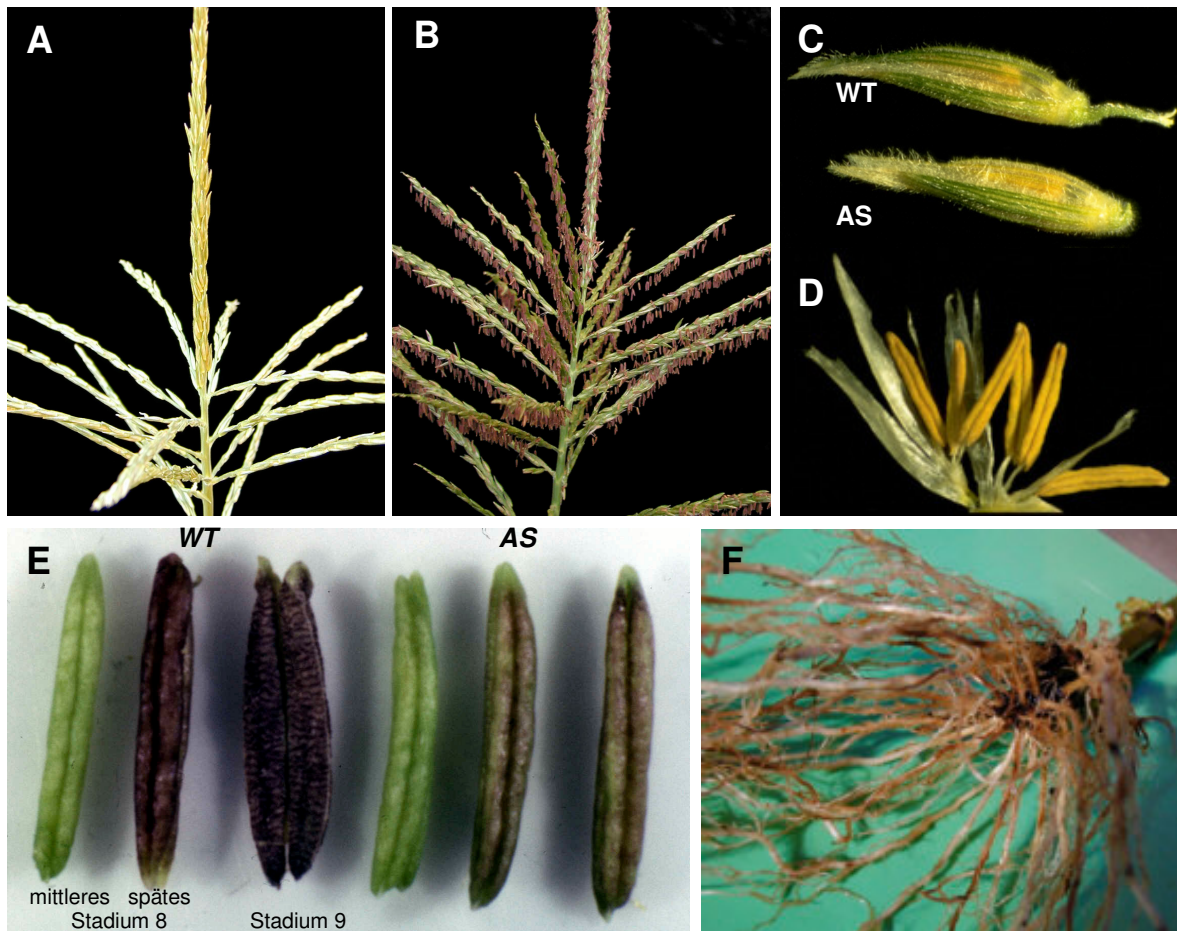


Abb. 3.10: Phänotyp von *ZmMADS2*-Antisense Pflanzen

Transgene Pflanzen, die Antisense-Kopien von *ZmMADS2* enthielten, waren männlich steril. Die Entwicklung der männlichen Blütenstände und der Antheren war einen Tag vor der Anthese arretiert. **A:** männlicher Blütenstand einer Antisense- (DNS-3b) und **B:** einer WT-Pflanze im spätesten Stadium der Entwicklung. Im Wildtyp öffnen sich die Blüten und die Antheren fallen an den verlängerten Filamenten heraus. **C:** Blüten der Antisense-Pflanzen zeigen keinen Unterschied zu geschlossenen Blüten des Wildtyps. **D:** Blütenpaar einer Antisense-Pflanze (DNS-3c) im spätesten Stadium der Entwicklung. Die obere und untere Blüte sind im gleichen Entwicklungsstand arretiert. Die Blüte wurde für die Aufnahme geöffnet. **E:** Entwicklung der Antheren von Antisense- und WT-Pflanzen zwei (mittleres Stadium 8), einen (spätes Stadium 8) Tag vor und während der Anthese (von links nach rechts). AS-Antheren sind im späten Stadium 8 der Entwicklung arretiert, während sich bei WT-Antheren die anteriore Pore öffnet um reife Pollen zu entlassen. **F:** Primäre und Lateralwurzeln von AS-Pflanzen entsprechen dem Wildtyp.

transgenen Pollen korrespondiert mit dem Block der Antherenentwicklung einen Tag vor Anthese. Pollen aus transgenen Pflanzen erscheinen noch teilweise vakuolisiert, im Zytoplasma sind aber bereits viele Stärke Granula erkennbar (Abb. 3.11A). Die Kerne der Spermzellen sind rund (Abb. 3.11A und 3.11B). Reife Pollen aus Wildtyp-Pflanzen enthalten keine Vakuole und die Kerne der Spermzellen erscheinen sichelförmig (Abb. 3.11C und 3.11D).

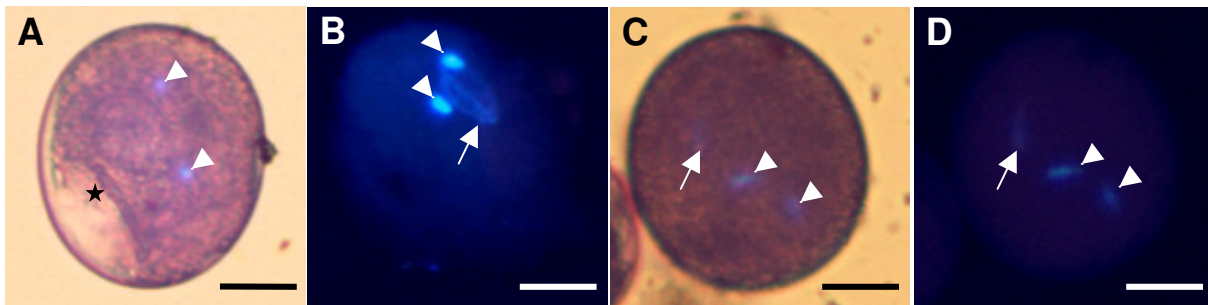


Abbildung 3.11: Pollen von *ZmMADS2*-Antisense-Pflanzen zeigen einen Entwicklungsstopp im späten Stadium 8 der Antherenentwicklung.

A: und **B:** Pollen von Antisense-Pflanzen, in **A** ist die noch vorhandene Vakuole zu erkennen (Stern). Die Kerne der Sperm-Zellen erscheinen rund (Pfeilspitzen). Der vegetative Kern ist mit einem Pfeil markiert. **C:** und **D:** reife, rehydrierte Pollen einer WT-Pflanze sind nicht mehr vakuolisiert. Die Kerne der Sperm-Zellen erscheinen sichelförmig. Die DNA in den Pollen wurde mit DAPI gefärbt und die Exine mit Orcein-Essigsäure zur Kontrastierung.

3.7. *ZmMADS2* ist in Kernen der Anthere lokalisiert

Zur Lokalisierung von *ZmMADS2* in Geweben von *Zea mays* wurden unreife Embryonen mit den Konstrukten pDNS-1 und pDNS-3 transformiert. Diese Konstrukte enthalten ein *ZmMADS2*-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors (siehe 2.8.6). Aus 728 mit pDNS-1 transformierten Embryonen entwickelten sich 12 Basta®-resistente Pflanzen. Genomische DNA dieser Pflanzen wurde mittels Southern Blotting analysiert. Die Pflanzen 1.8 und 1.10 zeigten eine vollständige Integration des Konstrukts (Abb. 3.12). Es konnten keine Pflanzen regeneriert werden, die pDNS-3 (mit Intron 1) integrierten.

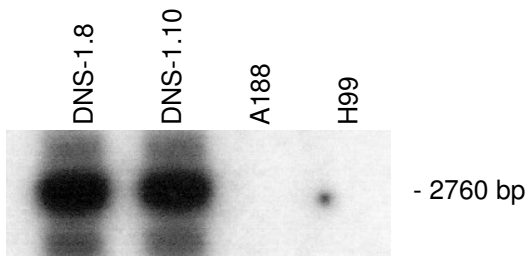


Abb. 3.12: Molekulare Analyse transgener Pflanzen mit dem ZmMADS2-GFP Fusionsprotein

Aus 728 unreifen Maisembryonen, die mit dem ZmMADS2-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors (pDNS-1) transformiert wurden, konnten 10 Basta®-resistente Pflanzen regeneriert werden. Mit der Enzymkombination *Xba*I und *Xho*I wurde das gesamte Konstrukt aus genomischer DNA ausgeschnitten. Nach Hybridisierung mit einer Sonde, die einen Teil des C-Terminus von *ZmMADS2* und einen Teil des *GFP* zwischen den Primern GFP for und GFP rev3 enthält, konnte die vollständige Integration des Konstrukts in zwei Pflanzen (DNS-1.8 und DNS-1.10) nachgewiesen werden. Da in diesem Ansatz Embryonen von Hybridpflanzen verwendet wurden, ist ebenfalls genomische DNA der Elter-Inzuchtlinien A188 und H99 aufgetragen.

Die Lokalisierung des ZmMADS2-GFP Fusionsproteins wurde mikroskopisch unter UV-Licht visualisiert. Aufgrund der starken Autofluoreszenz der Pollenwand, konnte kein Signal innerhalb des reifen Pollenkorns detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Innerhalb von *in vitro* gekeimten Pollen wurde ebenfalls kein Fusionsprotein in transgenen Linien beobachtet. Dieses Ergebnis konnte durch transiente Transformation von Maispollen mit pDNS-1 und pDNS-3 bestätigt werden. Nach Keimung von Maispollen auf weiblichen Blüten war aufgrund von hoher Autofluoreszenz ebenfalls kein Signal detektierbar. Da GFP-Fluoreszenz generell sehr schwach erscheint, werden spezifische Signale häufig durch Autofluoreszenzsignale, vorwiegend von Zellwänden, überstrahlt. Die starke rote Fluoreszenz von Chlorophyll bei Verwendung eines 510 nm Filters erschwert zusätzlich die Detektion spezifischer GFP-Signale.

Zur Visualisierung des Fusionsproteins in Geweben der Anthere wurden Quer- und Längsschnitte von Antheren verschiedener Entwicklungsstadien unter UV-Licht beobachtet. In WT-Antheren (A188) sowie in Antheren der transgenen Pflanzen DNS1.8 und DNS1.10 verschiedener Entwicklungsstadien bis zum frühen Stadium 8 konnten keine Signale detektiert werden.

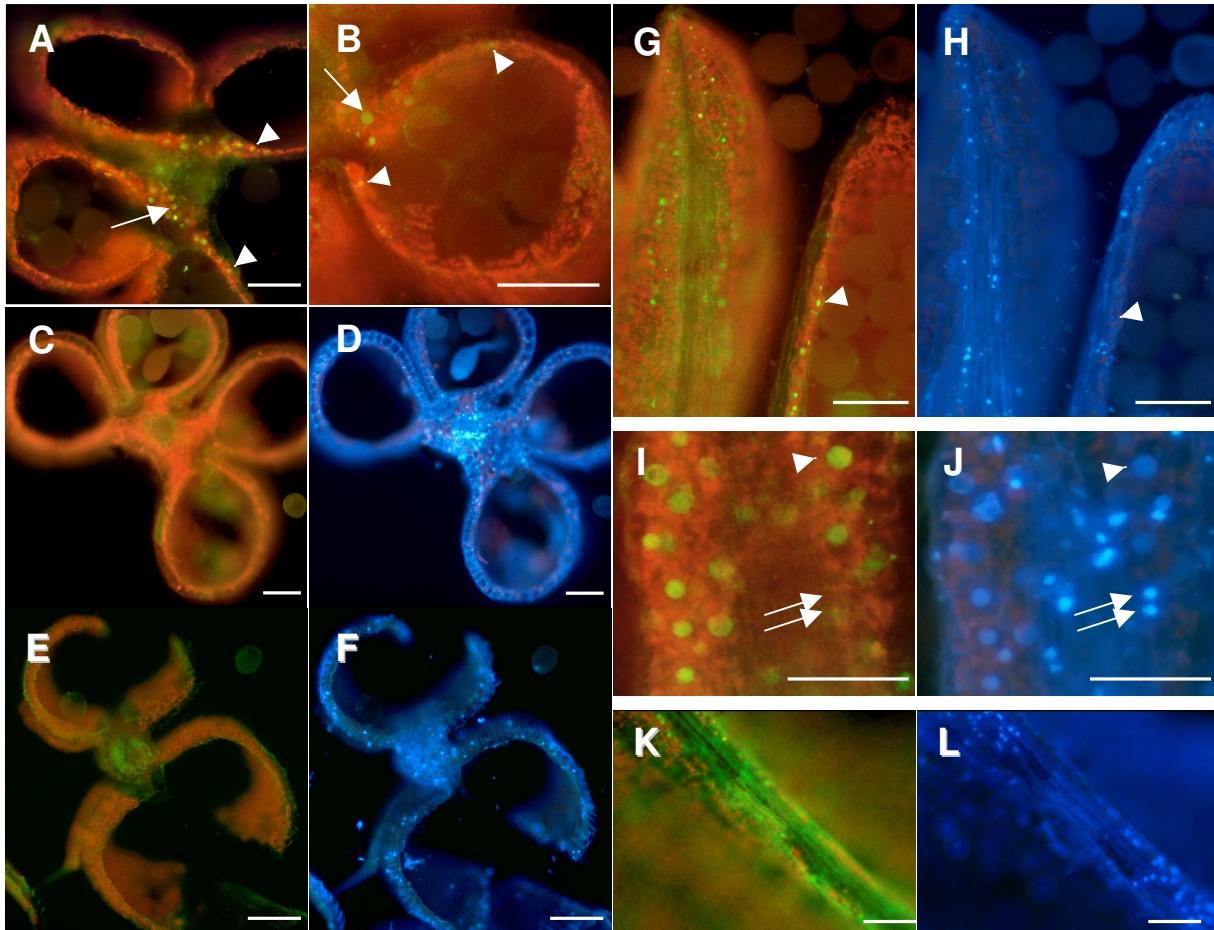


Abbildung 3.13: ZmMADS2-GFP Expression in Geweben der Anthere 1 d vor Anthese

A: Querschnitt einer Anthere einer transgenen Maispflanze im späten Stadium 8 der Entwicklung. Das GFP-Fusionsprotein wird unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors inklusive 5'UTR in Kernen von Zellen des Endotheciums (Pfeilspitzen) und des Konnektivs (Pfeil) exprimiert. **B:** Detailaufnahme einer Antherenkammer; der Pfeil zeigt auf einen Kern im Konnektiv und die Pfeilspitzen auf Kerne des Endotheciums. **C:** In einer Wildtyp-Anthere des vergleichbaren Entwicklungsstadiums erscheint kein Fluoreszenzsignal. **D:** DAPI-Färbung der Anthere in C um Kerne sichtbar zu machen. **E:** Querschnitt durch eine aufgesprungene Anthere der transgenen Maispflanze in A. Das Fusionsprotein ist nicht mehr detektierbar. Zellwände und epidermale Furchen autofluoreszieren. **F:** DAPI-Färbung von E. **G:** und **H:** Längsschnitt einer Anthere wie in A und B. Signale des Fusionsproteins erscheinen über die gesamte Länge verteilt. Die Expression ist nicht auf Zellen im Bereich der anterioren Pore (Pfeil) beschränkt. Je stärker das GFP-Signal in einem individuellen Kern erscheint, desto schwächer ist die Fluoreszenz bei DAPI-Färbung. **I:** Detailaufnahme des Konnektivs der Anthere in G; **J:** DAPI-Färbung von I. Auch hier nimmt die Signalstärke bei DAPI-Färbung mit zunehmender Intensität des GFP-Signals ab. Die Pfeilspitzen zeigen auf einen Kern mit intensivem GFP- und schwachem DAPI-Signal, die Pfeile markieren Kerne, in denen kein Fusionsprotein detektiert werden kann und die eine intensive Anfärbung der DNA durch DAPI zeigen. **K:** und **L:** Intermikrosporangien-Streifen einer transgenen Anthere. Während ZmMADS-GFP im Endothecium exprimiert ist, ist kein Signal in Stomium und Septum detektierbar. Balken = 100 μm

In Antheren des mittleren Stadiums 8 konnte das Fusionsprotein in Zellkernen des Endotheciums und des Konnektivs beobachtet werden, die Signalstärke nahm im späten Stadium 8 deutlich an Intensität zu (Abb. 3.13A und 3.13B). In diesem Stadium ist das Tapetum vollständig degeneriert, Stomium und Septum sind noch mit dem Konnektiv verbunden. Abb. 3.13C und 3.13D zeigen Querschnitte von WT-Antheren dieses Stadiums, in deren Zellkernen deutliche DAPI, aber keine GFP-Signale beobachtet werden können. Anhand der Längsschnitte ist deutlich zu erkennen, daß das ZmMADS2-GFP Fusionsprotein nicht auf den Bereich an der Antherenspitze beschränkt ist, der sich beim Aufspringen öffnet (Abb. 3.13G und 3.13H). In Zellen der Epidermis, des Stomiums, des Septums sowie innerhalb des Filaments waren keine Signale detektierbar (Abb. 3.13K und 3.13L). Auch hier sind GFP-Signale nur in Zellen des Endotheciums und des Konnektivs zu beobachten. Eine Untersuchung von Primär- und Lateralwurzeln von jungen Maispflanzen zeigte neben starker Autofluoreszenz der Leitgewebe keine Signale des ZmMADS2-GFP Fusionsproteins. Bei der Öffnung der Antherenkammern nach der Anthese sind keine GFP-Signale mehr detektierbar (Abb. 3.13E und 3.13F). Um eine mögliche Funktion von ZmMADS2 während des Eindringens des Pollenschlauchs in die Synergide oder bei der Befruchtung zu untersuchen, wurden Maisembryonen dieser Stadien frei präpariert und unter UV-Licht observiert. Auch hier konnte kein Signal des Fusionsproteins detektiert werden.

Durch DAPI-Färbung der Quer- und Längsschnitte der Antheren konnte das ZmMADS2-GFP Fusionsprotein innerhalb der Kerne von Zellen des Endotheciums und des Konnektivs nachgewiesen werden (Abb. 3.13I und 3.13J)). Die exklusive Lokalisierung des Fusionsproteins in Zellkernen bestätigt, daß der putative Transkriptionsfaktor ZmMADS2 an DNA bindet. Mit zunehmender Stärke des GFP Signals ging eine Abschwächung der DAPI-Fluoreszenz einher, was darauf hin deutet, daß die DNA in den Kernen degeneriert. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden einige Kerne bei höherer Vergrößerung aufgenommen. Die stärkste Akkumulation des ZmMADS2-GFP Fusionsproteins konnte in Zellkernen detektiert werden, in denen die DNA vollständig degeneriert war. Diese Kerne erschienen als Ansammlung mehrerer blasenförmiger Körper, die als "apoptotic bodies" bezeichnet werden (Abb. 3.14E). Der Abbau von chromosomaler DNA und die Bildung von Apoptosekörpern sind Kennzeichen des programmierten Zelltods (Apoptose) sowohl im Tier- als auch im Pflanzensystem. In Abb. 3.14 sind die Phasen der Apoptose von Zellkernen im Endothecium mit dem ZmMADS2-GFP Fusionsprotein als Marker beispielhaft illustriert. Vor Einsetzen des Zelltods sind feine Strukturen innerhalb des Kerns erkennbar (Abb. 3.14A und 3.14B), welche sich mit Beginn der Apoptose auflösen (Abb. 3.14C und 3.14D). Während der

Endphase des programmierten Zelltods bilden sich Apoptosekörper, in denen das ZmMADS2-GFP Fusionsprotein in großen Mengen vorliegt. DNA ist nicht mehr detektierbar (Abb. 3.14E und 3.14F).

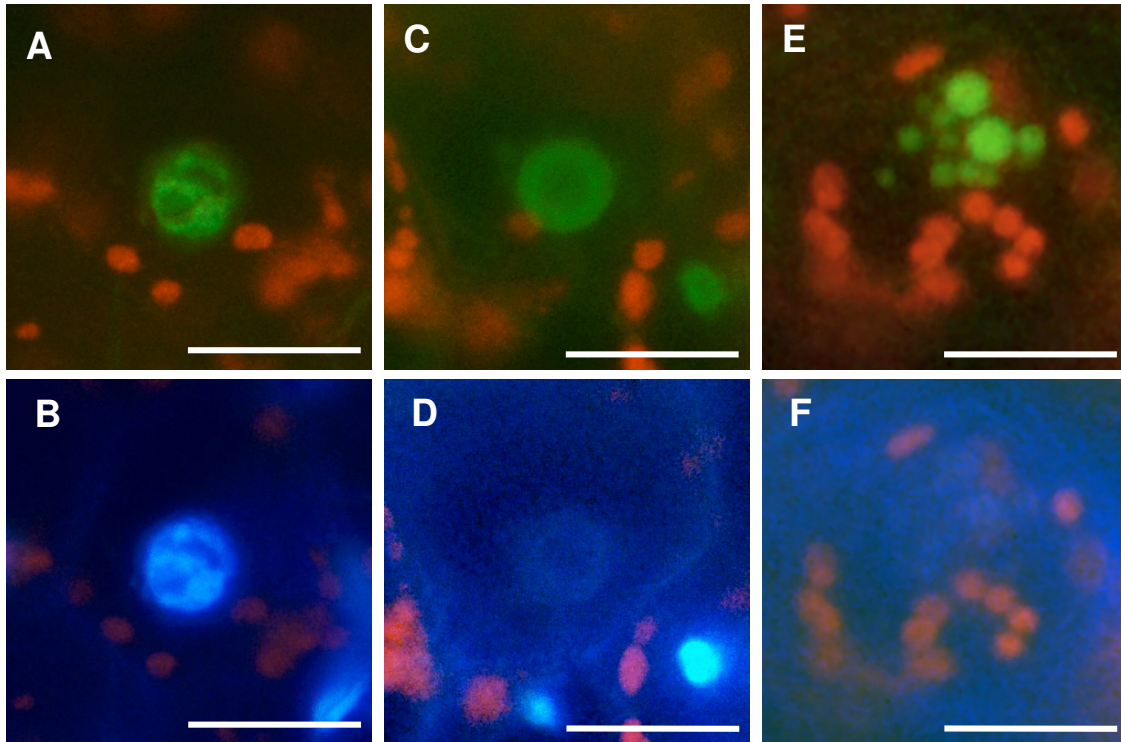


Abbildung 3.14: ZmMADS markiert Apoptose in degradierenden Kernen von Zellen des Endotheciums während der Antherenreifung

A: ZmMADS2-GFP Fluoreszenz in einem intakten Kern des Endotheciums; **B:** DAPI-Färbung von A, der Kern erscheint kompartimentiert. **C:** das Fusionsprotein ist in Kernen detektierbar, deren DNA degradiert. **D:** DAPI-Färbung von C, der Kern erscheint nicht mehr Strukturiert, es kann nur noch wenig intakte DNA detektiert werden. **E:** ZmMADS2-GFP akkumuliert in Apoptosekörpern eines Kerns im Endothecium; **F:** DAPI-Färbung von E, die DNA ist vollständig degradiert. Balken = 10 μm .

3.8. Nachweis der Protein-Protein Interaktion in Hefe

Die Klassifizierung von *ZmMADS2* als MADS-Box Transkriptionsfaktor wirft die Frage nach einem möglichen Bindungspartner auf. Es ist aus der Literatur bekannt, daß MADS-Box Transkriptionsfaktoren DNA als Homo- oder Heterodimere binden können (Immink et al., 2002). Um die Fähigkeit von *ZmMADS2* zur Homodimer-Bildung zu untersuchen, wurde *ZmMADS2* sowohl als Köder-, als auch als Beuteprotein im Hefe Two Hybrid System exprimiert. Durch Wachstumsversuche auf Selektionsmedium wurde zuerst nachgewiesen, daß *ZmMADS2* weder als Fusionsprotein mit der LexA DNA-Bindungsdomäne (Bait), noch mit der B42 Aktivierungsdomäne (Prey) zu einer Autoaktivierung des Reportergens führt. Anschließend wurden L40-Hefezellen mit dem Köder- und dem Beutekonstrukt transformiert und die Interaktion der Proteine überprüft. Bei Interaktion des Köder- und des Beuteproteins bildet sich ein Komplex, der an den Promotor eines Reportergens binden und dessen Transkription aktivieren kann. Die Hefezelle produziert autonom Histidin und ist in der Lage, auf Selektionsmedium zu wachsen. An das Histidin-Reportergen ist die kodierende Sequenz der β -Galactosidase gekoppelt, welche gleichzeitig mit der Aminosäure produziert wird. Bei Hefekulturen, die auf festem Medium wachsen, ist das Erreichen der stationäre Phase nicht sicher detektierbar. Da ab diesem Zeitpunkt der Kolonie abgestorbene Zellen als Aminosäure-Quelle zur Verfügung stehen, können die Zellen die zuvor integrierte Plasmid-DNA wieder entfernen (Abb. 3.14). Mit der Detektion von β -Galactosidase Aktivität kann Protein-Protein Interaktion in wachsenden Kulturen nachgewiesen werden. Nach sechs d Wachstum auf Selektionsmedium bei 30°C wurden insgesamt 60 Kolonien auf frisches Medium übertragen. Nach weiteren vier d Inkubation wurden die Klone in einem Filter Lift Assay auf Nylonmembran übertragen und die Protein-Protein Interaktion anhand des Nachweises von β -Galactosidase Aktivität in 44 der Kulturen nachgewiesen. Die charakteristische Blaufärbung trat nach sieben d Inkubation mit dem Substrat ein. Analog wurden Hefezellen mit c-Fos als Bait und c-Jun (Positivkontrolle), bzw. Lamin (Negativkontrolle) als Prey Ko-Transformiert. Erwartungsgemäß zeigte sich kein Wachstum der Negativkontrollen auf Selektionsmedium. Nach einer Wachstumsperiode von vier d bei 30°C wurden 44 unabhängige Klone der Positivkontrolle auf frisches Selektionsmedium übertragen und nach weiteren vier d ein Filter Lift Assay durchgeführt. 42 Der Kulturen zeigten drei d nach Inkubation mit X-Gal eine Umsetzung des Substrats durch β -Galactosidase. Abb. 3.15 zeigt Wachstum und β -Galactosidase Aktivität von jeweils drei repräsentativen Klonen die *ZmMADS2* als Bait, als Prey, oder beide Konstrukte enthalten, sowie Positiv- und Negativ-Kontrollen. Klone mit

interagierenden Proteinen wachsen auf Selektionsmedium (Abb. 3.15b) und zeigen Blaufärbung nach dem β -Galactosidase Test (Abb. 3.15c). Der mittlere Klon, der mit beiden ZmMADS2-Konstrukten transformiert wurde, hat eventuell eins der Plasmide entfernt.

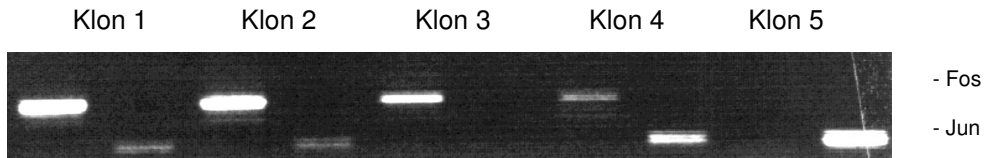


Abb. 3.14: Nachweis der Plasmidintegration in Hefezellen nach 4 d Wachstum auf Selektionsmedium

Hefezellen können integrierte Plasmide entfernen, wenn eine externe Aminosäurenquelle zur Verfügung steht, z. B. abgestorbene Zellen einer schnell wachsenden Kultur. Klon 3 hat das Prey- und Klon 5 das Bait-Plasmid verloren.

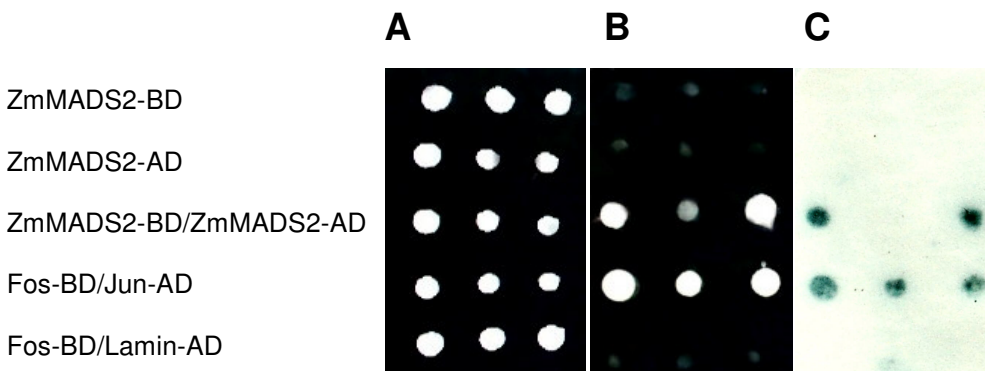


Abbildung 3.15: Nachweis der Protein-Protein Interaktion im Hefe Two Hybrid System

Jeweils drei unabhängige Klone wurden auf Vollmedium oder Selektionsmedium pipettiert und vier Tage bei 37°C inkubiert. A: Alle Transformanten wuchsen auf Vollmedium. B: Auf Selektionsmedium mit 300 μ g/ml Zeocin und ohne Histidin, Tryptophan, Lysin und Uracil wuchsen nur die Klone, in denen Bait und Prey miteinander interagieren. C: β -Galactosidase Test nach Übertragung der Klone auf Nylonmembrane. Neben den Positivkontrollen zeigen zwei der drei Klone mit ZmMADS2 als Bait und als Prey Blaufärbung. Obere Reihe: ZmMADS2 fusioniert mit der LexA DNA-Bindungsdomäne, Bait; Zweite Reihe: ZmMADS2 fusioniert mit der B42 Aktivierungsdomäne, Prey; Dritte Reihe: ZmMADS2 fusioniert mit der LexA Bindungsdomäne (Bait) und der B42 Aktivierungsdomäne (Prey); Vierte Reihe: c-Fos fusioniert mit der LexA Bindungsdomäne (Bait) und c-Jun fusioniert mit der B42 Aktivierungsdomäne (Prey) als Positivkontrolle; Untere Reihe: c-Fos fusioniert mit der LexA Bindungsdomäne (Bait) und Lamin fusioniert mit der B42 Aktivierungsdomäne (Prey) als Negativkontrolle.

3.9. Untersuchungen zur biotechnologischen Verwendbarkeit des *ZmMADS2*-Promotors

Um eine mögliche biotechnologische Anwendung von *ZmMADS2* zu untersuchen, wurden unreife Mais-Embryonen mit dem *Barnase* Gen unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors transformiert. Eine Expression der Ribonuklease Barnase führt zum sofortigen Tod der betreffenden Zelle. Bei Transgenen Pflanzen, die das Barnase-Konstrukt exprimieren, sollten männliche Reproduktive Organe degenerieren. Aus 387 transformierten Embryonen konnten 9 Basta®-resistente Pflanzen regeneriert werden, von denen keine das Transgen integriert hatte. Dies läßt darauf schließen, daß eine Aktivität des *ZmMADS2*-Promotors in Wurzelspitzen junger Wurzeln während der Regenerationsphase vorhanden ist und Barnase aktiviert wird. Da die Regenerate somit keine Nährstoffe aus dem Medium aufnehmen konnten, starben sie ab.

4. Diskussion

4.1. *ZmMADS2* enthält sieben Introns und zahlreiche metabolisch induzierte *cis*-Elemente im Promotor-Bereich

Die Abfolge der funktionellen Domänen (MADS-Box, Inter-Region, K-Box und C-Terminus) von *ZmMADS2* spiegelt den typischen Aufbau eines pflanzlichen MADS-Box Gens vom MIKC-Typ wieder. Intronsequenzen sind bei *ZmMADS2* an den für MADS-Box Gene typischen Stellen eingeschoben (Riechmann und Meyerowitz, 1997). Relativ große Introns trennen die MADS-Box, die Inter-Region und die K-Box voneinander. Innerhalb der K-Box und des C-Terminus sind relativ kurze Introns ebenfalls an konservierten Stellen lokalisiert. Sechs der sieben Introns von *ZmMADS2* erfüllen die GT-AG Regel für Spleißstellen (Sharp, 1987), eine Ausnahme bildet Intron 2 (CT-TG). Obwohl hier insbesondere das zweite Thymin ungewöhnlich ist, wurden keine abweichenden Spleißprodukte beobachtet. In wenigen Fällen wurde gezeigt, daß zum korrekten Spleißen pflanzlicher Prä-mRNA von der GT-AG-Regel abweichende Sequenzen verwendet werden (GC-AG oder AT-AC, Lal et al., 1999). Eine Punktmutation im MADS-Box Gen *AP3* aus *Arabidopsis* (GT nach AT am 5'-Ende des Intron 5) führt dazu, daß das Exon 5 nicht erkannt und mit den umgebenden Introns 4 und 5 herausgespleißt wird. Diese fehlerhafte Prozessierung wird durch eine weitere Mutation, die eine effektive Verzweigungs-Sequenz in Intron 4 einfügt, aufgehoben. Durch das effektive Ausschneiden von Intron 4 wird Exon 5 erkannt und korrekt gepleißt (Yi und Jack, 1998).

Das zweite Intron von *ZmMADS2* ist mit mehr als 2,3 kbp ungewöhnlich lang. Neben *ZmMADS2* weist auch das *AGAMOUS* (*AG*) MADS-Box Gen aus *Arabidopsis thaliana* mit 2985 bp ein ungewöhnlich großes Intron 2 auf, wobei dieses, anders als bei *ZmMADS2*, zwischen der MADS-Box und der Inter-Region gelegen ist. *ZAG2* und *ZMM1* aus Mais weisen mit 1961 bp und 1054 bp an der selben Stelle ebenfalls relativ große Introns auf. Die Introns zwischen Inter-Region und K-Box entsprechen bei *ZAG2*, *ZMM1* und *AG* in der Größe der stromabwärts gelegenen kleinen Introns (Theißen et al., 1995). Aus der genomischen Sequenz von *Oryza sativa* wurde mit Hilfe verschiedener Analyse-Programme ein kodierender Bereich abgeleitet, der eine hohe Homologie zu *ZmMADS2* aufweist (Gene Bank Accession Nummer CAD40993). Das vorhergesagte Gen weist mit 5,3 kbp ebenfalls ein sehr großes Intron 2 auf. In einigen Versuchsansätzen wurde aus genomischer DNA der Mais-Inzuchtlinie A188 mit den Primern In2-1 und In3-2 (siehe 2.5.2) ein Fragment von weit

über 8,1 kbp (der größten Bande des Längenstandards Eco471) amplifiziert. Dieses Fragment ist wesentlich größer als die oben genannten Intronsequenzen und wurde nicht sequenziert. Ein Vergleich der bekannten Sequenz am 5'-Ende des *ZmMADS2*-Intron 2 mit Datenbanken ergab keine Homologien zu bekannten Genen. Eine Analyse mit der DNASTar-Software zeigte jedoch eine invertierte Wiederholungssequenz von 197 bp Länge auf, die in einem Abstand von 566 bp wiederholt wird. An dieser Stelle könnte das Transkript eine stabile Sekundärstruktur ausbilden. Für das 3'-Ende des *ZmMADS2*-Intron 2 konnte jedoch eine Homologie von 100% zu einem in Mais-Wurzeln exprimierten Transkript (Gene Bank Accession Nummer AI783301) in einem Bereich von 210 bp festgestellt werden. Die hieraus abgeleitete Transkriptionseinheit beinhaltet weitere 383 bp Sequenz, die keine Homologie zu dem bekannten 5'-Ende des *ZmMADS2*-Intron 2 aufweist. Insertionen von Retrotransposons in Introns des MADS-Box Gens *MdPI* des Apfels führen zum Verlust der MdPI-Funktion. Eine Insertion in Intron 4 (Rae Ime) oder Intron 6 (Spencer Seedless und Wellington Bloomless) von *MdPI* wurde für drei Apfel-Sorten nachgewiesen, die kernlose Früchte produzieren. Eine molekulare Analyse des 9,3 kbp großen Inserts in Rae Ime zeigte, daß das enthaltene Element nicht mehr aktiv ist (Yao et al., 2001).

Im Gegensatz zur Promotorsequenz enthält das zweite Intron von *ZmMADS2* eine CARG Box (CCAAAAAAGG). Inwieweit diese an der Regulation der *ZmMADS2*-Expression beteiligt ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. CARG-Boxen weisen die Konsensus-Sequenz CC(A/T)₆GG auf. Durch Basenpaarung der flankierenden G- und C-Nukleotide bildet sich eine A/T-Schleife und damit eine charakteristische Sekundärstruktur (Shore und Sharrocks, 1995). Es wurde gezeigt, daß MADS-Box Transkriptionsfaktoren als Dimere an CARG-Boxen in Promotoren binden. Diese können zur Autoregulation der Expression verwendet werden. Innerhalb des Promotors von *ZmMADS2* konnten keine solchen Sequenzen gefunden werden, diese werden jedoch eventuell nicht benötigt. Von Zik und Irish (2003) wurde gezeigt, daß das PI/AP3 Heterodimer an DNA-Sequenzen bindet, die keine CARG-Box enthalten. Innerhalb des *PI*-Promotors befinden sich ebenfalls keine CARG-Boxen. Zur Autoregulation ist eine *de novo* Proteinsynthese notwendig, was auf eine indirekte Regulation hindeutet (Chen et al., 2000; Honma and Goto, 2000). Für AG konnte jedoch gezeigt werden, daß Elemente innerhalb der Intronsequenzen für die Regulation der zeitlichen und der Gewebespezifischen Expression verantwortlich sind (Sieburth und Meyerowitz, 1997). Transgene Pflanzen, die ein AG-GUS Fusionsprotein mit dem Leader-Intron und dem großen Intron2 exprimierten, zeigten ein Expressionsmuster, das der endogenen RNA-Verteilung entspricht. Fehlten die Intronsequenzen, waren sowohl die zeitliche als auch die räumliche Expression

verändert. Anhand von Kreuzungen mit Mutanten bekannter Regulatoren der *AG*-Expression wurde die Verwendung von Elementen innerhalb der Intronsequenz demonstriert: sowohl die Unterdrückung der *AG*-Expression in vegetativem Gewebe durch *CLF* (*curly leaf*), als auch die Aktivierung während der frühen Blütenentwicklung durch *AP1* (*APETALA1*) und *LFY* (*LEAFY*), werden über intragene Sequenzen reguliert (Sieburth und Meyerowitz, 1997).

Für die späten Pollengene *lat52* (Bate et al., 1996) und *ntp303* (Hulzink et al., 2002) wurde gezeigt, daß zur Erhöhung der Translation Sequenzen innerhalb der 5'UTR verwendet werden. Die transienten Expressions-Experimente mit sieben *ZmMADS2*-Promotor Deletions-Konstrukten ergaben jedoch nur geringfügige Unterschiede in der Aktivität des *Luciferase* Reportergens wenn die 5'UTR im Konstrukt vorhanden war (pDNS-6b) oder fehlte (pDNS-6). Anhand der Expressions-Analysen mit dem *GUS*-Reportergen wurde gezeigt, daß der 5'UTR von *ZmMADS2* für den Transport des Transkripts in den Pollenschlauch verantwortlich ist (siehe Abb. 3.9).

Bei der Analyse der Promotor Sequenz von *ZmMADS2* wurden Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren, putative *cis*-Elemente und viele repetitive Elemente lokalisiert. Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind notwendig zur Aktivierung der RNA-Polymerase II, sie haben aber keinen Einfluß auf die Gewebe-spezifische Expression. Die CAAT-Box und die GC-Box beeinflussen in starkem Maße die Initiationsrate. Sie dienen dazu, die RNA-Polymerase II in die nähere Umgebung des transkriptions-Startpunkts zu dirigieren und stellen erste Kontakte her, die den Zusammenbau des Transkriptionsapparates einleiten (Buchanan et al., 2000). Die TATA-Box dient dazu, die Polymerase II so auszurichten, daß sie an der richtigen Position die Transkription einleitet. Bei Promotoren ohne TATA-Box erfolgt die Initiation an einem von mehreren möglichen Startpunkten. Innerhalb des *ZmMADS2*-Promotors konnte keine TATA-Box an der typischen Position etwa 30 bp stromaufwärts des Startpunkts (Buchanan et al., 2000) detektiert werden. An Position –36 befindet sich jedoch eine GC-Box, welche den Aufbau des Transkriptionsapparats initiieren könnte. Eine Kombination von Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren befindet sich zwischen den Positionen –77 und –177. Hier folgen, vom Transkriptionsstartpunkt aus gesehen, eine GC-Box, eine TATA-Box, eine GC-Box und zwei CAAT-Boxen. Da CAAT- und GC-Boxen auch in größerem Abstand zum Transkriptions-Startpunkt funktionieren können, erscheint ihre Verwendung zum Aufbau des Transkriptionsapparats wahrscheinlich.

Die Analyse des *ZmMADS2*-Promotors mit dem MatInspector Programm und der PLACE Datenbank zeigte mehrere Gruppen putativer *cis*-Elemente, die in Boxen zusammengefaßt

wurden. Kurze Motive aus dem *Agrobacterium rhizogenes rolD* Promoter, die im Tabak eine Wurzel-spezifische Expression von Reporter Genen vermitteln (Elmayan and Tepfer, 1995), konnten oberhalb von Position -419 im *ZmMADS2*-Promotor mehrfach detektiert werden. Elemente, die die Pollen-spezifische Expression des *lat52* Gens der Tomate (Bate and Twell, 1998), bzw. des *g10* Gens des Tabaks (Rogers et al., 2001) dirigieren, befinden sich annähernd statistisch über die gesamte Promotor-Sequenz verteilt. Aus diesem Grund erscheint ihre Verwendung zur Steuerung der *ZmMADS2* Expression unwahrscheinlich. Für einige Pollen-spezifische Elemente wurde gezeigt, daß sie sowohl in Monokotyledonen als auch in Dicotyledonen Pflanzen aktiv sind, wobei keine allgemeine Pollen-Box identifiziert wurde (Hamilton et al., 1998). Deshalb kann angenommen werden, daß zur Pollen-spezifischen Expression von *ZmMADS2* bisher nicht identifizierte Sequenzen verwendet werden. Transiente Transformations-Experimente mit dem *Luciferase*-Reporter Gen unter der Kontrolle von sieben *ZmMADS2*-Promotor Deletionskonstrukten zeigten, daß den Boxen II und III hierbei die größte Bedeutung zukommt. *Cis*-Elemente, die eine Pollen-Spezifität vermitteln, liegen hauptsächlich innerhalb der Box II (Pos. -326 bis -210) und weitere Regulatoren der Expressionsstärke innerhalb der Box III (Pos. -497 bis -419). Innerhalb dieser Bereiche befinden sich zwei G-Boxen in Box III (Hwang et al., 1998; Toyofuku et al. 1998) und ein putatives Coupling Element der G-Box in Box II (Hwang et al., 1998). Diese *cis*-Elemente vermitteln eine Aktivierung bei Zuckermangel. In Box II sind außerdem verschiedene Reaktionselemente lokalisiert. Diese *cis*-Elemente vermitteln eine Reaktion auf die intrazelluläre Konzentration von Saccharose (Grierson et al., 1994), Auxin (Ulmasov et al., 1999) oder Abszinsäure (ABA) und Trockenheit (Lopez-Molina et al., 2002). Für G-Boxen wurde gezeigt, daß sie gemeinsam mit ihren Coupling-Elementen die zelluläre Streß-Antwort regulieren. Ihre Aktivität wurde bei externen Streßsignalen, wie z. B. Trockenheit, (DeVetten and Ferl, 1994) sowie bei Nahrungsmangel (Hwang et al., 1998; Toyofuku et al. 1998) gezeigt. Während der Antheren- und der Pollenreifung treten folgende Veränderungen auf: die Gewebe trocknen aus und werden nicht mehr über das Filament mit Nährstoffen versorgt (Bedinger, 1992). Es erscheint daher wahrscheinlich, daß durch Bindung von Trans-Faktoren an die G-Boxen und das ABA- und das Saccharose-Reaktionselement die Expression von *ZmMADS2* in reifen Pollen und reifen Antheren aktiviert wird.

4.2. *ZmMADS2* gehört zur AGL17 Subfamilie der MADS-Box Gene und reguliert die Pollen- und Antherenreifung

Homologievergleiche mit bekannten MADS-Box Genen verschiedener Arten zeigen, daß *ZmMADS2* ein Mitglied der AGL17 Subfamilie ist (Abb. 4.1). Die Homologie von *ZmMADS2* ist am höchsten zu DEFH125 (Zachgo et al., 1997), einem Pollen-spezifischen MADS-Box Gen aus *Antirrhinum majus*. Beide Gene sind spezifisch in Antheren und Pollen exprimiert (Zachgo et al., 1997; Heuer et al., 2000). DEFH125 wurde außerdem nach Pollination in Kernen von Zellen des Transmissionsgewebes detektiert. Für DEFH125 wurde gezeigt, daß das Protein im Zytoplasma des Pollenschlauchs lokalisiert ist. Es konnte nicht geklärt werden, ob beim Eindringen des Pollenschlauchs die Expression von *DEFH125* im Transmissionsgewebe induziert wird oder ob das Protein über Plasmodesmata aus dem Pollenschlauch in die umgebenden Zellen transportiert wird. Eine noch höhere Identität mit *ZmMADS2* weist ein hypothetisches Protein aus Reis (*Oryza sativa*) auf, welches aus der genomischen Sequenz abgeleitet wurde (Fu et al., 2002). Von diesem Gen liegen aber bislang keine Expressionsdaten vor.

Mitglieder dieser monophyletischen MADS-Box Klasse aus *Arabidopsis thaliana* sind ausschließlich in Wurzeln exprimiert. *AGL17* ist in der lateralen Wurzelhaube innerhalb der Wurzelspitze und in Epidermis-Zellen bis zur Längenwachstums-Zone exprimiert. *AGL21* ist in lateralen Wurzel-Primordien hoch exprimiert und das Transkript konnte zusätzlich in einzelnen Bereichen des Wurzelmeristems nachgewiesen werden (Burgeff et al., 2002). Ein weiteres Beispiel ist *ANRI*, welches als ein Regulator einer Signal-Transduktionskette identifiziert wurde. Bei hoher NO_3^- -Konzentration im Boden aktiviert *ANRI* die Verlängerung der lateralen Wurzeln in Richtung der Nitrat-Quelle (Zhang und Forde, 2000). *ANRI*-"Knock-out" Mutanten zeigen keine Reaktion auf Veränderungen des Nitratgehalts im Boden (Zhang und Forde, 1998). *NMHC5* aus Luzerne (*Medicago sativa*) ist spezifisch in Wurzelknoten exprimiert, die sich bei einer Infektion durch *Rhizobium* bei Leguminosen bilden (Heard et al., 1997). *StMADS11*, ein *AGL17*-Homolog aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*), wurde in allen vegetativen Organen nachgewiesen. In Blättern und Stengel der ausgewachsenen Pflanze wurde das Transkript vorwiegend in den Leitgefäßen nachgewiesen (Carmona et al., 1998). *AGL16* ist sowohl in der Blüte als auch in vegetativen Organen exprimiert und es wurde diskutiert, daß es die Entwicklung von Stomata regulieren könnte (Alvarez-Buylla, et al. 2000). Weitere Homologievergleiche mit Sequenzen aus dem

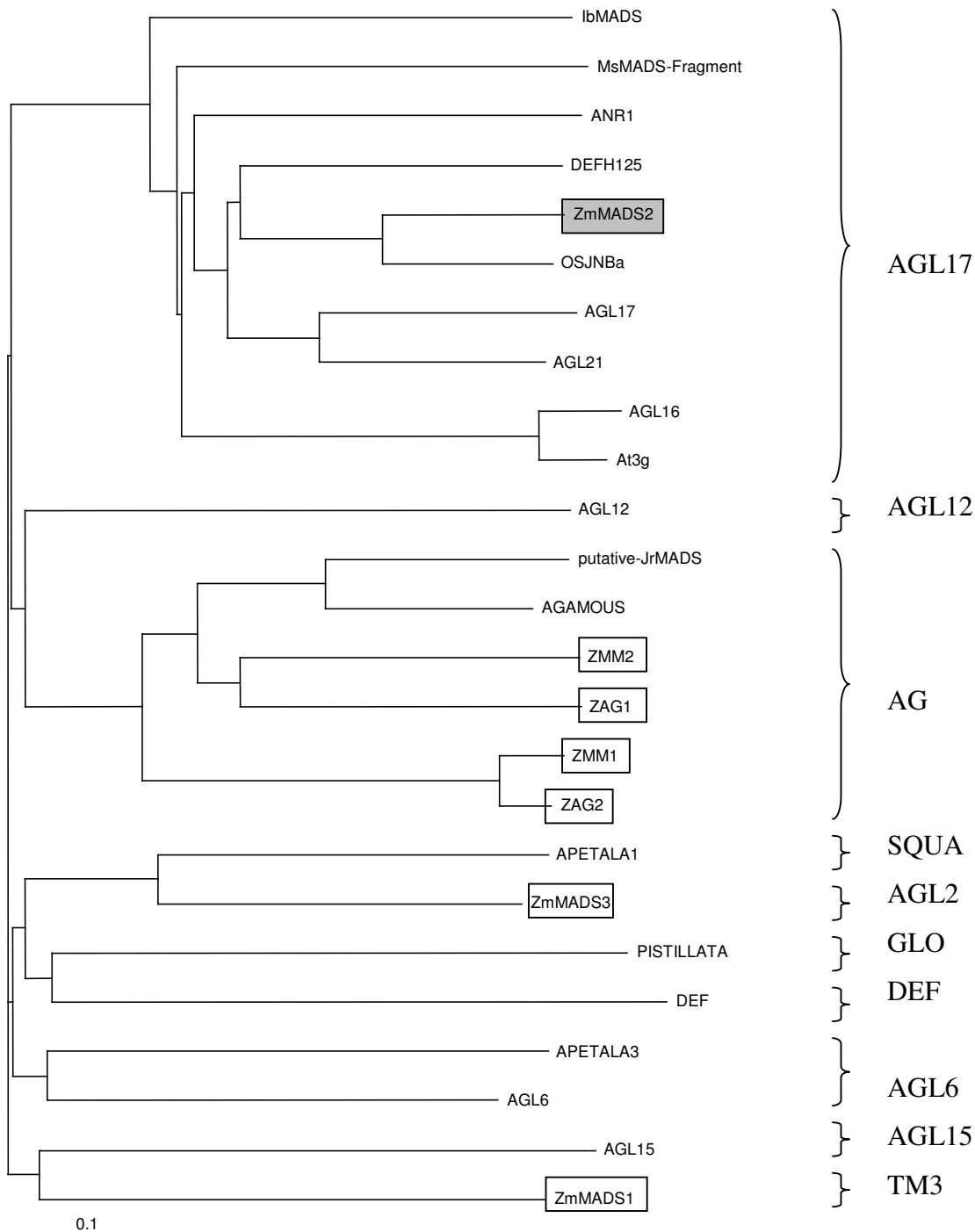


Abb. 4.1: Auszug aus dem phylogenetischen Stammbaum der Familie der MADS-Box Gene aus Angiospermen

ZmMADS2 gehört zur AGL17-Unterfamilie der MADS-Box Gene. Mitglieder dieser Gruppe wurden zum Teil aus genomischen Sequenzdaten abgeleitet. Die anderen Unterfamilien sind jeweils durch ihre Namensgeber sowie MADS-Box Gene aus Mais (mit Rahmen) repräsentiert. Der Name der jeweiligen Unterfamilie ist rechts angegeben. Der Balken repräsentiert eine Abweichung der Aminosäuren-Sequenz von 10%.

Arabidopsis Genom zeigen, daß die *AGL17*-Unterfamilie wahrscheinlich noch weitere, bisher nicht untersuchte Mitglieder aufweist (Abb. 4.1).

Mitglieder einer monophyletischen Einheit weisen im Allgemeinen neben hoher Sequenz-Homologie auch große Ähnlichkeiten in ihrer Funktion sowie in den Expressionsmustern auf. Die *AGL17*-Unterfamilie scheint eine Ausnahme zu sein, da die Mitglieder in jeder Hinsicht starke Unterschiede zeigen. *ZmMADS2* und *DEFH125* sind in den letzten Stadien der Antheren- und der Pollenreife sowie im wachsenden Pollenschlauch stark exprimiert, eine sehr schwache Expression von *ZmMADS2* konnte in Wurzelspitzen und Wurzeln ohne Spitzen nachgewiesen werden. Die Mitglieder der Subfamilie aus *Arabidopsis* und ein Vertreter aus Luzerne sind Wurzel(-Organ) spezifisch exprimiert, während das einzige bekannte Mitglied dieser Unterfamilie aus der Kartoffel in allen vegetativen Geweben exprimiert ist. Im Zusammenhang mit der Evolution der Landpflanzen wird vermutet, daß sich die Expressionsmuster von MADS-Box Genen der höheren Pflanzen aus universell exprimierten Vorfahren entwickelt haben, wie sie z. B. in Farnen zu finden sind (Theißen et al., 2000). Durch Duplikation und die Rekrutierung der entstandenen Gene für unterschiedliche Aufgaben könnten sich zeitlich und räumlich spezifischen Expressionsmuster entwickelt haben (Alvarez-Buylla et al., 2000). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Pollen und Wurzeln beide polares Spitzenwachstum zeigen, bei dem die Kerne der Zellen in die wachsende Spitze einwandern. Versuche, eine einheitliche Theorie der Regulation dieser Vorgänge zu bestimmen, zeigten jedoch viele Unterschiede in beiden Systemen auf (Franklin-Tong, 1999). So kann beispielsweise das Pollenschlauchwachstum als amöboide Bewegung der vegetativen Zelle aufgefaßt werden, während die Zellen der Wurzel in ihrem Entstehungsgewebe verankert bleiben. Im Gegensatz zur sporophytischen Wurzelspitze stellt der männliche Gametophyt einen eigenständigen Organismus dar. Die Zellkerne im Gametophyten sind außerdem haploid, die der Wurzelzellen diploid. Hauptaufgabe der Wurzeln ist Aufnahme und Weiterleitung von Nährstoffen und Wasser aus dem Boden, wohingegen der Pollenschlauch einzig dem Transport der Spermzellen zum Embryosack dient.

Das Vorhandensein zahlreicher metabolischer *cis*-Elemente im *ZmMADS2*-Promotor deutet darauf hin, daß die Expression von *ZmMADS2* durch die Nährstoffkonzentration innerhalb der Zelle reguliert wird. Die *ANRI*-Expression wird ebenfalls durch Nährstoffkonzentrationen reguliert (Zhang und Forde, 2000). G-Boxen innerhalb des *ZmMADS2*-Promotors und die Expression während des Zelltods deuten auf eine Aktivierung durch Streßfaktoren hin. Diese treten ebenfalls bei einer Infektion des Wurzelgewebes auf, die die Expression von *NMHC5*

in Luzerne auslöst. Weitere Gemeinsamkeiten lassen sich zwischen *ZmMADS2* und *AGL17* finden: beide Gene sind in Wurzelspitzen exprimiert. *AGL17* markiert die Wurzelhaube, deren Zellen nach wenigen Tagen Lebensdauer dem programmierten Zelltod unterliegen und *ZmMADS2* markiert die Apoptose in Zellen des Endotheciums und des Konnektivs. Beide Proteine erscheinen im Zusammenhang mit dem programmierten Tod von Zellen, der für das Überleben der Pflanze, bzw. ihrer Nachkommen notwendig ist.

Die Insertion eines Wurzel-spezifischen Gens in das *ZmMADS2*-Intron 2 könnte die *ZmMADS2*-Expression in der Wurzelspitze beeinflussen. Regulatorische Elemente können in beiden Orientierungen (sense und antisense) aktiv sein (Xie et al., 2001). Bei der Expression des in Intron 2 inserierten Gens sind *cis*-Elemente in dessen Promotorbereich, der mit Teilen der K-Box von *ZmMADS2* überlappt, von Transkriptionsfaktoren besetzt. Diese könnten in geringem Maße auch eine Transkription in der entgegengesetzten Richtung aktivieren. Gegen eine alleinige Aktivierung der *ZmMADS2*-Expression in Wurzelspitzen durch den Promotor des inserierten Gens spricht jedoch, daß keine transgenen Pflanzen regeneriert werden konnten, die das *ZmMADS2::Barnase*-Konstrukt integriert hatten. Einfachen Eukaryonten, wie z. B. Hefe, besitzen relativ kleine Genome, in denen kodierende Sequenzen häufig überlappen oder in entgegengesetzter Orientierung angeordnet sind. In *Achlya klebsiana* wurde die gleichzeitige Expression eines sog. "Antisense-Genpaares" nachgewiesen. Ein Strang des betreffenden DNA-Fragments kodiert für eine NAD-spezifische Glutamat Dehydrogenase und der komplementäre Strang für ein Hitzeschock-Protein (LeJohn et al., 1994). In Hefe wurde gezeigt, daß die Transkription von zwei konvergent angeordneten Genen gestört wird, wenn die Leserahmen überlappen (Puig et al., 1999). Prescott und Proudfoot (2001) demonstrierten jedoch, daß eine Störung der Transkription nur auftritt, wenn beide Gene von dem selben DNA-Strang kodiert werden. Eine Störung der Expression von *ZmMADS2* durch das inserierte Gen in der Wurzel erscheint somit unwahrscheinlich.

Es ist bekannt, daß aus dem Tapetum sekretierte Stoffwechselprodukte die Mikrosporenentwicklung stark beeinflussen. Mutationen, bei denen die Zellen des Tapetums betroffen sind, führen zu männlicher Sterilität (z.B. Koltunow et al., 1990; Okada et al., 1999; Kapoor et al., 2002). Im Endstadium der Pollenentwicklung sind Tapetum und Zwischenschicht vollständig degeneriert und die Antherenkammern vom Endothecium umgeben. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß die nunmehr innere Schicht der Antherenwand die Pollenreifung beeinflußt oder das Austrocknen beider Gewebe durch den selben Mechanismus reguliert wird. Eine Ausnahme ist z. B. der Tabak, bei dem gezeigt wurde, daß sich männlich sterile Antheren, in denen die Entwicklung des Tapetums gestört

ist, normal öffnen und somit das Aufspringen der Antheren und die Reifung der Pollen unabhängige Ereignisse darstellen (Koltunow et al., 1990; Mariani et al., 1990). Reporter Gene unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors konnten sowohl in austrocknenden Antheren als auch im wachsenden Pollenschlauch detektiert werden. Dies deutet darauf hin, daß *ZmMADS2* für diese beiden unterschiedlichen Prozesse benötigt wird.

Ein Modell zur Synchronisation von Pollenreifung, Aufspringen der Anthere und Öffnung der Blüte in *Arabidopsis* wurde kürzlich von Ishiguro et al. (2001) entworfen. Der Import von Wasser aus den Antherenkammern in das Filament fördert die Pollenreifung, eine weitere Wasseraufnahme aus der Antherenwand (Endothecium und Epidermis) führt zum Aufspringen der Anthere und der Verlängerung des Filaments. Bei der *Arabidopsis* Mutante *coil*, die unfähig ist, das Jasmonatsäure-Signal zu detektieren, unterbleibt das Aufspringen der Antheren und die Pflanzen sind männlich steril. Jasmonatsäure wurde daher als Signalmolekül zur Koordination der Ereignisse diskutiert, die zu einer rechtzeitigen Ausschüttung reifen Pollens führen. Der Phänotyp von *ZmMADS2*-Antisense Pflanzen deutet darauf hin, daß auch hier eine ähnliche Signalkette unterbrochen ist.

Viele sog. späte Pollengene sind neben dem Gametophyten ebenfalls in Geweben der Anthere exprimiert. Transkripte dieser Gene wurden in Tapetum, Zwischenschicht, Endothecium, Epidermis, Stomium, Septum, Konnektiv oder im Filament nachgewiesen. Okada et al. (1999) lokalisierten eine Expression des Ca^{2+} -bindenden Proteins *Bra r 1* in Tapetum, Mikrosporen und im Pollenschlauch. Das Protein wird sekretiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Interaktion zwischen Pollen und Stigma. Das Ausschalten des Tapetum-spezifischen Zink-Finger Proteins *TAZI* führte zu vorzeitiger Degeneration des Tapetums und zum Absterben der Mikrosporen (Kapoor et al., 2002). Die Expression des *Arabidopsis MSI* Gens kann in geschlossenen Knospen detektiert werden und erreicht ihr Maximum bei der Mikrosporen-Bildung im Tapetum (Wilson et al., 2001). Xu et al. (1992) zeigten, daß zur Regulation der Expression von *bgp1* im Tapetum und im Pollen unterschiedliche Sequenzen innerhalb der 5'UTR verwendet werden. Die *Arabidopsis* Gene *DELAYED DEHISCENCE1* (Sanders et al., 2000) und *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1* (Ishiguro et al., 2001) kodieren beide für Enzyme des Jasmonatsäure-Stoffwechsels, die während der späten Antheren-Entwicklung im Filament akkumulieren. Das *lat52* Gen aus der Tomate, welches wahrscheinlich eine Pektin-Lyase kodiert, zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie *ZmMADS2*. *Lat52* ist in sporophytischen Geweben der Anthere, im reifen Pollen, in Wurzelhauben von Primär- und Lateralwurzeln sowie im Endosperm exprimiert. Ein weiteres spätes Pollengen der Tomate, *lat59*, ist eventuell an der Steuerung von Ablösungsprozessen

beteiligt (Twell et al., 1991). *MROS2*, ein putatives sekretiertes Zellwand-Protein aus *Melandrium album*, wird ausschließlich in Endothecium und Konnektiv männlicher Knospen exprimiert (Matsunaga et al., 1996).

4.3. ZmMADS2 ist ein Marker für Apoptose während der Antherenreifung

In transgenen Maispflanzen konnte das ZmMADS2-GFP Fusionsprotein in Apoptosekörpern der Kerne von Zellen im Endothecium und im Konnektiv detektiert werden. Es konnte nicht geklärt werden, ob ZmMADS2 direkt die Apoptose in diesen Zellen induziert oder Vorgänge reguliert, die letztlich zum programmierten Zelltod (PCD) führen. In Anbetracht des Phänotyps der Antisense-Pflanzen und vor allem der Tatsache, daß im Gametophyten kein programmierter Zelltod stattfindet, erscheint es aber eher wahrscheinlich, daß ZmMADS2 die metabolische Aktivität dieser Zelle aktiviert. Abhängig von der Kompetenz der stabilisierenden Gewebe und des Pollens führt die Aktivität von ZmMADS2 entweder zur Apoptose oder zur Reaktivierung des Metabolismus zu Beginn der Pollenkeimung. Da *ZmMADS2* offensichtlich nicht Bestandteil des generellen Zelltods ist, sondern spezifisch im Zusammenhang mit der Apoptose in stabilisierenden Geweben der Anthere steht, sollten zumindest einige Zielgene des Homodimers spezifisch für die Antherenreifung sein. Mögliche Kandidaten wären Zellwand-Proteine wie *MROS2*, welches ein ähnliches Expressionsmuster wie *ZmMADS2* in *Melandrium album* zeigt (Matsunaga et al., 1996), Homologe des Apoptose induzierenden Faktors (AIF) der Säuger (Joza et al., 2001), welcher die Fragmentierung der Chromosomen induziert, oder ein BH-3-Domänen Protein, welches die Ausschüttung von apoptogenen Faktoren aus Mitochondrien, z. B. Cytochrom C, induziert. Eine Funktion von *ZmMADS2* könnte auch die Repression antioxidativer Enzymaktivität sein, die zum Vollzug des programmierten Zelltods notwendig ist (Swidzinski et al., 2002). Naheliegend ist ebenfalls eine Steuerung des aktiven Exports von Wasser durch ZmMADS2 bei der Austrocknung der Antherenwand. Da der Pollenschlauch während des Wachstums eine hohe Konzentration an Nährstoffen benötigt, entsteht in seinem Inneren ein hoher osmotischer Druck, aufgrund dessen Wasser aus dem Transmissionsgewebe nachfließt. Durch den aktiven Export von Wasser kann ein Platzen des Pollenschlauchs verhindert, sowie die Nährstoff-Konzentration im Zytoplasma der vegetativen Zelle auf hohem Niveau gehalten werden. Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein genetisch festgelegter Prozeß, bei dem eine Zelle ihre eigene Zerstörung und die Wiederverwendbarkeit ihrer Komponenten dirigiert. Bei

Pflanzen tritt Apoptose während der Entwicklung und Differenzierung auf (Jones und Dangl, 1996; Pennel und Lamb, 1997; Lam et al., 2001). Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind Chromatin-Kondensation, DNA-Leiterbildung, die Bildung von Apoptosekörpern sowie bei Pflanzen die Ablösung der Plasmamembran von der Zellwand (McCabe et al., 1997). PCD kann bei Pflanzen durch biotischen und abiotischen Streß induziert werden, wie z. B. Hitze. Bei Pathogenbefall kommt es zur Hypersensitiven Reaktion (HR), Zellen am Ort des Eindringens des Schädlings sterben ab (Richberg et al., 1998). Schlüsselproteine des programmierten Zelltods bei Tieren, wie z. B. Bcl-2 oder die Familie der Caspasen, scheinen im Pflanzenreich nicht konserviert zu sein, es wurden auch im bekannten Genom von *Arabidopsis thaliana* keine homologen Sequenzen gefunden. Eine Klasse von Signal-Komponenten der pflanzlichen Abwehr enthält eine DNA-Bindungsdomäne mit hoher Homologie zu *Apaf-1*, einem Vermittler der Apoptose bei Säugern. Diese Abwehrgene modulieren eventuell die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Wilson et al., 1997).

Swidzinski et al. (2000) identifizierten mit einem Micro-Array Gene, deren Expression bei Apoptose verändert war. Zu diesen gehörten Komponenten der oxidativen Streß-Antwort, Cystein-Proteinasen, HR-Gene und Transkriptionsfaktoren. MADS-Box Gene regulieren die Blütenentwicklung von der Meristem Identität bis zur Gametophyten Reifung und darüber hinaus. Es erscheint daher natürlich, daß Mitglieder dieser großen Gen-Familie ebenso das Absterben und den Abbau von Blütengeweben, die ihre Funktion erfüllt haben, regulieren.

ZmMADS2 ist in Zellkernen des Endotheciums und des Konnektivs lokalisiert, die einen programmierten Zelltod durchlaufen. Ein Homolog von ZmMADS2, AGL17, wurde in sich ablösenden Zellen der Wurzelhaube detektiert, die ebenfalls eine Apoptose durchführen. Obwohl das ZmMADS2-GFP Fusionsprotein in transgenen Pflanzen nicht innerhalb der Wurzel detektierbar war, lassen diese Daten auf eine Assoziation mit der PCD in Zellen der Wurzelhaube schließen. Funktionale Ähnlichkeiten lassen sich darüber hinaus zu weiteren MADS-Box Genen aus anderen Unterfamilien feststellen. Die Aktivität der *SHP1* und *SHP2* Gene aus *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2000) ist notwendig, um das Aufspringen der Fruchtkapsel zu gewährleisten, welches nach einem ähnlichen Mechanismus funktioniert, wie das Aufspringen der Antheren. Bei der Tomate reguliert das MADS-Box Gen *JOINTLESS* die Bildung der Abszissionszonen, an denen der Fruchtfall stattfindet (Mao et al., 2000). Die funktionale Ähnlichkeit bei relativ geringer Sequenzhomologie außerhalb der MADS-Box deutet darauf hin, daß zur Steuerung des programmierten Zelltods als Bestandteil der Entwicklung im Lauf der Evolution unterschiedliche Gene rekrutiert wurden.

Ein weiteres Homolog von ZmMADS2, DEFH125, ist im Zytoplasma des wachsenden Pollenschlauchs lokalisiert und wird vermutlich in Zellen des Transmissionsgewebes transportiert (Zachgo et al., 1997). Hinsichtlich der Funktion von ZmMADS2 im Zusammenhang mit Apoptose erscheint es sinnvoll, daß das Homodimer aus einer Zelle, die zur Fertilisation gebraucht wird, in Gewebe einwandert, welches nicht länger benötigt wird. Da der Pollenschlauch von Mais jedoch keine Plasmodesmata aufweist, erscheint diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Auch ein Zusammenhang mit dem Absterben der Synergiden kann ausgeschlossen werden, da das ZmMADS2-GFP Fusionsprotein weder im Zytoplasma noch in Kernen des Embryosacks oder des eindringenden Pollenschlauchs vor, während oder nach der Befruchtung beobachtet werden konnte.

In *Arabidopsis* ist eine Interaktion zwischen den MADS-Box Proteinen PI und AP3 für deren Import in den Kern notwendig (McGonigle et al., 1996). Obwohl ZmMADS2 *in vitro* Homodimere bildet, könnte *in vivo* ein Ko-Faktor zum Kernimport notwendig sein. Für das Meristem-Identitätsgen *LEAFY* wurde z. B. gezeigt, daß es sowohl Homo- als auch Heterodimere mit unterschiedlichen Partnern bilden kann, die verschiedene Funktionen erfüllen (Scheres, 1998). Von Immink et al. (2002) wurde gezeigt, daß das Ovarium-spezifische MADS-Box Gen *FBP2* der Petunie ebenfalls zur Homo- und Heterodimerisierung in der Lage ist. Die Dimerisierung findet im Zytoplasma statt und die NLS beider Bindungspartner sind notwendig zum Import in den Kern. Im Gegensatz zu früheren Experimenten, konnte hier in lebenden Pflanzen demonstriert werden, daß das Fehlen der Kernlokalisierungs-Sequenz bei einem der Bindungspartner ausreichend ist, um das Dimer im Zytoplasma zurückzuhalten. MADS-Box Proteine, die keine Homodimere bilden können, werden nur in Anwesenheit eines geeigneten Bindungspartners in den Kern transportiert. Die Mutation der NLS eines zur Homodimer-Bildung fähigen MADS-Box Gens führt zur teilweisen Zurückhaltung des Proteins im Zytoplasma. Aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse mit dem Hefe Two-Hybrid-System und der Beobachtung spezifischer Fluoreszenz der Bindungspartner *in planta*, postulieren die Autoren, daß die Homodimerisierung in Pflanzen durch Ko-Faktoren oder Modifikationen gesteuert wird. Da GFP-Fluoreszenz im Allgemeinen relativ schwach ist, wurde ev. Im Zytoplasma der großen vegetativen Zelle zurückgehaltenes ZmMADS2-GFP Protein nicht detektiert, wohingegen deutliche Signale des hoch konzentrierten Proteins in Kernen der Anthere beobachtet werden konnten.

4.4. Die Verwendung von PGM ermöglicht transiente Promotor-Analysen in Pollen von Mais und anderen Arten

Die transiente Transformation von Pollen mit Reportergenen wurde bei verschiedenen Arten erfolgreich zur Definition regulatorischer Bereiche in Promotoren von späten Pollengenen eingesetzt. Für Mais konnte diese Methode bisher nicht angewendet werden, da keine zufriedenstellenden Resultate erzielt werden konnten. Hamilton et al. (1992) entwickelten daher ein Protokoll zur transienten Transformation von *Tradescantia paludosa* als Modell-Organismus. Obwohl viele Promotoren von monokotyledonen Pflanzen in Tabak die selbe Gewebespezifität zeigen, konnte demonstriert werden, daß ihre Regulation im heterologen System durch andere Mechanismen erfolgte, als in der Ursprungsart (Takaiwa et al., 1991; Luan and Borgorad, 1992). Zudem wurde die Expression des Endosperm-spezifischen Transkriptionsfaktors *Opaque2 (O2)* aus Mais auch in Embryonen von Tabak detektiert. *O2* reguliert die Synthese von Speicherproteinen, die im Gegensatz zum Mais, im Tabak auch im Embryo akkumulieren (Gallusci et al., 1994). Diese Daten unterstreichen die Notwendigkeit, Promotor-Analysen in der Ursprungsart vorzunehmen. Für die Analyse Pollen-spezifischer Promotoren aus Mais war vor allem die sehr schlechte Keimfähigkeit auf Medium problematisch (Hamilton et al., 1992; 1998; Heuer, 1999; Heuer et al., 2000). Da Hamilton et al. (1992) in sehr wenigen Experimenten Maispollen erfolgreich transformieren konnten, wurde das von den Autoren verwendete Keimungsmedium als Basis zur Herstellung eines geeigneten Protokolls verwendet. Pollenschläuche von Mais zeigen mit bis zu 0,5 cm/h eine sehr hohe Wachstumsgeschwindigkeit und müssen bis zum Embryosack eine Strecke bis zu 25 cm zurücklegen (Bedinger und Russell, 1994). Hierzu ist eine große Menge an Nährstoffen, vor allem Zucker, nötig. In Medium mit einem Gehalt von 16 % Saccharose konnten Keimunsraten von durchschnittlich 50% beobachtet werden. Eine Reduzierung der Borsäure-Konzentration auf 0,005% erhöhte die Keimungsrate auf durchschnittlich 96% (Schreiber und Dresselhaus, 2003). Die hohe Wachstumsrate und die hohe benötigte Zuckerkonzentration lassen darauf schließen, daß Maispollen große Mengen an Saccharose aus dem Medium aufnehmen und somit der osmotische Druck im Innern des Pollenschlauchs relativ hoch ist. Durch Zugabe von 6 % PEG 4000 konnte ein stabiler, hoher osmotischer Druck erzeugt und außerdem die Viskosität des Mediums erhöht werden, so daß festes PGM mit einer Konzentration von 0,3% Agar verwendet werden konnte. Auf diese Weise konnte das Platzen der Pollenschläuche beim Eindringen in das feste Medium verhindert werden. Durch welchen Mechanismus die Verzweigung der Pollenschläuche bei Konzentrationen von

100 mM CaCl₂ verursacht wird, ist weiterhin ungeklärt. Die *in vitro* Keimfähigkeit von Maispollen ist nicht abhängig von der Tages- oder Jahreszeit. *In vivo* bestehen jedoch Unterschiede, die sich z. B. in einem unterschiedlichen Kornansatz nach Bestäubung zu unterschiedlichen Tageszeiten äußern. Es ist jedoch anhand der oben angeführten Daten unwahrscheinlich, daß verminderte Fertilität von am Nachmittag gesammelten Pollen auf eine geringere Keimfähigkeit zurückzuführen ist. Zur Isolierung von Spermzellen wird das Platzen der Pollenkörner ausgelöst. Bei nach 10.00 Uhr gesammelten Pollen sind nur sehr wenige intakte Spermzellen auffindbar (J. Bantin, pers. Mitteilung). Es ist daher wahrscheinlich, daß der Tageszeit-abhängige Kornansatz durch Eigenschaften der Spermzellen bedingt ist und nicht durch verminderte Wachstumsfähigkeit der vegetativen Zelle.

Um die mögliche biotechnologische Anwendbarkeit einer Promotorsequenz zu untersuchen, ist ein Vergleich der Aktivität eines speziellen Promotors in verschiedenen Arten notwendig. Bei der Analyse eines Pollen-spezifischen Promotors, wie dem von *ZmMADS2*, sollten konstante Keimungs-Bedingungen geschaffen werden, um vergleichbare Ergebnisse mit Pollen unterschiedlicher Arten zu erzielen. Die Keimfähigkeit von Pollen verschiedener mono- und dikotyledoner Arten auf PGM ermöglicht jetzt solche Analysen für eine große Anzahl von Pflanzenarten.

4.5. Schlußfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine Heterodimer-Bildung von *ZmMADS2* mit anderen potentiellen Bindungspartnern nicht untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Kernimport von *ZmMADS2* im Pollenschlauch durch Bindung an einen Partner ohne NLS verhindert wird. Das Fehlen der von Immink et al. (2002) postulierten Ko-Faktoren im männlichen Gametophyten könnte eine Homodimerisierung von *ZmMADS2* und somit den Kernimport verhindern. Einige MADS-Box Transkriptionsfaktoren agieren als Repressoren, andere als Aktivatoren. Beispielsweise wird die Expression von *API* durch *AG* negativ reguliert (Gustafson-Brown et al., 1994). Wird die C-Klasse Funktion von *AG* ausgeschaltet, sind A-Klasse Proteine auch in den Wirteln drei und vier aktiv, was zu einer homeotischen Transformation von Staubgefäßen und Narbe zu Kelch- und Blütenblättern führt. *API* wiederum unterdrückt die Expression von *AGL8* (Mandel und Yanofsky, 1995). Aufgrund des Ergebnisses, daß *ZmMADS2* zur Reifung der Antheren und Pollen benötigt wird, erscheint diese Funktion eher unwahrscheinlich. Von Zik und Irish (2003) wurde bei der Identifizierung

verschiedener Target-Gene von AP3/PI gezeigt, daß das Heterodimer sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Genexpression agiert. Da *ZmMADS2* in metabolisch sehr aktiven Zellen, dem Tapetum und dem Pollenschlauch, exprimiert ist, erscheint eine Funktion von *ZmMADS2* als Aktivator, z. B. des aktiven Exports von Wasser, wahrscheinlicher. Unterstützt wird diese Hypothese durch das Vorhandensein mehrerer *cis*-Elemente im Promotor von *ZmMADS2* die durch Zucker, Trockenheit und Abszisin säure reguliert werden. Da das *ZmMADS2*-Transkript in hoher Konzentration im reifen, trockenen Pollen vorhanden ist und zu Beginn der Keimung in den Pollenschlauch transportiert wird, läßt den Schluß zu, daß das Protein eine aktivierende Funktion während des Pollenschlauchwachstums ausübt. Denkbar wäre auch eine Aktivierung der Chromatin-Kondensation, die ein Kennzeichen der Apoptose ist und ebenfalls in den Kernen von Spermzellen auftritt. Da das *ZmMADS2*-GFP Fusionsprotein im Pollen und im Pollenschlauch nicht sichtbar war, könnten Fusionsproteine mit sensitiveren Markergenen (z. B. *ZmMADS2*-GUS) hergestellt und zur stabilen Transformation von Mais-Embryonen eingesetzt werden. Anhand solcher transgener Pflanzen könnte auch die Lokalisierung von *ZmMADS2* innerhalb der Wurzelspitze aufgeklärt werden. Zur Klärung der Frage, welche Faktoren an den *ZmMADS2*-Promotor binden, könnte ein One-Hybrid-Screen mit den oben aufgeführten *cis*-Elementen durchgeführt werden. In einem weiteren Two-Hybrid-Screen mit der Verwendung einer Pollen- und einer Antheren-cDNA Bank als "Beute"-Vektor könnte geklärt werden, ob *ZmMADS2* in den verschiedenen Geweben mit unterschiedlichen Partnern interagiert. Nach Isolierung der Bindungspartner, zu denen eventuell *ZmMADS1* gehört, könnten Fusionsproteine mit unterschiedlichen Markergenen (z. B. den GFP Farb-Varianten) erstellt und eine Interaktion in Doppel-Transformanten visualisiert werden. Aufschluß über die Funktion von *ZmMADS2* könnten ebenfalls transgene Pflanzen geben, die *ZmMADS2* ektopisch exprimieren. Bei diesen Pflanzen könnten eine höhere metabolische Aktivität und in Folge dessen beschleunigte Alterungsprozesse der Zellen auftreten. Zur Identifikation von *ZmMADS2* Target-Genen könnten "knock-out"-Pflanzen und Überexpressions-Mutanten im Micro-Array eingesetzt werden. Zielgene von *ZmMADS2* sollten hier eine deutlich veränderte Expressionsstärke zeigen. Gene, deren Expression *in planta* von *ZmMADS2* aktiviert wird, sollten eine geringe Expressionsstärke in "knock-out"-Pflanzen und ein hohes Expressionsniveau in Überexpressions-Mutanten aufweisen. Zur Herstellung männlich steriler Mais-Pflanzen könnten Konstrukte mit dem *Barnase*-Gen unter der Kontrolle von *ZmMADS2*-Promotor Deletionen generiert werden. Hierzu könnte der in pDNS-8 (siehe Abb. 3.4B und 3.7B)

enthaltene Promotorabschnitt verwendet oder die Boxen 2 und/oder 3 in Kombination mit einem Minimal-Promotor eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die genomische Struktur und die Funktion des späten Pollengens *ZmMADS2* aus *Zea mays* L. charakterisiert. *ZmMADS2* wurde als spätes Pollengen definiert und zeigt eine spezifische Expression in reifen Pollen und Antheren einen Tag vor der Anthese, sowie eine sehr schwache Expression in Antheren zwei Tage vor Anthese und in Wurzelspitzen. Eine Expression in anderen Geweben konnte nicht nachgewiesen werden.

Mittels "Genome-Walking" und genomischer PCR wurden insgesamt 7149 bp der genomischen Sequenz von *ZmMADS2* isoliert. Die Abfolge der funktionalen Domänen (MADS-Box, Inter-Region, K-Box und C-Terminus) von *ZmMADS2* spiegelt den typischen Aufbau eines MADS-Box Gens vom MIKC-Typ der Typ I MADS-Box Gene wieder. Homologievergleiche ergaben, daß *ZmMADS2* der AGL17 Unterfamilie der MADS-Box Gene angehört. An für MADS-Box Gene typischen Stellen sind insgesamt sieben Introns vorhanden. Aufgrund seiner ungewöhnlichen Größe von über 2,3 kbp wurde das Intron 2 nicht vollständig sequenziert. Datenbankvergleiche ergaben, daß innerhalb des Intron 2 eine in Wurzeln exprimierte Transkriptionseinheit eingeschoben ist. Mittels "Primer-Extension"-Analysen wurde die Lage des Transkriptionsstartpunktes von *ZmMADS2* an Position -310 relativ zum ATG Start-Codon bestimmt. Innerhalb der stromaufwärts gelegenen Promotorsequenz wurden putative Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren zwischen den Positionen -77 und -177 lokalisiert. Hier folgen, vom Transkriptionsstartpunkt aus gesehen, eine TATA-Box (Pos. -77), eine GC-Box (Pos. -104) und zwei CAAT-Boxen (Pos. -147 und -171). An der für Mais typischen Position etwa 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts konnte keine TATA-Box lokalisiert werden. An Pos. -36 befindet sich jedoch eine weitere GC-Box.

Zur Analyse regulatorischer Sequenzen innerhalb des *ZmMADS2*-Promotors wurde zunächst ein Keimungsmedium für Maispollen optimiert und anschließend ein Protokoll zur transienten Transformation entwickelt. Anhand von transienten Transformations-Experimenten in Pollen von Mais und Tabak mit dem *Luciferase*-Reporter gen unter der Kontrolle von sieben Deletionen des *ZmMADS2*-Promotors konnten regulatorische Bereiche auf den Sequenzabschnitt zwischen den Positionen -326 bis -210 und -497 bis -419 eingegrenzt werden. In diesem Bereich befinden sich mehrere metabolisch induzierte *cis*-Elemente (Saccharose, Abszisin säure, Trockenheit), die möglicherweise die Aktivierung des

ZmMADS2-Promotors in Pollen und Antheren vermitteln. Bekannte Pollen-spezifische *cis*-Elemente sind annähernd statistisch über die gesamte Promotorsequenz verteilt, so daß in Mais die Pollen-Spezifität vermutlich von bisher nicht identifizierten Elementen vermittelt wird. Anhand von transienten Transformations-Experimenten mit dem *GUS*-Reportergen konnte zusätzlich gezeigt werden, daß der 5'UTR von *ZmMADS2* für den Transport des *ZmMADS2*-Transkripts in den Pollenschlauch verantwortlich ist.

Um die Funktion von *ZmMADS2* zu untersuchen, wurden transgene Mais-Pflanzen hergestellt. Transgene Pflanzen, in denen die Aktivität von *ZmMADS2* durch die Expression eines Antisense-Konstrukts ausgeschaltet war, zeigten einen Arrest in der Entwicklung von Antheren und Pollen einen Tag vor Anthese: die Antherenwände trockneten nicht aus, die Antherenkammern sprangen dadurch nicht auf, es war auch keine Verlängerung der Filamente zu beobachten und die Ährchen öffneten sich nicht. Der Pollen war ebenfalls arretiert. Eine kleine Vakuole war noch vorhanden und die Kerne der Spermzellen waren rund anstatt sichelförmig. Veränderungen in Wurzelspitzen, wo *ZmMADS2* sehr schwach exprimiert ist, konnten nicht beobachtet werden. Die Tatsache, daß nach der stabilen Transformation von unreifen Maisembryonen mit dem *Barnase*-Gen unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors keine transgenen Pflanzen regeneriert werden konnten, deutet jedoch darauf hin, daß der *ZmMADS2*-Promotor auch in Wurzeln aktiv ist. Anhand von weiteren transgenen Pflanzen, die ein *ZmMADS2*-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *ZmMADS2*-Promotors exprimieren, konnte die Lokalisierung des Fusions-Proteins innerhalb der Anthere in Kernen von Zellen des Endotheciums und des Konnektivs nachgewiesen werden. Diese Zellen gehen kurz vor Anthese in den programmierten Zelltod (Apoptose). Hierbei nimmt die Menge an *ZmMADS2*-GFP mit Fortschreiten der Apoptose zu und erreicht ihr Maximum in Kernfragmenten innerhalb der Apoptosekörper. Die ausschließliche Detektion von *ZmMADS2* im Zellkern deutet eine Funktion als DNA-bindendes Protein an.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß *ZmMADS2* im Hefe Two-Hybrid-System Homodimere ausbildet. Anhand der oben aufgeführten Ergebnisse kann eine Funktion von *ZmMADS2* als Transkriptionsfaktor abgeleitet werden, der wichtige Vorgänge während des letzten Stadiums der Antheren- und Pollenreifung reguliert, sowie bisher nicht näher charakterisierte Funktionen während des Pollenschlauch- und Wurzelspitzenwachstums ausübt. Eine Funktion von *ZmMADS2* könnte in der Regulation des aktiven Exports von Wasser und/oder in der Aktivierung des Metabolismus während der Apoptose und der Pollenkeimung sein. Genauere Aussagen sind jedoch erst möglich, wenn Zielgene von *ZmMADS2* identifiziert sind. Demnach repräsentiert *ZmMADS2* den bisher einzigen MADS-Box Transkriptionsfaktor bei

Monokotyledonen Pflanzen, für den eine Aktivität während des programmierten Zelltods nachgewiesen werden konnte.

5. Literatur

- Agatep, R., Kirkpatrick, R.D., Parchaliuk, D.L., Woods, R.A. und Gietz, R.D.** (1998) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the Lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. *Technical Tips online* <http://tto.trends.com>
- Albertsen, M.C. und Phillips, R.L.** (1981) Developmental cytology of 13 genetic male sterile loci in maize. *Can. J Genet. Cytol.* **23**, 195-208.
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Ribas de Pouplana, L. Martinez-Castilla, L. und Yanofsky, M.F.** (2000) An ancestral MADS-Box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Sci. USA* **97**, 5328-5333.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. und Yanofsky, M.F.** (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* **24**, 457-466.
- Ambrose, B.A., Lerner, D.R., Ciceri, P. Padilla, C.M., Yanofsky, M.F. und Schmidt, R.J.** (2000) Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation of floral organ specification between eudicots and monocots. *Mol. Cell* **5**, 569-579.
- Angenent, G.C und Colombo, L.** (1996) Molecular control of ovule development. *Trends Plant Sci.* **1**, 228-232.
- Bass, H.W., Bordoli, S.J. und Foss, E.M.** (2002) The *desynaptic (dy)* and *desynaptic1 (dys1)* mutations in maize (*Zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase. *J. Exp. Bot.* **54**, 39-46.
- Bate, N., Spurr, C., Foster, G.D. und Twell, D.** (1996) Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J.* **10**, 613-623.
- Bate, N. und Twell, D.** (1998) Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol. Biol.* **37**, 859-869.
- Beadle, G.W.** (1932) Genes in maize for pollen sterility. *Genetics* **17**, 413-431.
- Bedinger, P.** (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**, 879-887.
- Bedinger, P. und Edgerton, M.D.** (1990) Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins. *Plant Physiol.* **92**, 474-479.

-
- Bereterbide, A., Hernould, M., Farbos, I., Glimelius, K. und Mouras, A.** (2002) Restoration of stamen development and production of functional pollen in an alloplasmic CMS tobacco line by ectopic expression of the *Arabidopsis thaliana* *SUPERMAN* gene. *Plant J.* **29**, 607-615.
- Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N. und Coen, E.** (1993) Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *PLENA* locus of *Antirrhinum*. *Cell* **72**, 85-95.
- Brettschneider, R., Becker, D. und Lörz, H.** (1997) Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 737-748.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. und Jones, R.L.** (2001) Biochemistry and molecular biology of plants. *Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, Maryland*, Dritte Auflage, Courier Companies, Inc.
- Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, M.F. und Alvarez-Buylla, E.R.** (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **214**, 365-372.
- Cacharrón, J., Saedler, H. und Teißen, G.** (1999) Expression of the MADS-Box genes *ZMM8* and *ZMM14* during inflorescence development of *Zea mays* discriminates between the upper and the lower floret of each spikelet. *Dev. Genes Evol.* **209**, 411-420.
- Carmona, M.J., Ortega, N. und Garcia-Maroto, F.** (1998) Isolation and molecular characterization of a new vegetative MADS-Box gene from *Solanum tuberosum* L. *Planta* **207**, 181-188.
- Chaubal R, Zanella C, Trimnell MR, Fox TW, Albertsen MC und Bedinger P.** (2000) Two male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall. *Am. J. Bot.* **87**, 1193-1201.
- Chaudhury, A.M.** (1993) Nuclear genes controlling male fertility. *Plant Cell* **5**, 1277-1283.
- Chen, X.M., Riechmann, J.L., Jia, D.X. und Meyerowitz, E.** (2000) Minimal regions in the *Arabidopsis PISTILLATA* promoter responsive to the APETALA3/PISTILLATA feed back control do not contain a CArG-box. *Sex. Plant Reprod.* **13**, 85-94.
- Cheng, P.C., Greyson, R.I. und Walden, D.B.** (1979) Comparison of anther development in genic male-sterile (*ms10*) and in male-fertile corn (*Zea mays*) from light microscopy and scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.* **57**, 578-596.
- Christensen, A.H. und Quial, P.H.** (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* **5**, 213-218.

-
- Coen, E.S. und Meyerowitz, E.M.** (1991) The war of the worls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.
- Colasanti, J., Yuan, Z. und Sundaresan, V.** (1998) The *indeterminate* gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell* **93**, 593-603.
- Colombo, L., Marziani, G., Masiero, S., Wittich, P.E., Schmidt, R.J., Sari Gorla, M. und Pè, M.E.** (1998) *BRANCHED SILKLESS* mediates the transition from spikelet to floral meristem during *Zea mays* ear development. *Plant J.* **16**, 355-363.
- Custers, J.B.M., Oldenhof, M.T., Schrauwen, J.A.M., Cordewener, J.H.G., Wullems, G.J. und van Lookeren-Campagne, M.M.** (1997) Analysis of microspore-specific promoters in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **35**, 689-699.
- DeVetten, N.C. und Ferl, R.J.** (1994) Transcriptional regulation of environmentally inducible genes in plants by an evolutionary conserved family of G-box binding factors. *Int J Biochem.* **26**, 1055-1068.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. und Subramani, S.** (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **7**, 725-737.
- Elmayan, T. und Tepfer, M.** (1995) Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rol D* promoter, domain A of the *35S* promoter and the *35S*² promoter *Transgenic Res.* **4**, 388-396.
- Eyal, Y., Curie, C. und McCormick, S.** (1995) Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. *Plant Cell* **7**, 373-384.
- Favaro, R., Immink, R.G.H., Ferioli, V., Bernasconi, B., Byzova, M., Angenent, G.C., Kater, M. und Colombo, L.** (2002) Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants. *Mol. Gen. Genet.* **268**, 152-159.
- Fernandez, D.E., Heck, G.R., Perry, S.E., Bleecker, A.B. und Fang, S.-C.** (2000) The embryo MADS domain factor AGL15 acts post-embryonically: inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* **12**, 183-197.
- Ferrandiz, C., Liljegren, S.J. und Yanofsky, M.F.** (2000) Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFUL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**, 436-438.
- Franklin-Tong, V.E.** (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* **11**, 727-738.
- Fukuda, H.** (1994) Redifferentiation of single mesophyll cells into tracheary elements. *Int. J. Plant Sci.* **155**, 262-271.

-
- Gallusci, P., Salamini, F. und Thompson, R.D.** (1994) Differences in cell type-specific expression of the gene *Opaque 2* in maize and transgenic tobacco. *Mol. Gen. Gene.t* **244**, 391-400.
- Gartner, P.J. und Nagl, W.** (1980) Acid phosphatase activity in plastids of senescing embryo suspensor cells. *Planta* **149**, 341-349.
- Goto, K. und Meyerowitz, E.M.** (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* **8**, 1548-1560.
- Grierson, C., Du, J.-S., de Torres Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M. und Bevan, M.** (1994) Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* **5**, 815-826.
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M.F. und Martienssen, R.** (1998) The *FRUITFUL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**, 1509-1517.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B. und Yanofsky, M.F.** (1994) Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* **76**, 131-143.
- Hamilton, D.A., Roy, M., Rueda, J., Sindhu, R.K., Sanford, J. und Mascarenhas, J.P.** (1992) Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant. Mol. Biol.* **18**, 211-218.
- Hamilton, D.A., Schwarz, Y.H. und Mascarenhas, J.P.** (1998) A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol* **38**, 663-669.
- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. und Huijser, P.** (2000) Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **21**, 351-360.
- Heard, J. Caspi, M. und Dunn, K.** (1997) Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS-box genes: characterization of *nmhc5*, a member of a novel subfamily. *Mol. Plant Mic. Int.* **10**, 665-676.
- Herrero, M. und Hormaza, J.I.** (1996) Pistil strategies for controlling pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.* **9**, 343-347.
- Heuer, S., Lörz, H. und Dresselhaus, T.** (2000) The MADS box gene *ZmMADS2* is specifically expressed in maize pollen and during maize pollen tube growth. *Sex. Plant Reprod.* **13**, 21-27.

-
- Heuer, S.** (1999) Isolierung und Charakterisierung von cDNAs aus Eizellen und Pollen von Mais (*Zea mays* L.) mit Homologie zu MADS-Box-Transkriptionsfaktoren. *Dissertation* Universität Hamburg, Shaker-Verlag, Aachen, ISBN 3-8265-6603-3.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. und Korenaga, T.** (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucl. Acids Res.* **27**, 297-300.
- Honma, T. und Goto, K.** (2000) The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete *cis*-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* **127**, 2021-2030.
- Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y. und Ma, H.** (1996) DNA binding properties of two *Arabidopsis* MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell* **8**, 81-94.
- Hulzink, R.J.M., de Groot, P.F.M., Croes, A.F., Quaadvlieg, W., Twell, D., Wullems, G.J. und van Herpen, M.M.A.** (2002) The 5'-untranslated region of the *ntp303* gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiol.* **129**, 342-353.
- Hwang, Y.-S., Karrer, E.E., Thomas, B.R., Chen, L. und Rodriguez, R.L.** (1998) Three *cis*-elements required for rice α -amylase *Amy3D* expression during sugar starvation. *Plant Mol. Biol.* **36**, 331-341.
- Immink, R.G. und Angenent, G.C.** (2002) Transcription factors do it together: the hows and whys of studying protein-protein interactions. *Trends Plant Sci.* **7**, 531-534.
- Immink, R.G.H., Gadella, T.W.J., Ferrario, S., Busscher, M. und Angenent, G.C.** (2002) Analysis of MADS Box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2416-2421.
- Irish, E.E.** (1997) Class II tassel seed mutations provide evidence for multiple types of inflorescence meristems in maize (Poaceae). *Am. J. Bot.* **84**, 1502-1515.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. und Okada, K.** (2001) The *DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2191-2209.
- Jack, T., Fox, G.L. und Meyerowitz, E.M.** (1994) *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell* **76**, 703-716.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. und Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.

-
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X. und Chiang, V.L.** (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol.* **35**, 993-1001.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E. Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y.J., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.-Y.M., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.-Y., Mak, T.W., Zúniga-Pflücker, J.C., Kroemer, G. und Penninger, J.M.** (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-552.
- Kapoor, S., Kobayashi, A. und Takatsuji, H.** (2002) Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene *TAZI* causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia. *Plant Cell* **14**, 2353-2367.
- Kobayashi, A., Sakamoto, A., Kubo, K., Rybka, Z., Kanno, Y. und Takatsuji, H.** (1998) Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in petunia. *Plant J.* **13**, 571-576.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M. und Goldberg, R.B.** (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* **2**, 1201-1224.
- Kramer, E.M. und Irish, V.F.** (1999) Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* **399**, 144-148.
- Lal, S., Choi, J.-H., Shaw, J.R. und Hannah, C.** (1999) A splice site mutant of maize activates cryptic splice sites, elicits intron inclusion and exon exclusion, and permits branch point elucidation. *Plant Physiol.* **121**, 411-418.
- Liljgren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B. Bowman, J.L. und Yanofsky, M.F.** (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766-770.
- Liu, F. und Schnable, P.S.** (2002) Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiol.* **130**, 1657-74.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schafer, E., Kudla, J. und Harter, K.** (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* **265**, 2-13.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T. und Chua, N.-H.** (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* **32**, 317-328.

-
- Luan, S. und Borgorad, L.** (1992) A rice *cab* gene promoter contains separate *cis*-acting elements that regulate expression in dicot and monocot plants. *Plant Cell* **4**, 971-981.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. und Yanofsky, M.E.** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**, 273-277.
- Mandel, M.A. und Yanofsky, M.F.** (1995) The *Arabidopsis* *AGL8* MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell* **7**, 1763-1771.
- Mao, L., Begum, D. Chuang, H., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E. und Wing, R.A.** (2000) *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* **406**, 910-913.
- Mascarenhas, J.P.** (1966) pollen tube growth and ribonucleic acid synthesis by vegetative and generative nuclei of *Tradescantia*. *Amer. J. Bot.* **53**, 563-569.
- Mascarenhas, J.P.** (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* **5**, 1303-1314.
- Matsunaga, S., Kawano, S., Takano, H., Uchida, H., Sakai, A. und Kuroiwa, T.** (1996) Isolation and developmental expression of male reproductive organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). *Plant J.* **10**, 679-689.
- McCormick, S.** (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* **5**, 1265-1275.
- McGonigle, B., Bouhidel, K. und Irish, V.F.** (1996) Nuclear localization of the *APETALA3* and *PISTILLATA* homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev.* **10**, 1812-1821.
- Mena, M., Mandel, M.A., Lerner, D.E., Yanofsky, M.F. und Schmidt, R.J.** (1995) A characterization of the MADS-box gene family in maize. *Plant J.* **8**, 845-854.
- Michaels, S.D. und Amasino, R.M.** (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 763-764.
- Miyoshi, H., Usami, T. und Tanaka, I.** (1995) High levels of *Gus* gene expression driven by pollen-specific promoters in electroporated lily pollen protoplasts. *Sex. Plant Reprod.* **8**, 205-209.
- Montag, K., Salamini, F. und Thompson, R.D.** (1995) *ZEMa*, a member of a novel group of MADS box genes, is alternatively spliced in maize endosperm. *Nucl. Acids Res.* **23**, 2168-2177.
- Muschietti, J., Eyal, Y. und McCormick, S.** (1998) Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell* **10**, 319-330.

-
- Neuffer, M.G., Coe, E.H. und Wessler, S.R.** (1997) Mutants of maize. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ng, M. und Yanofsky, M.F.** (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nature* **2**, 186-195.
- Okada, T., Zhang, Z., Russel, S.D. und Toriyama, K.** (1999) Localization of the Ca²⁺-binding protein, Bra r 1, in anthers and pollen tubes. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1243-1252.
- Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., DeWet, J.R., Helinski, D.R. und Howell, S.H.** (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856-859.
- Pang, S.-Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A.W. und Fromm, M.E.** (1996) An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* **112**, 893-900.
- Patterson, S.E.** (2001) Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 494-500.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E. Wisman, E. und Yanofsky, M.F.** (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-Box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Pennel, R.I. und Lamb, C.** (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**, 1157-1168.
- Prakash, A.P. und Kumar, P.P.** (2002) *PkMADS1* is a novel MADS box gene regulating adventitious shoot induction and vegetative shoot development in *Paulownia kaukamii*. *Plant J.* **29**, 141-151.
- Prestridge, D.S.** (1991) SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eucaryotic transcriptional elements. *CABIOS* **7**, 203-206.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. und Coupland, G.** (1995) The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc-finger transcription factors. *Cell* **80**, 847-857.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. und Werner, T.** (1995) MatInd and MatInspector - new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4878-488.
- Riechmann, J.L. und Meyerowitz, E.M.** (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* **378**, 1079-1101.
- Richberg, M.H., Aviv, D.H. und Dangl, J.L.** (1998) Dead cells do tell tales. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 480-485.
- Robson, F., Costa, M.M., Hepworth, S.R., Vizir, I., Pineiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J. und Coupland, G.** (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-

-
- time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J.* **28**, 619-631.
- Rogers, H.J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Lonsdale, D.M. und Twell, D.** (2001) Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol. Biol.* **45**, 577-585.
- Sanders, P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W. und Goldberg, R.B.** (2000) The Arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* **12**, 1041-1061.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scanlon, M.J., Henderson, D.C. und Bernstein, B.** (2002) SEMAPHORE1 functions during the regulation of ancestrally duplicated knox genes and polar auxin transport in maize. *Development* **129**, 2663-2673.
- Scheres, B.** (1998) A LEAFY link from outer space. *Nature* **395**, 545-547.
- Schreiber, D.N.S. und Dresselhaus, T.** (2003) Optimization of *in vitro* pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* **21**, im Druck.
- Seliger, H.H. und McElroy, W.D.** (1960) Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136.
- Shore, P. and Sharrocks, A.D.** (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **229**, 1-13.
- Sieburth, L.E. und Meyerowitz, E.M.** (1997) Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-365.
- Smart, C.M.** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126**, 419-448.
- Sommer, H., Beltran, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.-E., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z.** (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**, 605-613.
- Staiger, C.J. und Cande, W.Z.** (1990) Microtubule distribution in *dv*, a maize meiotic mutant defective in the prophase to metaphase transition. *Dev. Biol.* **138**, 231-42.
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J. und Leaver, C.J.** (2002) a custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **30**, 431-446.

-
- Tadege, M., Sheldon, C.C., Helliwell, C.A., Stoutjesdijk, P., Dennis, E.S. und Peacock, W.J.** (2001) Control of flowering time by FLC orthologues in *Brassica napus*. *Plant J.* **28**, 545-553.
- Takaiwa, F., Oono, K. und Kato, A.** (1991) Analysis of the 5' flanking region responsible for the endosperm-specific expression of a rice glutelin chimeric gene in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **16**, 49-58.
- Theißen, G. und Saedler, H.** (1995) MADS-Box Genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's "biogenetic law" revisited. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **5**, 628-639.
- Theißen, G.** (2000) Shattering developments. *Nature* **404**, 711-713.
- Theißen, G., Becker, A., Di Rosa A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.-U. und Saedler, H.** (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **42**, 115-149.
- Torres, M.A., Puigdomènech, J. und Stiefel, V.** (1995) Specific distribution of mRNAs in maize growing pollen tubes observed by whole mount *in situ* hybridization with non-radioactive probes. *Plant J.* **8**, 317-321.
- Toyofuku, K., Umemura, T. und Yamaguchi, J.** (1998) Promoter elements required for sugar-repression of the *RAmy3D* gene for alpha-amylase in rice. *FEBS Lett.* **428**, 275-280.
- Twell, D., Klein, T.M., Fromm, M.E. und McCormick, S.** (1989) Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. *Plant Physiol.* **91**, 1270-1274.
- Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R.A., Ushiba, J. und McCormick, S.** (1991) Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Gen. Dev.* **5**, 496-507.
- Ulmasov T., Hagen, G. und Guilfoyle, T.J.** (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* **19**, 309-319.
- Walden, D.B.** (1994) *In vitro* pollen germination. In: "The Maize Handbook" by M. Freeling and V. Walbot (eds.), Springer, New York, Inc., 723-724.
- Warmke, H.E. und Lee, S.L.J.** (1976) Improved staining procedures for semithin epoxy sections of plant tissues. *Stain. Technol.* **51**, 179-185.
- West, A.G., Causier, B.E., Davies, B. und Sharrocks, A.D.** (1998) DNA binding and dimerisation determinants of *Antirrhinum majus* MADS-Box transcription factors. *Nucl. Acids Res.* **26**, 5277-5287.
- Xie, M., He, Y. und Gan, S.** (2001) Bidirectionalization of polar promoters in plants. *Nature Biotechnol.* **19**, 677-679.

-
- Xu, H., Davies, S.P., Kwan, B.Y.H., O'Brien, A.P., Singh, M. und Knox, R.B.** (1993) Haploid and diploid expression of a *Brassica campestris* anther-specific gene promoter in *Arabidopsis* and tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 58-65.
- Yamada, T., Takatsu, Y., Manabe, T., Kasumi, M. und Marubashi, W.** (2003) Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of *Gladiolus*. *Plant Sci.* **164**, 213-221.
- Yanagisawa, S. und Schmidt, R.J.** (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.* **17**, 209-214.
- Yang, S., Sweetman, J.P., Amirsadeghi, S., Barghchi, M., Huttly, A.K., Chung, W.I. und Twell, D.** (2001) Novel anther-specific *myb* genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase expression. *Plant Physiol.* **126**, 1738-1753.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. und Meyerowitz, E.M.** (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-39.
- Yao, J.-L., Dong, Y.-H. und Morris, B.A.M.** (2001) Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1306-1311.
- Yi, Y. und Jack, T.** (1998) An intragenic suppressor of the *Arabidopsis* floral organ identity mutant *apetala3-1* functions by suppressing defects in splicing. *Plant Cell* **10**, 1465-1477.
- Zachgo, S., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z.** (1997) Pollen-specific expression of *DEFH125*, a MADS-box transcription factor in *Antirrhinum* with unusual features. *Plant J.* **11**, 1043-1050.
- Zhang, H. und Forde, B.G.** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407-409.
- Zhang, H. und Forde, B.G.** (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* **51**, 51-59.
- Zik, M. und Irish, V.F.** (2003) Global identification of target genes regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* floral homeotic gene action. *Plant Cell* **15**, 207-222.

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Dr. Thomas Dresselhaus für die sehr gute Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und die Vermittlung der Finanzierung meiner Arbeit bedanken. Diese Arbeit wurde zum Teil von der Südwestdeutsche Saatzucht (Rastatt) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Dr 334/2-3) finanziert. Thomas hat mir auch die Teilnahme an verschiedenen Kongressen im In- und Ausland, sowie den Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Lucia Colombo in Mailand, ermöglicht. Mein Dank gilt Prof. Dr. Horst Lörz für seine Unterstützung und die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Gruppe durchzuführen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern des "Goldlab" Gisind, Jörg, Suseno, Steffi, Mihaela, Preeti und Thomas, die immer für gute Stimmung und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Neben fachlicher Diskussion und Unterstützung wurde bei uns auch viel gelacht. Dr. Sigrid Heuer danke ich für die fruchtbaren Diskussionen und die Möglichkeit, auf ihren Ergebnissen aufbauen zu können. Sigrid und Thomas gilt außerdem mein Dank für das Korrekturlesen und viele gute Anregungen.

Bei Dr. Reinhold Brettschneider bedanke ich mich für die Hilfe bei der Transformation und die ständige Diskussionsbereitschaft. Dr. Patricia Lauert gilt mein Dank für die Hilfe bei den Primer-Entensions Experimenten und Karen Dehn für die tatkräftige Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie. Bei Dr. Herrmann Schmidt möchte ich mich für die fruchtbaren Diskussionen und die Herstellung der Konstrukte zur stabilen Transformation bedanken.

Bei meinem Aufenthalt in Mailand war vor allem Dr. Rebecca Favaro eine geduldige Hilfe bei der Durchführung der Hefe Two-Hybrid Experimente. Bei Rebecca und Clara Lago möchte ich mich für die Unterstützung und die freundliche Aufnahme bedanken.

Meinen Freunden, meiner Familie und meinem Nachbarn Edgar Greve möchte ich für die ständige Aufmunterung und Unterstützung danken, für Rückhalt und Spaß, auch in schwierigen Situationen.

Und nicht zuletzt gilt mein Dank den Brez'n Bäckern aus Bremen und ihren Kunden, die einen großen Teil meines Studiums finanziert und mir damit die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit durchzuführen!

Anhang

1. Genomische Sequenz von *ZmMADS2*

			Box IV	CT	-1501
GAAGCTGTCG	TGTTCCCTCAC	GTCGATTGGC	TACAAATGTA	TGTAACATAG	
TAAATCTGAT	TGAAAAGTTA	AATCTTAATA	ATTATTATTA	CGACAAACTA	-1401
AAAACCTATT	CCATTTCTTT	GCATATGAAA	AATACAGGTA	TTCCATGTAA	
TATAGGAACA	AATGTATAAT	GCGGCTACTT	TGATGAACAA	TTTATAAATG	-1301
CATTA AAA AGG	TATGTAACAT	AATAAATCCG	TCATGTAATG	TTGTAAC TAT	
ATAAAATAGC	AACATAAATT	TAATTGCAAC	TAAAAACCGC	CTTTTTCTAT	-1201
GCGAAATAAT	TTACACTAGC	TTCATATAGG	AATAGATGGA	AAACCAAATC	
ATTAATGTCT	GCATTATCAT	GCATTATTCT	GGTATGAAGA	AAGAGCGCGT	-1101
ATAGCCAGCA	TGACAGATCC	ATTGTTTACA	ACAAATGTTC	AAAGGTGGTA	
AAGTAAAGAC	CTCGACCGGA	ACCATTGGGC	CCACTTGCAA	AATTTAATGG	-1001
TGATTCTACA	TCTAAAATGT	TTTGTTTCAA	ATATAAGACA	ATATGGTTGT	
ATCTTTGCTT	TTACCCCAAT	GGGTTCTATC	AATGATGGTT	GAGGTCCTCC	-901
			Box III		
ATTATTTAGG	ATGTGGTCAA	GTGCATCAAC	GAATATGATC	ACTTCTACAC	
<u>TCGACGGTTC</u>	TCCTAAATTT	ATACAGTATT	<u>ACAGTTATAT</u>	ATTTATAGTT	-801
ATATATTTAT	GATACTTTAA	ATGGAATCAG	AAATAGAATG	CAATGCTTAA	
ATAAAACCAA	TGAATCTTAA	AGAAAGATTT	GGATCCAGAT	ATAGTCCAGC	-701
AACTTATGAC	AATAGTATAC	ATATAATGCC	AATGCCAACA	TGTTTCAAGT	
			Box II		
GCTCTTAAAA	ACTATGTACA	TTTTCTGCTT	CGTTTACTCA	AATACGTA AAA	-601
ATAGCACTGC	TCTATAATAA	GTACATCTAT	TATCACCTAT	AAAAC TTTT	
CCAGCAACAT	TTATATAATT	TGTGCATCAT	TAATTTTAAAC	AACACTTATA	-501
AATTAGCTCA	AATACGTAAC	AAAGCGCGCC	CATGGGCGCG	CTCAAGCTAC	
<u>TAGTTCTTAT</u>	<u>ACAGTGAAAA</u>	<u>CAATACTACT</u>	<u>ATATTAGACA</u>	<u>TAAAATTAGG</u>	-401
TGTAGTTTAT	TTATTTACTG	GTACTACTTC	TTTAAGTCAT	AATTAGGTGT	
			Box I		
ACTAGAAGCT	ACTACGCCCT	GACGGAGACA	AGCACGCACA	ATAGAAAAGA	-301
GCGCCCTCGT	GCTCAGAGTG	CTCGCCTTTA	GTTTCGTGGC	TACTATATAC	
<u>TAGCTGCGAC</u>	<u>GATTTTTATT</u>	<u>TTCTTTCTCT</u>	<u>TCTGGGCTAT</u>	<u>CATTAGCACG</u>	-201
GCCATTTAGG	GGTAATGAGC	AGCGGCCAA T	AAACAAAGCC	CTGGGGTAGC	
<u>CAATCGGGTG</u>	<u>TCGCCGTGCG</u>	<u>CGCGCGCGCG</u>	<u>CGTCTGGCCT</u>	<u>CCTGCCCTCC</u>	-101
TCCTCCCTTT	CCTTGCTAAA	TAAAGCAAGT	AGCAGATAGG	GGAAAGTCTG	
CTCGCAAGTT	GCAT <u>CCGCC</u>	TGCGCCAAGA	AAAGCCATCG	TTCTTCCAC	-1
TIS			Exon 1		
AAACGCACAC	ATAGAAGCAT	CATTCCCCTC	TCGGCTAGCT	TCCTCCTCTC	50
TCCCTCCTCT	TCGTCTTCCT	CTTTCCTTCT	CCCTTGGGAA	ACCTGCTGCC	
			Box 0		
TTTGAGCTTT	CTTCTTCGAG	TGCTCCCACC	AGATCTCCTC	CTCCTTACCT	150
TCTTTGGCAC	GTTTCGGCGG	GCGCGCGGAG	ATAGATAGAT	CCCGCCATCG	
<u>TCGTCG</u> CCGT	CCTTGCTTCC	GATCGGAGGG	CCACAACCAC	AACCTCTCGC	250
TCCTTAGCGT	GCGCGCGCGA	GCCAGGGTCA	AGAAGAGAGC	TAGCTATAGG	
	START				
CCGGAGATCG	ATGGGGAGGG	GAAAGATCGT	GATCCGCAGG	ATCGATAACT	350

	M G R	G K I V	I R R	I D N	
CCACGAGCCG	GCAGGTGACC	TTCTCCAAGC	GCCGGAACGG	GATCTTCAAG	
S T S R	Q V T	F S K	R R N G	I F K	
AAGGCCAAGG	AGCTCGCCAT	CCTCTGCGAT	GCGGAGGTCG	GCCTCGTCAT	450
K A K	E L A I	L C D	A E V	G L V I	
CTTCTCCAGC	ACCGGCCGCC	TCTACGAGTA	CTCTAGCACC	AGGTCGTCGC	500
F S S	T G R	L Y E Y	S S T	S	
			Intron 1		
CCTTCGATTA	TTATCCGTCC	CTGCTTTAAT	TAATTTAATA	CTTCAATAAT	
GCCAACTGTT	TTCTTGCTCC	TGTTGAAGCG	ATATACTATA	TATAATAATA	600
GAGTTGTTCT	TGGCTTCTTG	CITTAATTAG	TTTGGGTTAT	CGATTGCATT	
TTATGATTG	AAACTACACA	CTACCTGTCT	CATATACATG	GACTGGCGAG	700
AGTGATTATG	GACCTATACA	CCATGTATAC	ACAAGTCCTA	AGGTAGACAA	
AAGATTTTAA	TTTACCTGTC	GATTGTCGAA	TATTGACTGT	ACATATAGCG	800
CACAGAGCTA	GCAACAACAC	TCCTGGTTTT	TTTGACGGGG	CAAGCAAGAT	
CTGTGTATGC	GGTCTAACAA	TAAAATACAA	TCTTTGGTAC	GGTTAGTATT	900
TGTGTTTTTG	CCCCTCTTCT	TCCTTGTTGT	TTGGTCTATT	TGAACTATTA	
TTCCTCTCCA	AAAAATTCCC	TATGTATCAT	CGGAATTTAT	ACTCATCCCT	1000
TGCATTGTGT	GCCATATATT	GAGTGGCATA	TAGTAGGGAA	CATATGCAAA	
ACTAAATTTA	ATTAGCTTTG	TCATATTGTT	TCATGTGATC	AACTCGACAC	1100
AGCATGTCAT	TGCAGTAGGA	AACGCATAGG	CTTTTGTGAT	GTAAGATATA	
TGTGTGTATA	TATATGCATG	GGGTTCTATC	CACAGGGGCT	GGTAGTGTTA	1200
CTGCCATCAG	AGAGTTTTTC	CCTAGAGAGA	GAGAGAGAGA	GAGCCTAGAT	
CCTAACTCCT	GTAATTAAGA	TTTTAACTTT	TTTAGATAGC	TATAAACTTA	1300
ATATTTTACA	ACGAATAGCA	TAGTAATAGT	TTTTTTTTTG	GATAAACTGA	
			Exon 2		
CATTTGTGCT	GTGTGCAGCA	TGAAATCAGT	TATAGATCGG	TACGGCAAGG	1400
		M K S V	I D R	Y G K	
CCAAGGAAGA	GCAGCAAGAC	GTCGCAAATC	CCAACCTCGGA	GCTTAAGTTT	
A K E E	Q Q V	V A N	P N S E	L K F	
			Intron 2		
TGCTCTAGAT	AATTTTTTCT	CTCTATTCTG	AAGTGTTTGC	TTGTTTAACT	1500
W					
AAAAGATTGC	TATATTTTTT	TGCTTTTCGT	TTTGATATAT	ATATCCTTTA	
AGTTTATGGT	TTTTAAGGAT	GGGAAGAAAT	TACACAACATA	TGGTCACATC	1600
AACAAGCGTC	CTACCTTTTT	TTATCTTATC	CAGCTGCTTG	ATCTTTTCTA	
GTTAACAAAA	AATAATTTCA	GTACTIONGAGG	ATGTCATCGG	ATTGCTTGTT	1700
TAGTTGGCCC	ATTATAAAAA	CGGTTTCGACC	AATCACGCTT	TCATATTATA	
TTATATTATA	TATGCTGCGT	GGATATGTAA	TCCCTAAACA	GCGCTAGTAT	1800
ATAAAGATCG	GAATGTCAAT	AATTCAGACC	AAGCCCAAGT	GCCCAACACA	
CCAGCTGGTT	AGGGATAGGA	ATCACATTTT	TTATTGATTG	GTTTCGGATT	1900
GTATATTTAA	CAATGGAATT	TTATTGAGGA	ATCAAGCAAC	AGACTACATA	
TTATTACAAA	GTACAAACTA	ATGAAATAAA	GATTAATAAT	TAACCATGCA	2000
TGGGACGCCC	ATCCTCAACG	ATGGTGTGAG	TTATCTCACT	TCTTGCTTCA	
ACTCTTTTAT	TTGGTGTTAT	CITATGCTCT	CAAAAGTGGC	ACATATAGAT	2100
GCAATTTAGT	ATTTCAITTA	TGCTTTTCCA	ACACCTTTTA	GTCACTAACA	
AGTTTGGATA	AGTTAGAGCT	GAAATAGAAC	ATGACCTACC	AAAAAAGGAA	2200
AATAAAGATG	AAAGGGAAAT	AAATATATAC	ATGACATCAA	TAGTAGTCAT	
GCTATATTAT	TAGGGGATCT	AAAGCTTGTT	CATATCGGTT	TCTCATGAGT	2300
TATTCTAGTT	AGAGCAGTAT	GCTGAGAGGT	CTCCCCTTGT	CGGTCCACAT	
TCAAATCCTT	GTACAACTTT	TTACTGCAAT	GCCTATAGGG	TGCCCTATGG	2400
TGGAGGTTTT	TACGCGGCCG	AGGTTCAATA	TCTAGGATCA	ATGTTACAAA	

GAGATGAGAT	TATCGATGGT	GTTATATTAG	CAATATATTT	AAAGTGAAGC	2500
ATGTGAAATG	GCGCCAAATA	TATGGCATTTC	TTCATGATAA	GTATGTGCCA	
TAGAAGCTAA	AGGTAAATTC	TATAGAACCT	GATAAAACTT	ATGATATTAA	2600
TATTGTATCG	TGCATAATGT	TGGTCTACTA	ATAATATGAC	GCATGCTCAA	
CATTTAAGTG	TCACATGTGA	ATGCAGATGT	TGCATTATAT	TCGAAATAAT	2700
ACAAAAGCAT	ATCAAGTCCT	AAATGATGAT	ATAAGGGATA	GGAGAGGGGT	
AGCACATTAA	AGAAAAACTT	GTCAAACATT	GATTGAGATG	GTTTGGATAT	2800
GTTCCGGTGA	GACCACTAGA	GCCATGAGAG	AACAATAAGA	TACAACAACA	
ATTTGAAGAT	GGCCAAGGTC	GATCAAACCT	TACATGGATG	ATGGCAATAA	2900
GAAGGGACTT	GAGAGTATGA	AATATACTTA	TACAAATTGT	CCTTGGATAG	
GAGTGTATAG	AAAGTAAATG	GGTTTGAAGA	ATAAACGGGC	TTTAAAAACC	3000
TCCACCATAG	GGCACCCCTAT	AGGCATTGCA	GTAAAAAGTT	GTACAAGGAT	
TTGAATGTGG	ACCGACAAGG	GGAGACCTCT	CAGCATACTG	CTCTAACTAG	3100
AATAACTCAT	GAGAAACCGA	TATGAACAAG	CTTTAGATCC	CCTAATAATA	
TAGCATGACT	ACTATTGATA	CCTCGGCCGC	GACCACGCT...		
			... <u>G</u> <u>TGCTTCTGTC</u>		3200
<u>TCTGAACACT</u>	<u>CTGAACAGGT</u>	<u>AGAAGAACCA</u>	<u>GCATTGACTA</u>	<u>AAAGGCACTC</u>	
<u>GGCACCCCTTC</u>	<u>AAATCATAAA</u>	<u>ATCAGGAGAT</u>	<u>CATTTACTTA</u>	<u>TACTGACATG</u>	3300
<u>TTCTTGTAAG</u>	<u>AATTTCCACT</u>	<u>CGCCTTGTTA</u>	<u>TGACTTCATG</u>	<u>AAGTCTGCTT</u>	
<u>GCAACATCCT</u>	<u>AACACAACAG</u>	<u>TACCCGCTGT</u>	<u>AATATCGTAC</u>	<u>CGTACTGCTT</u>	3400
GTTTATCCAG	AAAGTAAACG	AAGGCGCATT	AAAATAGCCT	CCACGTTGCA	
AAATTGGACA	AGTCAGATTG	CAATTTCTAC	TTCTAGTAAT	AAATATAGTT	3500
CCCTCTTAGT	TTTGTACTCT	TTCATTCCA	AGTTATAAGA	TGTTTTGGCT	
TTTCTAGACA	TTAATTTTTG	CCATGCACCT	GATATATACC	ATGTCTAGAT	3600
GCGTAGTAAA	ATCAATGTAT	CTAGAAAACC	CAAAGCACCT	TATAATACCT	
AAAACATCTT	ATAATTTGGA	ATGGATGAAG	TACCTAAGAG	CTGCTGTGTG	3700
TAATTGTGTA	TCATGCTGCA	AGATTCCAAC	TAAACGTCAT	GTCCTTACCA	
ACATATATCA	GTTAAAATCT	GTGCCAATGT	GTTTATTGAT	AACATAACCT	3800
			Exon 3		
GTTTCTTCAT	AGTTTTGGCA	AAGGGAGGCA	GCAAGCTTGA	GACAACAACCT	
	Q	R E A	A S L	R Q Q L	
			Intron 3		
GCACAACCTTG	CAAGAAAATT	ATCGTATGGT	TCGAAAACCC	TGCAAAAGTT	3900
H N L	Q E N	Y			
TCAAGCAAGT	TATTCATTAG	AACTTGAGT	G TTCAGAGAC	AGAAGCACAA	
TGCACAAGCA	TGCAACATCC	AAATGCAGGT	ACAAC TATTA	CACATTCATA	4000
GATAACAGAA	ACAATTAGCA	AGAGTCAAAT	TATCATGTGA	AAGGCTAGAC	
ATTAGACATC	AAAATACTTC	ATACGAGATA	AGTTGAACAT	GTGAAAATTA	4100
TTCTACGGCC	AACAATAAAA	CTAAAACAAA	ACAGGGATAT	CACAGTTAAA	
CTACTTCCCC	TGCTTCATTT	TAAAGGTGCA	TTTGCATTTG	CATTTGAACA	4200
AGTTTTTAAAG	GCTGTCTCTA	ACAGCTACCC	TATCACATCC	CCTATCTTAC	
CTCATATTAC	AAACTTCATT	CAGCAAACAG	TGTAATCTAG	AGTACAGTGC	4300
AAATCCTCTA	TTTTACACAA	TCTTGCTGCG	GATAGCCTAA	CATTGTACTT	
TGACCATGAA	TTTCTCTTAT	CCAATAAATC	CAAACCCAGA	AAATTCAATG	4400
TTGTTTCAA	AGCTTTGTGA	GATATGAATA	ATGATACAAT	TTTCATACAC	
TAAGACTGCA	TATAATTTGA	TTAACTGTTA	GACAAATTTT	GTAAAATTAA	4500
ACGGCCTTTT	TTCCATACAA	AAGAAACAGA	GGGTATATCA	AAACATATCC	
TGATGATGCT	CCAAACATTT	ATAGAGAAAA	CACACACATA	TATTGGCAAT	4600
TGGCAAACAT	AAGCTAGACT	GTGTGTGTAT	AATTGTATAA	TACACAACAT	
			Exon 4		
TAATTGCTGA	TGCCTATTAA	TTTGTTACAG	GGCAGTTGAC	GGGAGATGAT	4700
			R Q L T	G D D	

CTTTCTGGGC	TGAATGTCAA	AGAACTGCAG	TCCCTGGAGA	ATCAATTGGA	
L S G	L N Y K	E L Q	S L E	N Q L E	
			Intron 4		
AACAAGCCTG	CGTGGTGTCC	GCGCAAAGAA	GGTTTGATTG	TTAATCAAAT	4800
T S L	R G V	R A K K			
TTCTATAATC	AATTGTTCAA	TAAATTACTA	AAGATCGTTA	CTACTGTTGA	
			Exon 5		
TGCTCTTAAC	AGGACCATCT	CTTGATAGAT	GAGATTCACG	ATTTGAATCG	4900
	D H L	L I D	E I H	D L N R	
			Intron 5		
AAAGGTCTGT	AATATCGTGA	ATTTATAGTT	ATGTGTTTTA	TTTGATTTAG	
K					
			Exon 6		
TAGCACTGAC	TAACCACTTT	GTTGGTCACA	GGCAAGTTTA	TTTCACCAAG	5000
			A S L	F H Q	
AAAATACAGA	CTTGTACAAT	AAGATCAACC	TGATTGCGCA	AGAAAATGAT	
E N T D	L Y N	K I N	L I R Q	E N D	
			Intron 6		
GAGTTACATA	AAAAGGTAGC	TGATGAATTG	AACAAAATA	CCACTAACTG	5100
E L H	K K				
			Exon 7		
CCTAACCACA	CATATGACAT	GATATTAATT	GTTCTCAGAT	CTATGAGACT	
				I Y E T	
GAAGGACCAA	GTGGAGTTAA	TCGGGAGTCA	CCGACTCCAT	TCAACTTTGC	5200
E G P	S G V N	R E S	P T P	F N F A	
AGTAGTAGAA	ACCAGAGATG	TTCCAGTGCA	ACTTGAACTC	AGCACACTGC	
V V E	T R D	V P V Q	L E L	S T L	
			Intron 7		
CACAACAAA	TAACATTGAG	CCATCTACTG	CTCCTAAGCT	AGGGTATAAC	5300
P Q Q N	N I E	P S T	A P K L	G	
ATTTATTCTC	TCTATATATT	TCAATTGGTT	AACTAGTGTT	GACTACAGTG	
			Exon 8		
CTATAATGAG	TTGCTAAACA	CATGCAGATT	GCAATTAATT	CCATGAAGAA	5400
			L Q L I	P *	
GAGTAAACT	GCCGTCTTAT	GATGCTGAAG	GAAACTATTT	ATTGTGAAGA	
GATGATACTC	AGAGAAAGAC	ATATTTGTGG	CAGGGAGATT	TGAGATATGA	5500
ACTTATAAAT	GTAATGCAA	TAATTTTCAG	ACTGGAATGG	GGTCGTGGAA	
TTCAGAGGAT	GATTGCTTTC	TAGTTGCATT	TGATGTTTGA	TGAGACTTTT	5600
CTCATGTGAA	ACGTTTATTA	AAACTTCAA	ATGGTGCAGA	TGTTGCT	5647

Apex 1: Genomische Sequenz von *ZmMADS2* (Gene Bank Accession Nr. AY 227363)

Innerhalb des Promotors sind Boxen mit *cis*-Elementen grau unterlegt, Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren sind einfach, G-Boxen und metabolische Reaktionselemente doppelt unterstrichen (siehe auch Abb. 3.4). Exons sind durch Fettschrift hervorgehoben, die Aminosäuresequenz ist unterhalb der kodierenden DNA-Sequenz angegeben, das Stop-Codon ist durch einen Stern gekennzeichnet. Der Beginn des Transkripts ist durch höheren Schriftgrad und die fehlende Sequenz innerhalb des Intron 2 durch drei Punkte angedeutet. Die homologe Sequenz zu einem in Mais-Wurzeln exprimierten Gen (TUC05-31-460.1, siehe unten) innerhalb von Intron 2 ist kursiv geschrieben und unterstrichen.

2. Sequenz TUC05-31-460.1

TTTTCTCAT GAGTATTTGA TAGTTTTTTT CCCAATGCAA CGCAGGCATG
 TTTGTTAGTC ATTAGTAATA AAACATCAAT GCATCTTATT TACATGTTCT
 CAAATCAAAA TTTACATGTT GGTGACTAGG AATCCTTAAC ACACCAGTTA
 GCCTTTTTAT ATGAAGTTAA TTAGGAGATC CAACAGAGAA CAGTGTGTCT
 TACGAACTTG AATTCTACTG CTGTATGTTA TCTGGAACTC ATATTGCATC
 ACGAAAACAA TATGTCAGCA GATGCTTTAT CCAGTAAATG TTAGGAATTC
 TTTTGGCCAC TTCAGTTGTG TCACATGACA CTGGATTGTC AGAATTCTAG
 TGCTGTTGCA GAACATCCCA TGAACTCCGA AGTACCAGGC CGCAGGCCGT
 ATAGTTTACA TGCCAGAAGC TGCCTTCTAA TATAACCAGTC GTCTTCTACA
 ACCTTGCAAA ACAAAGAACG TATATGAAAC TCTCTATGCC AACCAATCCA
 GCCGGTTAAT TGTGCTCTAA AATATACGTG GCAGTGAAAT TAAGTTGGAA
 CAGGTGCAAG CTCTACTAAC ATCAAAGGT GTCGTAGAAT AGATACTGAA
CACTCTGAAC AGGTAGAAGA ACCAGCATTG ACTAAAAGGC ACTCGGCACC
CTTCAAATCA TAAAATCAGG AGATCATTTA CTTATACTGA CATGTTCTTG
TAAGAATTTT CACTCGCCTT GTTATGACTT CATGAAGTCT GCTTGCAACA
TCCTAACACA ACAGTACCCG CTGTAATATC GTACCGTACT GCTTGTTTAT
CCAGACCTGC AC

Apex 2: Transkriptionseinheit TUC05-31-460.1

(Mais-EST Datenbank unter www.zmdb.iastate.edu/)

Die Transkriptionseinheit wurde aus drei in Mais-Wurzeln exprimierten EST-Sequenzen zusammengesetzt. Der mit dem Intron 2 von *ZmMADS2* zu 100% überlappende Bereich ist kursiv geschrieben und unterstrichen.

Wissenschaftlicher Werdegang

Daniela Nicole Schreiber, geb. 1969 in Salzgitter

Diplomarbeit mit dem Thema "Sequenzierung von Teilen des *grp78*-

Gens und seines korrespondierenden Antisense-Gens bei

Neurospora crassa" in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. Rensing

1997 – 1998

Diplom, Note "Sehr gut"

1998

Promotionsarbeit im Fachbereich Molekularbiologie bei Prof. Dr.

H. Lörz mit dem Thema "Analyse des Promotors und der Funktion

des MADS-Box Transkriptionsfaktors *ZmMADS2* aus *Zea mays* L."

1998 – 2003

Promotion, Note "Sehr gut"

04.2003

Publikationen

Schreiber, D.N. und Dresselhaus, T. (2003) Optimization of *in vitro* Pollen Germination and Transient Transformation of *Zea mays* and other Plant Species. *Plant Mol. Biol. Rep.*

Schreiber, D.N., Heuer, S., Bantin, J. und Dresselhaus, T. (2003) The MADS-Box Transcription Factor Gene *ZmMADS2* is Required for Anther and Pollen Maturation and Accumulates in Apoptotic Bodies During Anther Dehiscence in Maize. Eingereicht bei *Plant J.*

Patente

Dresselhaus, T., Heuer, S., **Schreiber, D.N.** und Lörz, H. (1999) Male sterile Plants. EP99116267.8.

Dresselhaus, T., Heuer, S., **Schreiber, D.N.** und Lörz, H. (1999) Regulatory Sequences for pollen specific or pollen abundant gene expression in plants. EP99116268.6.

Einträge in Datenbanken

GenBank AY 227363; AY 264885