

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Bestimmung regulatorischer Elemente des
Indolglycerinphosphatlyasegens *Igl* von Mais (*Zea mays*)**

Oksana Kortés

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 05.03.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.04.2003 angenommen.

 Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Tritrophe Interaktionen in der Maispflanze.....	1
1.2 Evolutionäre Beziehungen der Gene der Indolglycerinphosphat-Lyasen aus Mais.....	3
1.3 Regulation der Genexpression bei Pflanzen.....	3
1.4 Identifizierung der regulierenden Komponente.....	4
1.5 Ziel der Arbeit.....	5
2. Material und Methoden.....	6
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	6
2.2 Primer und Oligonukleotide.....	6
2.3 Pflanzenmaterial und -anzucht.....	8
2.3.1 Verwendete Maislinien.....	8
2.3.2 Verwendete Gerstelinien und ihre Anzucht.....	8
2.3.3 Verwendete <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien und ihre Anzucht.....	8
2.4 Bakterienstämme und Plasmide.....	9
2.4.1 Bakterienstämme.....	9
2.4.2 Anzucht der Bakterienstämme und Transformation.....	10
2.4.3 Plasmide und Vektoren.....	10
2.5 Puffer und Medien.....	10
2.6 Methoden zur Analyse von DNA/RNA.....	14
2.6.1 Charakterisierung und Reinigung von DNA.....	14
2.6.2 Hybridisierungstechniken.....	14
2.6.3 PCR-Verfahren.....	14
2.6.4 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese.....	15
2.6.5 Quantitative PCR für Detektion eines Transcriptes mit Hilfe des Light-cyclers.....	15
2.6.6 Sequenzreaktionen.....	15
2.7 DNA-Klonierungstechniken.....	15
2.7.1 Reportergen-Konstrukte.....	16

2.8	Analyse von DNA- Protein-Wechselwirkungen.....	17
2.8.1	Gewinnung der Proteinextrakte.....	17
2.8.2	Radioaktive Markierung und Reinigung der DNA-Fragmente.....	17
2.8.3	Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	17
2.9	Histochemische Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität.....	18
2.10	Elicitierung mit Volicitin.....	18
2.11	Transiente Expression.....	18
2.11.1	Gewinnung, Elektroporation und PEG-Transformation von Protoplasten.....	18
2.11.2	„Particle Bombardment“ von Maisblättern und 4 Tage alten Keimlingen.....	20
2.11.3	Agrobakterientransfer zur transienten Expression.....	20
2.12	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.13	Transformation von <i>Hordeum vulgare</i>	22
2.13.1	Agrobakterienpräparation.....	22
2.13.2	Isolierung, Transformation und Inkubation der Gerste-Embryonen.....	22
2.13.3	Basta-Resistenz-Test.....	23
2.13.4	Embryo-Rescue-Methode und Segregationsanalyse.....	23
2.14	Computeranalysen.....	24
3.	Ergebnisse.....	25
3.1	Analyse des <i>Igl</i> -Promotors.....	25
3.1.1	Identifizierung von Sequenzmotiven und ihre <i>in vitro</i> -Untersuchung.....	25
3.2	Analyse von 5'-upstream-Sequenzen des <i>Igl</i> -Gens durch Transformation von Reporter-gen-Konstrukten.....	29
3.2.1	Klonierung von Reporter-gen-Konstrukten mit 5'-upstream-Sequenzen des <i>Igl</i> -Gens....	29
3.2.2	Transiente Expressionssysteme.....	33
3.2.3	Analyse von Reporter-gen-Konstrukten in heterologen Pflanzensystemen.....	35
3.2.3.1	Expression der Reporter-gen-Konstrukte in <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3.2.3.2	Herstellung transgener Pflanzen von <i>Hordeum vulgare</i>	45
4.	Diskussion.....	54
4.1	Bestimmung und Untersuchung von Sequenzmotiven im <i>Igl</i> -Promotor <i>in vitro</i>	54
4.2	Transiente Systeme.....	55
4.3	Reporter-genexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i>	56

4.4	Gerste <i>Hordeum vulgare</i> als heterologes Expressionssystem.....	61
4.5	Transformation von <i>Hordeum vulgare</i>	62
5.	Zusammenfassung.....	65
6.	Literaturverzeichnis.....	67
	Danksagung.....	78

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Acetosyringone	3'5'Dimethoxy-4-Hydroxy-acetophenone 97 % (ACROS , USA)
<i>Bar</i>	Phosphinotricin-Acetyltransferase-Gen; vermittelt Resistenz gegen L-Phosphinotricin
BAP	6-Benzylaminopurin
β -NAA	β -Naphtyl-Acetat-Säure (Auxin)
Basta	formuliertes Herbizid mit dem Wirkstoff Phosphinotricin (Fa. Hoechst)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>Bx</i>	Benzoxazinless-Gen
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Col-0	Columbia
c.f.u.	clone forming units
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DAPI	4'-6'-diamidine-2-phenyl indole (DNA Fluorochrome)
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-Tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERG	Eppendorfgefäß
Fa.	Firma
G	Guanosin
GUS	β -Glucuronidase
<i>Gus</i>	β -Glucuronidasegen
LC	Light-cycler

IGL	Indolglyzerinphosphatlyase
<i>Igl</i>	Indolglycerinphosphatlyasegen
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
L-PPT	L-Phosphinotricin
LUC	Luciferase
<i>Luc</i>	Luciferasegen
mcs	“multiple cloning site”
mM	millimolar
μM	micromolar
MS-Salze	Murashige & Skoog-Salze
<i>nos</i> -Terminator	Terminator des Nopalinsynthasegens aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCIB	2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
35S	CAMV ('Cauliflower Mosaic Virus')- 35S-Promotor
SSPE	Natrium-Phosphat-EDTA-Puffer
T	Thymidin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Glucuronsäure

1. Einleitung

1.1 Tritrophe Interaktionen in der Maispflanze

Sekundärmetaboliten werden von Pflanzen in ungeheurer Vielfalt gebildet, mehr als 200 000 unterschiedliche sekundäre Pflanzenstoffe sind bekannt. Sie dienen überwiegend zur Kommunikation mit der Umwelt, so werden sie zur Anlockung von Insekten durch Farbe und Duft (Anthocyane, Terpenoide etc.), aber auch zum Schutz gegen Schädlinge und Pathogene als chemische Abwehrstoffe eingesetzt. In das Arsenal der chemischen Abwehrstoffe gehören die Phytoalexine, deren Synthese bei Schädigung durch einen sogenannten Elicitor induziert wird (z.B. Isoflavonoide der Leguminosen, Jung et al., 2000; He und Dixon, 2000), und die Phytoantizipine, die unabhängig von der Anwesenheit des Schädlings synthetisiert und gelagert werden. Ein Beispiel für Phytoantizipine stellen die Benzoxazinoide der Gräser dar. In Mais wird das Benzoxazinoid DIMBOA entwicklungspezifisch im Keimling gebildet und als wenig toxisches Glucosid in der Vakuole gelagert (von Rad et al., 2001; Kreuz et al., 1996). Wird die Integrität der Zelle durch Insekten- oder Pathogenbefall zerstört, wird DIMBOA-Glucosid freigesetzt und kommt mit der spezifischen Glucosidase zusammen, die in der intakten Zelle im Chloroplasten gefunden wird. Es entsteht das toxische Aglucon. Auf großflächige Verwundung durch Fraß von Insektenraupen, Käfern und Milben reagieren viele Pflanzen mit systemischer Freisetzung von verschiedenen flüchtigen Substanzen (Takabaysahi und Dicke, 1996), vor allem sind dies Terpenoide und Indol. Durch diesen Cocktail flüchtiger Substanzen wird die Attraktivität der Pflanzen für natürliche Feinde des Herbivors erhöht. Die Synthese der Duftstoffe erfolgt *de novo* (Turlings und Tumlinson, 1992). Die „Tritrophe Interaktion“, die Mitglieder dreier Lebensbereiche, Pflanze, Herbivor und Parasit, miteinander verbindet, beruht auf der Wahrnehmung des Herbivors durch die Pflanze, einer induzierten spezifischen Biosynthese der Pflanze und der Interpretation des pflanzlichen Duftsignals durch den Parasitoiden. Wie bei der Bildung von Phytoalexinen handelt es sich hier um eine pflanzliche Abwehrstrategie, die auf der induzierten Synthese von Sekundärmetaboliten beruht. Im Gegensatz zur Bildung von Phytoalexinen sind die Glieder in der Signaltransduktionskette der tritrophen Interaktion nur wenig bekannt.

Zwei von Insekten stammende Elicitoren wurden mit der β -Glucosidase im Speichel von *Pieris brassicae* (Mattiacci et al., 1995) und *N*(17-hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin (Volicitin, Alborn et al., 1997, Abb. 1) im Speichel von *Spodoptera exigua* („beet army worm“) identifiziert. Die

Tatsache, dass es sich bei Volicitin um ein Aminosäurekonjugat mit struktureller Verwandtschaft zu den Jasmonaten handelt, führte zu der Vermutung, dass bei diesem Elicitor eine Verbindung zur Octadecanoid-Signalkaskade besteht (Turlings et al., 2000, Alborn et al., 2000). Jasmonate und Aminosäurekonjugate von Jasmonaten stimulieren verschiedene physiologische, entwicklungspezifische und abwehrrelevante Prozesse. Die Überschneidung von Phytoalexinproduktion bei Pathogenbefall und Emission von flüchtigen Substanzen nach Herbivorschädigung wurde für die Ebene der Elicitoren und der Signalwege gezeigt. Jasmonsäure, Jasmonsäurekonjugate und deren Analoga, wie auch das von einem pathogenen Pilz stammende Coronatin, sind in der Lage, bei verschiedenen Pflanzen die Ausbildung eines spezifischen Teilusters des herbivori-induzierten Duftcocktails zu induzieren (Boland et al., 1995; Krumm et al., 1995).

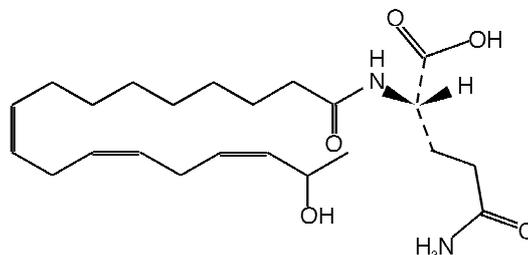


Abbildung 1: Struktur von Volicitin (*N*-(17-hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin)

Da die Biosynthese der flüchtigen Substanzen *de novo* erfolgt, sind Zielgene der Signaltransduktionskaskade in den Genen ihrer Biosynthese zu finden. Monoterpene und Sesquiterpene bilden anteilmäßig die bedeutendste Substanzklasse des Duftcocktails. Arbeiten von Turlings et al. (1999) deuten darauf hin, dass die volatilen Terpene möglicherweise über verschiedene Synthesewege (Mevalonsäureweg, Deoxyxylulosephosphatweg, Eisenreich et al., 1997) gebildet werden. Mais ist ein klassisches Untersuchungsobjekt für die tritrophe Interaktion (Turlings et al., 1990). Im induzierten Duft nehmen Mono- und Sesquiterpene den Hauptanteil ein, eine wesentliche Komponente bildet aber auch Indol. Indol ist häufiger Duftbestandteil und wird außer bei Mais z.B. auch bei Kohl, Baumwolle, Gerbera, Soja im Duft nachgewiesen, nicht aber im Tabak-Duft (Fritzsche Hoballah et al., 2002). Untersuchungen in unterschiedlichen Maislinien und ursprünglichen Wildformen (Teosinte) zeigen eine Variation im Muster der freigesetzten Terpene, alle Linien emittieren aber relativ konstant Indol (Gouinguéné et al., 2001). Bei Mais sind Zielgene der Herbivori-induzierten Terpenbiosynthese molekular isoliert: die Sesquiterpensynthase *Stc1* (Shen et al., 2000) und die Indolglycerinphosphatlyase *Igl* (Frey et al., 2000). Bei

beiden Genen wird eine Elicitor-induzierte Erhöhung der Transkriptmengen gefunden. In Mais kann die systemische Pflanzenantwort dadurch erzeugt werden, dass über den geschnittenen Stengel oder verwundete Blätter Volicitin verabreicht wird. In der unverwundeten Maispflanze ist *Igl* ein gering exprimiertes Gen, seine Transkripte werden etwa mit einer Häufigkeit von 10 ppm gefunden. Inkubation der Pflanze mit Volicitin führt zu einem etwa 50fachen Anstieg der Transkriptmengen. Diese Steigerung erfolgt schnell, das Maximum liegt bei 2 Stunden, und wird von einem raschen Abfall gefolgt, so dass nach 8 Stunden wieder weitgehend der Ausgangswert erreicht wird. Die Kinetik der *Igl*-Induktion ist in guter Übereinstimmung mit der Freisetzung von Indol nach Gabe des Elicitors.

1.2 Evolutionäre Beziehungen der Gene der Indolglycerinphosphat-Lyasen in Mais

Die Indolbildung steht in enger Beziehung zum Tryptophanbiosyntheseweg, in dem durch die Alpha-Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) aus Indolglycerinphosphat Indol gebildet wird. Die katalytische Aktivität von TSA ist abhängig von der Komplexbildung mit der Tryptophansynthase-Beta-Untereinheit (TSB). Indol wird nicht freigesetzt, sondern innerhalb des Enzymkomplexes mit Serin durch TSB zu Tryptophan umgesetzt. Den Prototyp einer Indolglycerinphosphat-Lyase, die die Bildung freien Indols katalysiert, bildet das *Bx1*-Gen der DIMBOA-Biosynthese (Frey et al., 1997). *Igl* ist ein zu *Bx1* homologes Gen (Frey et al., 2000). Der evolutionäre Ursprung von *Igl* und *Bx1*, der Gene des Sekundärstoffwechsels, wurde in der Alpha-Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) gefunden. Konservierung der Gensequenz, übereinstimmende Exon-Intron-Grenzen und die chromosomale Lokalisation von *Igl* deuten auf Genduplikation und Modifikation als Mechanismen der Ableitung des Gens des Sekundärstoffwechsels aus dem Primärstoffwechsel hin (Gierl und Frey, 2001).

IGL und BX1 haben ähnliche katalytische Kenndaten für die Bildung von Indol (Frey et al., 2000). Beide Enzyme können sich in Mais nicht funktionell ersetzen, in der Mutante *bx1bx1* (*benzoxazinless1*, Hamilton, 1964) werden nicht in nennenswertem Umfang Benzoxazinone gebildet, obwohl *Igl* intakt ist, und *Bx1* wird nicht durch Volicitin induziert. Die Funktion der Gene wird wesentlich durch Gewebespezifität und Zeitpunkt der Expression bestimmt.

1.3 Regulation der Genexpression bei Pflanzen

Die spezifische Regulation eines Gens wird durch die Kombination der *cis*-Elemente und die Verfügbarkeit und Aktivität von den sich an sie bindenden Transkriptionsfaktoren erzeugt. An der Regulation der Genexpression sind auf der Ebene der *cis*- und *trans*-Faktoren generelle (z. B.

TATA-Box, CAAT-Box; TFIIA, B, D, E, F, H) und spezifische Elemente beteiligt. Spezifische Transkriptionsfaktoren interagieren mit ihren Sequenzmotiven, die aus einer „Core-Sequenz“ in einer Matrixumgebung bestehen. Die Core-Sequenz stellt das zur Bindung des Transkriptionsfaktors absolut benötigte Motiv dar und umfasst z. T. nur vier Basenpaare. In der Promotor-Datenbank von Genomatrix Software GmbH, München, sind für 24 Gruppen von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren 46 Matrices verzeichnet. Paare von Transkriptionsfaktor und DNA-Bindemotiv sind definiert für Gene der Hormonantwort (z. B. Ethylenresponsefaktor), MADS-Box-Gene und Homeobox-Gene der Entwicklung, Gene der Anthocyanbiosynthese (z. B. P und C1 von Mais, Sainz et al., 1997; Hoekema et al., 1983; Lechelt et al., 1989), Gene der Speicherproteinbiosynthese (z. B. Opaque 2, Kemper et al., 1999; Yunes et al., 1994) und Gene der Pathogenantwort (z. B. WRKY, Robatzek und Somssich, 2001). In Bezug auf die Regulation der Genexpression ist bei Pflanzen die Flavonoidbiosynthese am besten aufgeklärt. Bei Mais bildet die Anthocyanbiosynthese ein Beispiel für die gewebespezifische Regulation eines Sekundärstoffbiosynthesewegs durch das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren: Im Aleuron des Maiskorns ist der MYBR2R3-Transkriptionsfaktor C1 zusammen mit dem bHLH-Protein R für die Aktivierung der Anthocyanbiosynthesegene verantwortlich (Paz-Ares et al., 1987; Cone et al., 1986; Ludwig et al., 1989; Martin und Paz-Ares, 1997). Dagegen kontrolliert P1, ein sehr ähnliches MYB-Protein, die Anthocyanbiosynthese in der übrigen Maispflanze. Auch dieser Faktor interagiert dabei mit Proteinen aus der R-Familie (Cone et al., 1993). Der zweite Sekundärstoffwechselweg, über dessen Regulation genauere Informationen vorhanden sind, ist die Synthese der Terpenindolalkaloide bei *Catharanthus roseus*. Für das Schlüsselenzym Strictosidinsynthase (*Str*), dessen Expression durch das Phytohormon Methyljasmonat (MeJa) induziert werden kann, wurden ausführliche Promotoranalysen durchgeführt (Menke et al., 1999; van der Fits et al., 2000). Dabei konnte ein Sequenzmotiv identifiziert werden, das für die Induzierbarkeit des *Str*-Promotors durch MeJa und Elicitoren verantwortlich ist (JERE, Jasmonate- und Elicitor-Responsive Element).

1.4 Identifizierung der regulierenden Komponente

Die Identifizierung von Komponenten der Transkriptionsregulation läuft über die Erkennung der spezifischen Sequenzelemente des Promotors. An die Erkennung der *cis*-Elemente schließt sich das „Fischen“ des Transkriptionsfaktors über Bindung an diese „Box“ über das „Yeast-One-Hybrid“-Verfahren oder „Oligotrapping“-Methoden (Planchais et al., 2002; Gadgil und Jarrett, 2002) an. Putative *cis*-Elemente der Regulation können *in silico* durch vergleichende Analysen

bestimmt werden oder *in vitro* durch den „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA). Dabei wird die Bindung von nukleolären Proteinen durch das unterschiedliche Laufverhalten von DNA und DNA-Protein-Komplexen bei Elektrophorese in nativen Proteingelen nachgewiesen. Zur Verifikation der so gefundenen für die Transkriptionsregulation relevanten Sequenzmotive wird eine *in vivo*-Analyse angeschlossen. Dazu werden Reporter-gen-Konstrukte in der Pflanze zur Expression gebracht. Als Reporter-gen fungieren das *uidA*-Gen aus *E. coli* (β -Glucuronidase, *Gus*, Jefferson et al., 1987 b) oder das GFP-Gen (Green fluorescent protein, Chalfie et al., 1994). Die Expression von Reporter-genkonstrukten wird auch zur Definition von Promotorelementen herangezogen. Dazu werden 5'-upstream-Sequenzen des zu untersuchenden Gens mit dem Reporter-gen verbunden, die durch verschiedene Teilbereiche des Promotors vermittelte Expression bestimmt und mit der Expression des endogenen Gens verglichen. Aus diesem Vergleich ergibt sich die Bedeutung einzelner Promotorbereiche für die Transkriptionsregulation des Gens. Für diese *in vivo*-Analyse werden transiente Expressionssysteme eingesetzt. Dies können Protoplasten und Zellkulturen oder isolierte Organe, z. B. Blätter sein, die durch Elektroporation oder „Particle Bombardment“ transformiert werden können. Voraussetzung für den Einsatz dieser Systeme in der Promotoranalyse ist, dass sie für das untersuchte Gen das gleiche Expressionsmuster vermitteln, wie die intakte Pflanze. Dies wurde für verschiedene Gene in *Arabidopsis* und Mais-Protoplasten gezeigt (Zusammengefaßt in Sheen, 2002). „Particle Bombardment“ von Blättern wurde in unterschiedlichen Analysen eingesetzt, z. B. zur Untersuchung von Resistenzreaktionen in Gerste (Shirasu et al., 1999). Auch Agrobakterien-Infiltration wurde erfolgreich als transientes Expressionssystem verwendet (Yang et al., 2000).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es Sequenzelemente des *Igl*-Gens zu identifizieren, die die Volicitin-induzierte Genexpression vermitteln. Dazu sollten Sequenzmotive über *in vitro*-Analysen oder mittels Reporter-gen-Konstrukten identifiziert werden. Die entsprechenden Analysensysteme sollten etabliert werden. Parallel dazu sollten Reporter-gen-Konstrukte erstellt und eine Analyse des *Igl*-Promotors durch stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* und *Hordeum vulgare* vorgenommen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), MBI Fermentas (Litauen), Gibco/BRL (Eggenstein), Sigma (USA), Duchefa (Haarlem, Netherlands), Roth (Karlsruhe), Stratagene (USA), Serva (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Promega (USA), Biolabs (USA) und Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Radioaktiv markierte Nukleotide (^{32}P α -dCTP, 3000 Ci/mol, ^{32}P γ -ATP, 3000 Ci/mol) wurden von Amersham Bioscience (Freiburg) bezogen.

2.2 Primer und Oligonukleotide

Die für PCR und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg), Sigma-Genosis (Großbritannien) und Sigma-ARK (Darmstadt) synthetisiert. Werden mittels der Primer Restriktionsschnittstellen eingeführt, ist ihre Position durch Unterstreichen hervorgehoben.

Primer für 0,5-kb-Promotor

“Bam H 1”	AAA CAA CGA <u>GGG ATC CAG</u> AAA GTT GCT G
“Nco 1”	TCG CGG AGG <u>CCC ATG GTC</u> TCT AGT ACG G

Primer für 0,36-kb-Promotor

No-motif BamH1	GAG AAA <u>GGG ATC CGC</u> TAA GGG CCT ACC
“Nco 1”	TCG CGG AGG <u>CCC ATG GTC</u> TCT AGT ACG G

Adapter 1 für die *Gus*-Intron-Klonierung

Linker-GUS-1(Oks)	CTA GAC CTT <u>GGA TCC TTG AGC TCC CAT GG</u>
Linker-GUS-2 (Oks)	CCA TGG GAG CTC AAG GAT CCA AGG T

Adapter 2 für pTG101B-Klonierungen

Hind-Ok1	CTA GTG CCT GAA <u>AGC TTA</u> CGT GAT
Hind-Ok2	CTA GAT CAC GTA <u>AGC TTT</u> CAG GCA

Primer für den Nachweis der Gerste-Transformation:

Gus-r-Fragment, positive Kontrolle

GUS-r-F	GCT GCG TTT CGA TGC GGT C
GUS-r-R	AGA GCA TTA CGC TGC GAT GG

TetA-Fragment, negative Kontrolle

O-TetA Forw	CGC CAC TGT CGA CTA CGC CAT C
O-TetA Rev	CCG TCA GGA AAT TGA GGC CGT TC

Oligonukleotide für Gel-Shift (80-mer)

1.4361-4420 F	CTA CAT ATG TAT TTA TTA TAG TCT AAA ATG GTG TGT GTG TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT
1.4361-4420 R	ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAC ACA CAC ACC ATT TTA GAC TAT AAT AAA TAC ATA TGT AG
2. 4421-4500 F	ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TTA ATT TTG TGT TTA TTT CAT AAT TTA GAG TAT AAA AAT ATT TAG GA
2. 4421-4500 R	TCC TAA ATA TTT TTA TAC TCT AAA TTA TGA AAT AAA CAC AAA ATT AAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT
3. 4481-4560 F	GAG TAT AAA AAT ATT TAG GAA GAG AAT ATT GAA TAC CTA GAT ATA GGA TGT CCG CTA CAG ATC ATG TAA AGT AGA GGC TT
3. 4481-4560 R	AAG CCT CTA CTT TAC ATG ATC TGT AGC GGA CAT CCT ATA TCT AGG TAT TCA ATA TTC TCT TCC TAA ATA TTT TTA TAC TC
4. 4541-4620 F	ATC ATG TAA AGT AGA GGC TTT ATA ATG TAG ATA TTA ATG TTT ATA AAA TGA GGT TTA AAA TAT AGG ATA AGA TAG GAA TA
4. 4541-4620 R	TAT TCC TAT CTT ATC CTA TAT TTT AAA CCT CAT TTT ATA AAC ATT AAT ATC TAC ATT ATA AAG CCT CTA CTT TAC ATG AT
5. 4601-4680 F	TAT AGG ATA AGA TAG GAA TAG GAT AGA ATA GCT GCT GAA AAC AAC GAG GGC GAG AGA AAG TTG CTG CCG TTT AGG GGT GG
5. 4601-4680 R	CCA CCC CTA AAC GGC AGC AAC TTT CTC TCG CCC TCG TTG TTT TCA GCA GCT ATT CTA TCC TAT TCC TAT CTT ATC CTA TA
6. 4661-4740 F	TTG CTG CCG TTT AGG GGT GGG AGA AAG GGT ACC GCT AAG GGC CTA CCT TAA ACA CGC GTA GGG GCG TGG GCT CAG CCT AG
6.4661-4740 R	CTA GGC TGA GCC CAC GCC CCT ACG CGT GTT TAA GGT AGG CCC TTA GCG GTA CCC TTT CTC CCA CCC CTA AAC GGC AGC AA
7.4721-4800 R	AGG AGG CCA GCC AGC TTC AGC AAC AGT GCA ACA CCC ATC AAC AGT GCT TTC TGT ACA TCT CTA GGC TGA GCC CAC GCC CC
8. 4781-4860 F	CTG AAG CTG GCT GGC CTC CTC GTC CCG CTG CTG CTA TAT ATA ATC TGT GGC ACG GTG GGC ATG GCA CCA GCA TCT CAT AT
8. 4781-4860 R	ATA TGA GAT GCT GGT GCC ATG CCC ACC GTG CCA CAG ATT ATA TAT AGC AGC AGC GGG ACG AGG AGG CCA GCC AGC TTC AG

Oligonukleotide für Gel-Shift mit dem ACS4-Motiv

IGL motif F	AAA ATA TAG GAT AAG ATA GGA ATA GGA TAG AAT AGC
IGL motif R	GCT ATT CTA TCC TAT TCC TAT CTT ATC CTA TAT TTT
IGL motif F MU	AAA ATA TAC <u>CAT AAC</u> ATA <u>CCA</u> ATA <u>CCA TAC</u> AAT AGC
IGL motif R MU	GCT ATT <u>GTA TGG</u> TAT <u>TGG</u> TAT <u>GTT ATG</u> <u>GTA</u> TAT TTT

Oligonukleotide für Gel-Shift (40-mer)

2A FW	TATATATATATATATATATATATATATATTAATTTTGTGTTTAT
2A RV	ATAAACACAAAATTAATATATATATATATATATATATATA
2B FW	ATATATATATATATATTAATTTTGTGTTTATTTTCATAATTTA
2B RV	TAAATTATGAAATAAACACAAAATTAATATATATATATATAT
2C FW	TATATTAATTTTGTGTTTATTTTCATAATTTAGAGTATAAAA
2C RV	TTTATACTCTAAATTATGAAATAAACACAAAATTAATATA
2D FW	TGTGTTTATTTTCATAATTTAGAGTATAAAAAATTTTAGGA
2D RV	TCCTAAATATTTTATACTCTAAATTATGAAATAAACACA

2.3 Pflanzenmaterial und -anzucht

2.3.1 Verwendete Maislinien

CI31A Inzucht Linie (Ac 2175, Dr.P.A.Peterson, USA)

bx1 Inzucht Linie (Ac H90-55, Dr.D.Weber, USA)

Keimlinge wurden ggf. nach der Sterilisierung bis zum Alter von 4-5 Tagen im Dunkeln bei 28 °C im Keimpapier oder bis zu 13 Tage auf Erde (16 h Licht 28 °C, 8 h Dunkel 18 °C) angezogen.

2.3.2 Verwendete Gerste-Linien und ihre Anzucht

Sommergerste (*Hordeum vulgare* L.var. „Golden Promise“ (Carlsberg Institut, Kopenhagen).

Samen wurden 3-4 Tage (24 °C / 16 h Licht) in einem Ehret KBK/KS Gewebekulturschrank vorgekeimt und im Gemisch autoklavierter T-Erde und Pelite (1:1) ausgepflanzt. Die Anzucht erfolgte in einer Heraeus Vötsch HPS 2000 Pflanzenkammer bei 18 °C / 16 h Licht und 80 % Luftfeuchtigkeit. Nach 7 Tagen wurden sie in größere Töpfe umgepflanzt.

2.3.3 Verwendete *Arabidopsis thaliana*-Linien und ihre Anzucht

Es wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 verwendet.

Die Samen wurden sterilisiert, auf MS-Medium-Platten (ggf. mit L-PPT-Selektion, 12,5 µg/ml) ausgestreut und in der Heraeus-Pflanzenkammer (18 °C / 24 h Licht) gezogen. Nach ca. 14 Tagen wurden die Pflanzen im Gemisch von autoklavierter Erde (P- oder T-Typ, Firma Patzer) und Quarzsand umgesetzt und bis zur Samenreife (ca. 2 Monate) belassen.

Die transgene Arabidopsis-Linie DR5 wurde freundlicherweise von G. Sabatini zur Verfügung gestellt (Sabatini et al., 1999). Die Anzucht erfolgte auf MS-Medium-Platten ohne Selektion.

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

2.4.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> BL21 DE 3	(Studier und Mofat, 1986)	für heterologe Expression
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	(Bullock et al., 1987)	für Klonierungen
<i>E.coli</i> pRK2013	(Meyer et al., 1975; Figurski et al., 1979)	Helferplasmid "Triparental Mating"
<i>E.coli</i> DH5α	(Hanahan et al., 1983)	für Klonierungen
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 pMB 90	(Koncz und Schell, 1986)	<i>Arabidopsis</i> -Transformation
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	(Hoekema et al., 1983)	Mais-Transformation
<i>A. tumefaciens</i> AGL1	(Lazo et al., 1991)	Mais-Transformation
<i>A. tumefaciens</i> EHA101	(Hood et al., 1986)	Gerste-Transformation

Selektion der Agrobakterien

Agrobakterien-Stamm	Antibiotikum, Konz. mg/L	Helferplasmid	Antibiotikum, Konz. mg/L	T-DNA-Plasmid, (binäres oder *-superbinäres)	Antibiotikum, Konz. mg/L
LBA 4404	Rifampicin 20	PAL 4404	keine Selektion	pSB11*	Spectinomycin 40
AGL 1	Rifampicin 20	PAL	keine Selektion	pDM	Tetracyclin 10
EHA 101	Chloramphenicol 50	pEHA101	Kanamycin 25	pTG101B	Tetracyclin 10
GV3101	Rifampicin 100	pMB90	Gentamycin 25	pGPTV-BARB	Kanamycin 50

2.4.2 Anzucht der Bakterienstämme und Transformation

E.coli-Stämme wurden wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben angezogen und transformiert. *A.tumefaciens*-Stämme wurden in YEB- oder AB-Medium 2 Tage bei 28 °C gezogen. Die Transformation der *A.tumefaciens*-Stämme erfolgte gemäß Walkerpeach und Welten (1994). Die *A.tumefaciens*-Transformation wurde durch Elektroporation in sterilen 0,2 cm Kuvetten in einem Gene-Transfection-Pulser (BioRad) bei 2,5 V, 400 Ω und 25 µF durchgeführt. Es wurden 50-100 ng DNA eingesetzt. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf YEB-Platten mit entsprechenden Antibiotika.

2.4.3 Plasmide und Vektoren

Vektor	Resistenz	Literaturnachweis
pBluescript KS+	Ampicillin	Stratagene (USA)
pET28 His	Kanamycin	Rosenberg et al., 1987
pGPTV-BAR B	Kanamycin	Novagen
pUC19	Ampicillin	Yannisch-Perron et al., 1985
pSB11	Spektinomycin	Komari et.al, 1996
pDM	Tetracyclin	Tingaj et al., 1997
pTG101B	Tetracyclin	Golds, unveröffentlicht

2.5 Puffer und Medien

Puffer für PCR

= PCR-Puffer 1x (KCl V)

Tris/HCl pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	2 mM
DMSO	3 %

= PCR-Puffer 1x (Ammonium-Sulfat)

Tris/HCl pH 8,8	67 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,7 mM
b-Mercaptoethanol	10 mM
MgCl ₂	6,7 mM
BSA	0,1 %

= PCR-Puffer 1x (KCl II)

Tris/HCl pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	2 mM

Puffer für Kernprotein-Isolierung und EMSA

= Extraktionspuffer

HEPES-KOH, pH 7,6	10 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	0,5 mM
Sacharose	250 mM
Triton	0,05 %
Protease-Inhibitor (1 x complete)	

= Waschpuffer

HEPES-KOH, pH 7,6	10 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	0,5 mM

= Elutionspuffer

HEPES-KOH, pH 7,6	25 mM
KCl	100 mM
EDTA	0,2 mM
DTT	0,5 mM
Protease-Inhibitor (1x complete)	
Glycerin	25%

= Dialysepuffer (1L):

HEPES-KOH, pH 7,6	20 mM
KCl	100 mM
EDTA	0,2 mM
DTT	0,5 mM
Glycerin	10 %

= 5 x Bindepuffer

HEPES-KOH, pH 7,6	125 mM
Glycerin	50%
KCl	375 mM
MgCl ₂	25 mM
EDTA, pH 8,0	2,5 mM
DTT	2,25 mM
H ₂ O ad	10 ml

= Färbung der Kerne

DAPI, 10 mM	5 ml
Kernextrakt	5 ml
Glycerin 87 %	5 ml

Puffer für histochemische Analyse

= X-Gluc-Färbelösung, 50 ml

X-Gluc	25 mg
DMF	250 ml
Triton-X-100	150 ml
EDTA 0,5 M	100 ml
Ferricyanat 0,1 M	500 ml
Ferrocyanat 0,1 M	500 ml
Na ₂ HP0 ₄ 0,1 M	30,8 ml
NaH ₂ P0 ₄ 0,1 M	19,2 ml

Medien für Protoplasten-Isolierung

= Enzym-Lösung für Blätter

Cellulase R 10	1,5 %
Macerozyme R 10 (Yakult Honsha, Tokyo, Japan)	0,3 %
Mannitol	0,6 M
MES, pH 5,7	10 mM

55 °C 10 min

CaCl ₂	1 mM
β-ME	5 mM
BSA	0,1 %

Sterilfiltrieren durch 0,45 mm Filtr

Ampicillin (ggf.) 100 mg/ml

= PEG-Lösung (40%), 26 ml

Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	413,3 mg
Mannitol	1,2754 g
H ₂ O MilliQ	17,5 ml
Lösen	
PEG (1500)	10 g
pH 9,75 mit KOH	

Sterilfiltrieren durch 0,1-0,2 mm

Filtr. Aliquoten (500 ml) in
ERG verteilen und einfrieren.= Enzym-Lösung für Protoplasten
aus Keimlingen

Cellulase R 10	2 % (w/v)
Pectolyase	0,2 % (w/v)
Sorbitol	0,5 M
KCl	10 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	20 mM
MES/Tris, pH 6,0	5 mM

= Inkubationsmedium

Sorbitol	0,5 M
KCl	10 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	20 mM
MES/Tris, pH 6,0	5 mM

Puffer und Medien für Agrobakterienanzucht und Transformation

= AB-Medium, 1L

Glucose	5g
Agar	15 g
H ₂ O	900 ml
Autoklavieren	
Steril zugeben:	
50 ml AB-Puffer (20x)	
50 ml AB-Salze (20x)	

= AB-Salze (20x), 1L

NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	6 g
KCl	3 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	50 mg

= AB-Puffer (20x), 1L

K ₂ HPO ₄	60 g
NaH ₂ PO ₄	20 g
Autoklavieren	

= Benedict's Reagenz, 1L

Na ₂ CO ₃ x10H ₂ O	256 g
Na-citrat	132 g
CuSO ₄ x5H ₂ O	3,2 g

= Laktose-Medium

Laktose	1%
Difco Agar	12%
Hefeextrakt	0,1%

= Induktionsmedium, 1L

NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g
KCl	0,15 g
CaCl ₂	0,01 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0025 g
K ₂ HPO ₄	0,348 g
Glucose	10 g
MES	2,9 g
Acetosyringon	100 mM

= Infiltrationsmedium , 1L

MS-Salze	2,5 g
Inosit	100 mg/l
Nikotinsäure	1 mg/l
Pyridoxin	1 mg/l
Thiamin	10 mg/l
Saccharose	5 %
Nach dem Autoklavieren	
BAP	0,044 mM
Silvet	50 ml
Acetosyringon	100 mM

Medien für Hybridisierung

= SSPE (20x)

NaCl	3 M
EDTA	0,2 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
pH 7,0 mit 10M NaOH	

Puffer und Medien für Gerste-Gewebekultur

= PRM (2x), 1 L

MS Salze (Duchefa)	8,98 g
Maltose (Duchefa)	60,00 g
Myo-Inositol (Duchefa)	0,5 g
Thiamin HCl	2 mg
BAP	2 mg
pH 5,7	
Filtern durch 0,2 mm Filter	

= CIM (2x), 1 L

MS Salze (Duchefa)	8,98 g
Maltose (Duchefa)	60 g
Myo-Inositol (Duchefa)	0,5 g
Casein Hydrolysat (Duchefa)	2 g
Prolin (Duchefa)	1,38 g
Thiamin HCl	2 mg
Pyridoxin HCl	1 mg
Nicotinsäure	1 mg
Glycin	4 mg
2,4-D	4 mg
pH 5,7	
Filtern durch 0,2 mm Filter	

= PDM (2x), 1 L

MS Salze (Duchefa)	8,98 g
Maltose (Duchefa)	60,00 g
Myo-Inositol (Duchefa)	0,5 g
Thiamin HCl	2 mg
pH 5,7	
Filtern durch 0,2 µm Filter	

2.6 Methoden zur Analyse von DNA/RNA

2.6.1 Charakterisierung und Reinigung von DNA

Die Plasmid-DNA wurde nach Birnboim und Doly (1979) isoliert. Weitere Aufreinigungs- und Charakterisierungsschritte wurden, außer bei den nachfolgend erwähnten Methoden, nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Für die Reinigung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden die NUCLEOBOND AX5/20 Säulen (Machery-Nagel, Düren) und GFX™ PCR DNA und Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotec Inc, USA) verwendet. Pflanzen-DNA wurde nach Dellaporta et al. (1983) isoliert.

2.6.2 Hybridisierungstechniken

Die Blotting- und Hybridisierungstechniken wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. 5-7 µg geschnittener genomischer DNA wurden auf 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Der DNA-Transfer (Southern, 1975) auf Hybond™ N+ Nylonmembranen (Amersham Life Science) erfolgte mittels Kapillarentransfer (dickes Saugpapier, Wathman, und Zellstoff, Pall Biosupport Membranes) mit 20xSSPE nach Angaben des Herstellers. Die Sonden wurden durch Oligo-Markierung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase und 32-P-α-dCTP radioaktiv markiert.

GUS-Sonde NcoI/EcoRI- Fragment : 2200 bp

GUS-Intron-Sonde NcoI/EcoRI- Fragment : 2350 bp

2.6.3 PCR-Verfahren

Die PCR-Reaktionen wurden im Thermoblock UNO (Biometra) und im Thermoblock MultiCycler PTC225 BIOZYM Diagnostik, Oldendorf mit/ohne Heizdeckel und mit/ohne Parafilm durchgeführt. Dabei wurde Taq-Polymerase der Fa. Boehringer angewendet. Die verwendete Annealing-Temperatur wurde in Bezug zur theoretischen Schmelztemperatur der Primer ausgerechnet. Bei Einsatz von Primern, die Basen-Mismatch aufwiesen, wurde die Annealing-Temperatur um 1 °C pro Mismatch in den ersten 3 Zyklen erniedrigt. Die Amplifikation erfolgte im Puffer KCl V. Es wurde 1 min bei 94 °C denaturiert, 30 sec bei adäquater Temperatur hybridisiert und bei 72 °C über adäquate Zeit elongiert. Es wurden 30-40 Zyklen ausgeführt. Anschließend wurde 10 min bei 72 °C inkubiert.

Nachweis eines Transgens mit Hilfe von PCR

Der Nachweis der Transformation der Gerstenpflanzen erfolgte mittels PCR. Die Reaktion wurde in 10-15 µl Volumen in KCl II-Puffer bzw. in Ammoniumsulfat-Puffer für TetA und *Gus*-r-Primer (s. 2.2) durchgeführt. Das Annealing erfolgte bei 53 °C, Elongation war 1 min.

2.6.4 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese

Die Isolierung von Gesamt-RNA (~5µg) aus Blattmaterial (~500 mg) erfolgte mittels NucleoSpin[®] RNA-Plant (Machery-Nagel, Düren) Kits nach Angaben des Herstellers. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe von Taqman Kits (Roche, Schweiz) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.5 Quantitative PCR für Detektion eines Transcriptes mit Hilfe des Light-cyclers

Die RNA wurde durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die quantitative PCR („real time PCR“) mit Hilfe des Lightcyclers (Light Cycler Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde der FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Fa. Roche Molecular Biochemicals), wie in Frey et al. (2000) beschrieben, eingesetzt.

2.6.6 Sequenzreaktionen

Die Sequenzierungen erfolgten nach der Dideoxy-Methode von Sanger et al. (1977). Zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde mit einer PEG-Fällung gereinigt und 0,5 bis 1 µg zur Sequenzreaktion mit dem DYEnamic ET terminator Kit (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Analysiert wurden die Sequenzreaktionen mit einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA). Ausgewertet wurden die Sequenzen mit den Programmen Seqman (Lasergene, DNASTar) und GCG (Genetics Computer Group der Universität Wisconsin, Version 8.1).

2.7 DNA-Klonierungstechniken

Die Methoden zu Herstellung und Analyse rekombinanter Klone, wie die Agarose-Gel-elektrophorese, Restriktion mit Endonukleasen, Behandlung mit T4-DNA-Polymerase und alkalischer Phosphatase, Ligation, wurden nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1993) oder nach Angaben der Hersteller der Enzyme durchgeführt. Wurde durch

Behandlung mit T4-DNA-Polymerase ein „sticky end“ in ein „blunt end“ umgewandelt, wird dies durch „*“ angezeigt.

2.7.1 Reporter-gen-Konstrukte

Klonierung in Bluescript-KS+-basierende Vektoren

Das 0,5-kb-Promotorfragment wurde mittels Mismatch-PCR mit „BamHI/NcoI“-Primerpaar (s. 2.2) erstellt. Als Template diente der genomische 12-kb-*Igl*-Klon (Stettner, 1998). Die NdeI-Schnittstelle des Start-Codons von *Igl* wurde in eine NcoI-Schnittstelle verwandelt, was die Fusion mit dem *uidA*-Gen über die NcoI-Schnittstelle in seinem Start-Codon ermöglichte. In die Position 498 bp upstream vom Start-Codon wurde eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Fragment (~500 bp) wurde mit NcoI und BamHI geschnitten. Der Bluescript-Vektor wurde mit EcoRI/BamHI behandelt, das *Gus*-Terminator-Gen-Fragment wurde mit EcoRI/NcoI ausgeschnitten. Diese drei Fragmente wurden in einem Ansatz ligiert.

Das 0,36-kb-Promotorkonstrukt wurde mittels Mismatch-PCR mit „No-motif-BamHI/NcoI“-Primerpaar (s. 2.2) erstellt. Nach Schneiden mit BamHI und NcoI- wurde das 0,36-kb-Fragment analog zum 0,5-kb-Promotorfragment kloniert.

Das 5,3-kb-Promotorfragment wurde durch Ligation des 4,85-kb-PstI/KpnI-Fragments des *Igl*-Gens in das mit PstI/KpnI geschnittene 0,5-kb-Promotorkonstrukt erhalten. Daraus wurde durch Deletion des PstI/BglIII-Fragments das 3,7-kb-Promotorkonstrukt erhalten, und durch Schneiden mit NdeI und NcoI wurde das 0,7-kb-Promotorfragment isoliert. Die NdeI-Schnittstelle wurde durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase geglättet (NdeI*) und die Klonierung erfolgte im Ersatz zum 0,5-kb-Promotorfragment, indem dieses Reporter-gen-Konstrukt mit BamHI geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase behandelt (BamHI*) und mit NcoI nachgeschnitten wurde (s. Abb. 7).

Klonierung in die Agrobakterienvektoren

Für die Agrobakterien-vermittelte transiente Expression wurden die 35S-Promotor-*Gus*-Intron-Reporterkonstrukte verwendet. Die 35S-Promotor-*Gus*-Intron-Expressionskassette wurde als PstI-Fragment in den binären Vektor pDM-pUC-mcs (Golds, unveröffentlicht) und in pBluescript KS+ kloniert. In den superbinären Vektor pSB11 wurde die 35S-Promotor-*Gus*-Intron-Kassette über SacI/HindIII ligiert. Bei Agrobakterien für die stabile Transformation wurden die Promotorfragmente der pBluescript-Konstrukte, wie in 3.2.1 beschrieben, ausgeschnitten und in pGPTVBARB oder pTG101B umklont.

2.8 Analyse von DNA-Protein-Wechselwirkungen

2.8.1 Gewinnung der Proteinextrakte

Die Maiskeimlinge wurden 11 Tage bei 28 °C / 16 h Licht und 20 °C / 8 h im Dunkeln angezogen. Die Induktion mit Volicitin erfolgte wie beschrieben (Frey et al., 2000). Nach 1 h Induktion wurden die Keimlinge mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Kontrollpflanzen wurden direkt eingefroren und gemörsert. Pro g Pflanzenmaterial wurde 10 ml eiskalter Extraktionspuffer zugegeben. Das Homogenat wurde durch 200 µm und 65 µm Gaze filtriert. Die Kerne wurden 10 min bei 360 g und 4 °C pelletiert und mit 15 ml Waschpuffer gewaschen (2 x 15 min, 360xg). Die Kernisolierung wurde mit DAPI-Färbung durch Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. Anschließend wurden die Kerne 15 min bei 360xg und 4 °C pelletiert, in 200-300 µl Elutionspuffer aufgenommen und auf eine KCl-Endkonzentration von 450 mM eingestellt. Die Kernproteine wurden unter Schütteln 30 min eluiert und gegen 1 L Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Die Proteine wurden aliquotiert und eingefroren. Aus einem Aliquot des zermörserten Pulvers (induziert / nicht induziert) wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, und mit Hilfe der quantitativen PCR (2.6.4, 2.6.5) wurden die *Igl*-Transkript-Mengen bestimmt.

2.8.2 Radioaktive Markierung und Reinigung der DNA-Fragmente

Die Sonden wurden durch T4-Polynukleotid-Kinase mit ³²P-γATP endmarkiert (Sambrook et al., 1989). Nicht eingebautes ³²P-γATP wurde durch NAPTM Sephadex[®]-G25-Gelfiltrationssäulen (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Die Konzentration der Sonde war 0,031 pmol/µl, die Spezifität 1 µCi/pmol.

2.8.3 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Gelretardierungsmethode wurde nach Marzabal et al. (1998) mit Modifikationen ausgeführt. Die Bindereaktion zwischen dem Kompetitor-Oligonukleotid und Kernproteinextrakt erfolgte bei RT für 10 min. Als "carrier"-DNA diente Poly(dIdC). Nicht markierte Kompetitor-Oligonukleotide wurden in 50- und 500-fachem Überschuß zu dem radioaktiven Fragment eingesetzt. Die Inkubation mit Kompetitor-DNA wurde 10 min bei RT ausgeführt, anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben und weitere 20 min inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt: 0,2-0,5 ng markierter Sonde, 630 ng poly dI/dC, 2,5 µg Kernprotein, 20 µg BSA, ggf. 10-100 ng Kompetitor-DNA im Bindepuffer. Das Volumen betrug 20 µl.

Die Reaktion wurde mit 2 µl 10x Ladepuffer (8% Sucrose, 0,05% Xylen Cyanol, 0,05% Bromphenolblau) versetzt und 10 µl auf ein 5%iges PAA-Gel (Acrylamid:Bis-Acrylamid 29:1) in 0,5 x TBE / 1% Glyzerin geladen. Zur Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe wurde die „Mighty-Small“ Apparatur (Amersham) benutzt. Nach dem Lauf wurden die Gele auf Filterpapier getrocknet und mit dem Phosphoimager STORM-Laser 860, (Amersham Biosciences) analysiert.

2.9 Histochemische Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität

Die Lokalisierung der durch das *Gus*-Reportergen vermittelten β -Glucuronidase-Aktivität in transgenem Pflanzenmaterial erfolgte mittels histochemischer Analyse nach Jefferson et al. (1987 a, b). Nach Vacuuminfiltration wurde 16 h bei 37 °C in X-Gluc-Lösung inkubiert. Chlorophyll wurde durch Inkubation in 70% Ethanol entfernt. Die Auswertung erfolgte unter dem Binokular.

2.10 Elicitierung mit Volicitin

Die Induktion von Maispflanzen erfolgte wie von Frey et al. (2000), beschrieben. Protoplasten ($\sim 0,5 \times 10^6$ in 500 µl Volumen) wurden in 1,2 µg/ml Volicitin-Lösung 1 h inkubiert, abzentrifugiert, eingefroren und danach bis zur RNA-Isolierung bei -70 °C gelagert. In analoger Weise wurde mit der Maiszellkultur verfahren.

2.11 Herstellung und Analyse von transgenem Pflanzenmaterial

Alle Medien, Geräte und Anzuchtgefäße zur Herstellung transgenen Pflanzenmaterials wurden sterilisiert. Die Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank.

2.11.1 Gewinnung, Elektroporation und PEG-Transformation von Protoplasten

Die Protoplasten aus den Maisblättern wurden nach Sheen (1990) mit Modifikationen isoliert. Der mittlere Bereich der vollentwickelnden 11 - 13 Tage alten Maisblätter wurde mit einer Rasierklinge in ~ 2 mm breite Streifen geschnitten, in eine Petri-Schale mit MMM-Lösung überführt und 1 h zur Präplasmolyse inkubiert. Dann wurde die MMM-Lösung durch die Enzym-

Lösung ersetzt und 30 min vacuumfiltriert (55 mm Hg). Danach wurde bei 40 rpm 2 - 3 h und 80 rpm für 5 min bei RT geschüttelt. Die Protoplastensuspension wurde durch 200- μ m- und 35- μ m-Siebe filtriert, auf ein Volumen von 10 ml mit MMM-Lösung eingestellt. Es wurde bei 40xg 10 min in 15-ml-Reagenzgläsern abzentrifugiert. Das Protoplastenpellet wurde vorsichtig in 10 ml MMS-Lösung aufgenommen und darauf wurde 2,5 ml MMM-Lösung geschichtet. Nach Zentrifugation bei 70xg für 10 min wurden die Protoplasten aus der Interphase gewonnen, mit MMM-Lösung auf 10-ml-Volumen eingestellt und die Protoplastenzahl in der Zählkammer (Neubauer) bestimmt. Die Protoplasten wurden bei 40xg 10 min pelletiert und in einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ /ml in Elektroporations-Lösung (oder MMM-Lösung für die PEG-Transformation) resuspendiert.

Protoplasten aus 4 Tage alten etiolierten Maiskeimlingen wurden nach Wang und Lino (1997) isoliert. Die Sprosse wurden in 1,2% Hypochlorid-Lösung sterilisiert, mit sterilem Wasser gewaschen, unter sterilen Bedingungen halbiert und die Koleoptilen isoliert. Die Koleoptilen wurden in 1-cm-Abschnitte geschnitten und in 5 ml Enzym-Lösung überführt, vacuumfiltriert (55 mm Hg/15 min) und 2 - 3 h bei 60 rpm / RT inkubiert. Danach wurde durch die 100- μ m- und 65- μ m-Maschensiebe filtriert, bei 50xg 10 min abzentrifugiert, in 2 ml Inkubationsmedium resuspendiert. Die Protoplastensuspension wurde auf 2 - 3 ml Inkubationsmedium in 20% Percoll (Sigma) geschichtet und bei 110xg 5 min abzentrifugiert. Die Protoplasten wurden aus der Interphase gewonnen, in 5 ml Inkubationsmedium suspendiert, bei 80xg 10 min pelletiert und in 0,5 ml Inkubationsmedium suspendiert. Die Konzentration wurde mit der Zählkammer bestimmt. Sie sollte $1 - 5 \times 10^5$ /ml betragen.

Zur Elektroporation wurde die Plasmid-DNA mit Nukleobond AX-Säulen gereinigt. $1 - 2 \times 10^5$ Protoplasten in 300 μ l Elektroporationspuffer wurden mit 30 - 50 μ l Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l) versetzt und bei 400 V, 200 μ F, 5 - 10 msec in 2-mm-Küvetten elektroporiert (Transfection-Pulser-Elektroporator, BioRad). Die Elektroporation wurde z. T. wiederholt. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden "6-well tissue culture dishes" benutzt (Falkon 3046), die mit 5% Kälberserum vor der Benutzung abgesättigt wurden, um Kleben der Protoplasten auszuschließen.

PEG-Transformation: $1 - 2 \times 10^5$ Protoplasten wurden in 60 μl MMM-Lösung resuspendiert. Zu der Suspension wurde zuerst 10 μg DNA in einem Volumen von ca. 10 μl und danach tropfenweise langsam 70 μl PEG-Lösung (40 %) zugegeben. Nach 5 min wurden 140 μl MMM-Lösung zugegeben. Die Proben wurden ÜN bei 24 °C im Dunklen inkubiert.

Zur Auswertung wurden die Protoplasten bei 150xg 2 min abzentrifugiert, in X-Gluc- Lösung 1 h inkubiert.

2.11.2 „Particle Bombardment“ von Maisblättern und 4 Tage alten Keimlingen

Das „Particle Bombardment“ von Maisblättern und 4 Tage alten Keimlingen wurde nach dem Protokoll von BioRad (München) und nach Escurra et al. (2000) durchgeführt. Aus den oberflächensterilisierten ersten drei Blättern der 13 Tage alten Maispflänzchen wurde der mittlere Bereich in 2 - 3 cm lange Abschnitte geschnitten. Ein Teil von den Maispflänzchen wurde vorher mit Volicitin-Lösung 1 h induziert (s. 2.10). Die Koleoptilen der 4 Tage alten Keimlinge wurden wie beschrieben (2.11.1) präpariert. Die Blatt- oder Koleoptilen-Stücke wurden auf MS-Medium mit Agar ausgelegt und mit der Partikelkanone PDS 1000/He Biolistic System (BioRad, München) beschossen.

Präparation der Microcarrier: 125 μl Goldsuspension (30 mg/ml, 1 μm Durchmesser) wurden pelletiert (5 sec, 5000 rpm) und im gleichen Volumen Wasser resuspendiert. 100 μl Plasmid-DNA (0,1 - 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Nucleobond AX-Säulen gereinigt) wurde zugegeben. Danach wurde 25 μl 3 M NaAc pH 5,2 und schließlich 625 μl EtOH zugegeben. Alle Komponenten wurden in dieser Reihenfolge pipettiert und gut gemischt. Die Suspension wurde 30 min bei -20 °C inkubiert, abzentrifugiert und die Partikel in 400 μl 100% Ethanol resuspendiert. 10-20 μl Aliquots wurden auf Macrocarrier geladen und getrocknet. Der Beschuss erfolgte bei 1100-1300 psi nach Angaben des Herstellers. Nach dem Beschuss wurde das Pflanzenmaterial ÜN bei 24 °C in Licht inkubiert.

Zum Beschuss wurde eine Mischung (1:1) des *Gus*-Reportergens und des Luciferase-Reportergens eingesetzt. Die *Gus*-Gen-Aktivität wurde wie in 2.9 beschrieben bestimmt. Die Bestimmung der *Luc*-Gen-Aktivität erfolgte mit dem Promega-Kit nach Angaben des Herstellers im Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold GmbH, München).

2.11.3 Agrobakterientransfer zur transienten Expression

Als Reporter gen wurde das 35S-Promotor-*Gus*-Intron-Konstrukt (2.6.1) in pDMmcsplUC (Agrobakterien-Stamm AGL1; Transfer durch Elektroporation) oder im pSB11-Vektor des superbinären Systems (Agrobakterien-Stamm LBA4404; Transfer durch „Triparental Mating“, Ditta et al., 1980) benutzt. Zur Verifizierung des triparental Matings wurden Bakterien-Kolonien 2 Tage auf Laktosemedium gezogen und mit Benedict's Reagenz gefärbt. Der Umschlag der blauen Farbe des Benedict's Reagenzes in Gelb ist indikativ für das Vorliegen von Agrobakterien.

Die Agrobakterien wurden in Nährmedium unter Selektion angezogen, in Induktionsmedium übergeführt, 4-6 h inkubiert und in Infiltrationsmedium auf eine $OD_{600} \sim 0,7$ eingestellt. 13 Tage alte Maispflanzen wurden in die Suspension getaucht oder mit einer kanülenlosen Spritze infiltriert und 1 Tag im Dunklen, 2 - 3 Tage im Wechsellicht (16 h Licht / 8 h Dunkel) weitergezogen.

Maiskeimlinge wurden nach Shen und Escudero (1999) inkubiert. 3 Tage alte Maiskeimlinge wurden oberflächensterilisiert, die Koleoptile wurden abgeschnitten, in die Agrobakteriensuspension (s. o.) überführt, 5 min vacuumfiltriert (0,4 - 0,8 Atm.), auf MS-Medium mit 3% Sucrose und 200 μ M Acetosyringon (ACROS, USA) gelegt und 3 Tage bei 24 °C und 16 h Licht inkubiert.

Zur Kontrolle der Methode wurden Tabakpflanzen wie für die Maispflanzen beschrieben behandelt.

Inkubation mit X-Gluc erfolgte nach 3 - 4 Tagen.

2.12 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Col-O erfolgte nach Bechthold et al. (1993) und Clough und Bent (1998) mit 100 μ l/l Silvet ohne Vacuumfiltration. Die Transformanten (T_0 -Generation) wurden auf MS-Medium mit L-PPT (DL- Phosphinotricin, 25 μ g/ml, Duchefa, Niederlande) selektioniert. Diese Primärtransformanten wurden auf Erde überführt und bis zur Samenreife angezogen. Pflanzen der T_1 -Generation wurden histochemisch analysiert.

2.13 Transformation von *Hordeum vulgare*

2.13.1 Agrobakterienpräparation

Agrobacterium tumefaciens EHA 101 mit den Reporterkonstrukten 3,7-kb-Promotor und 0,7-kb-Promotor in pTG 101B Vektor wurden in flüssigem Medium (YEB) mit den Antibiotika Chloramphenicol 5 µl / 10 ml, Tetracyclin 20 µl / 10 ml und Kanamycin 5 µl / 10 ml angezogen. Die Übernachtskultur wurde 2 mal mit YEB-Medium gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 0,8 - 1,0 eingestellt. Es wurde Acetosyringon auf eine Endkonzentration von 50 µM zugegeben und 1 h bei RT inkubiert.

2.13.2 Isolierung, Transformation und Inkubation der Gerste-Embryonen

Die Anzucht der Spenderpflanzen erfolgte bei 18 °C, 16 h Licht und 80 % Luftfeuchtigkeit. Die Samen wurden von den Spelzen befreit, in 70%EtOH 40 sec inkubiert und danach mit sterilem H₂O gewaschen, der Waschvorgang wurde 3 mal wiederholt.

Die sterilisierten Samen wurden längs des Embryos halbiert und die Embryonenhälften aus dem umgebenden Endosperm präpariert. Die verwendeten Embryonen sollen kleiner als 1,5 mm sein, die Keimblattanlagen nicht erkennbar sein und die Einlagerung von Stärke in den Samen noch nicht begonnen haben. Es wurden nur Embryonen aus der Mitte der Ähren präpariert. Die Embryonenhälften wurden 60 min im ERG in der Agrobaktériensuspension inkubiert. Danach wurden die Embryonenhälften auf CIM-Medium ausgelegt. Dabei war es wichtig, nicht zu viele Agrobakterien mit den Embryonen zu transferieren, da diese in zu hoher Konzentration eine Schädigung der Embryonen verursachen. Die Kokultivierung erfolgte 5 -7 Tage bei 24 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Embryonenhälften auf CIM-Medium mit 150 mg/L Timentin und 3 mg/L Bialaphos (CIM B3T150) transferiert. Nach jeweils 13 - 15 Tagen erfolgte ein Transfer auf frisches CIM B3T150 Medium. Die Agrobakterien werden durch das Timentin (150 mg/L) abgetötet, und durch Bialaphos (3 mg/L) werden transformierte Kalli selektioniert. Es wurden 16 - 20 Embryonen je Platte ausgelegt. Auswachsende und nachwachsende Spross- und Wurzelansätze wurden entfernt und die gebildeten Schnittflächen auf das Medium gelegt. Erschienen die Embryonenhälften weich, glasig und zeigten kein Wachstum, wurden sie nicht transferiert, da sie abgestorbenes Gewebe darstellen. Bräunliche Gewebeteile wurden bei jedem Transfer auf frisches Medium entfernt. Erreichten die Gewebekalli ca. 1 cm Durchmesser, war ein Aufteilen dieser Kalli notwendig, da sonst die Konzentration von Bialaphos im Zentrum zu

gering ist und nicht transformierte Zellen proliferieren können. Transgenes Gewebe ist erkennbar an:

- schnellem Wachstum;
- weißer bis leicht gelber, teilweise auch sehr intensiv gelber Farbe;
- körniger Beschaffenheit;
- im fortgeschrittenen Stadium durch somatische Embryonen.

Somatische Embryonen wurden nach 6 - 8 Wochen und 2 - 3 Passagen auf CIM B3T150-Medium gebildet. Nach Bildung somatischer Embryonen erfolgte ein Transfer auf Regenerationsmedium PRM mit 150 mg/L Timentin und 3 mg/L Bialaphos (PRM B3T150). Inkubiert wurde bei 24 °C, 16 h Licht. Es wurde 14-tägig auf PRM B3T150-Medium umgesetzt; wurde eine Kallusgröße von 1 cm erreicht, wurde dieser aufgeteilt.

Differenzierten die somatischen Embryonen zu Pflanzen aus, wurde das umliegende Kallusgewebe bis auf einen kleinen Rest direkt an der Pflanzenbasis entfernt. Das Pflänzchen wurde auf PRM B3T150-Medium weiterkultiviert, bis die Blätter eine Länge von 3 - 5 cm erreicht hatten. Dann wurden die Pflanzen in Magenta-Boxen mit PDM Medium (1mg/L Bialaphos) umgesetzt. Auf PDM-Medium kommt es zu Wurzelbildung. Wenn Wurzelbildung erfolgte und die Pflanze gewisse Größe erreichte, wurde sie in Erde überführt. Die Anzucht erfolgte bei 18 °C, 16 h Licht und 80 % Luftfeuchtigkeit.

2.13.3 Basta-Resistenz-Test

Gerstenblätter wurden 3 - 3 sec zu 6 - 10 cm Länge in eine 0,1%Basta-Lösung eingetaucht. Als Kontrolle dienten Wildtyppflanzen. Die Auswertung erfolgte 5 Tage nach der Behandlung mit Basta. Das Ausmaß der Blattschädigung wurde bestimmt (s. Abb. 19 K).

2.13.4 Embryo-Rescue-Methode und Segregationsanalyse

Embryonen wurden durch Umgehen der Keimruhe zum Auskeimen gebracht. Die Samen wurden von Pflanzen geerntet, welche kurz vor dem Abtrocknen waren. Die Isolierung der Embryonen erfolgte wie beschrieben ohne den Embryo zu schneiden. Die Embryonen wurden auf CIM ohne 2,4-D gelegt. Zur Selektion transgener Pflanzen wurde dem Medium 4,5 mg/L Bialaphos zugesetzt. Als Kontrolle dienten Embryonen von Wildtypgerste. Die Inkubation erfolgte bei 24 °C im Brutschrank mit Wechsellicht (16 h Licht, 80 % Luftfeuchtigkeit). Die Auswertung erfolgte nach ca. 6 Tagen (s. Abb. 19 H, J).

2.14 Computeranalysen

Für die Computeranalysen wurden die Programme BLAST (Altschul et al. 1997,), GCG (Genetics Computer Group der Universität Wisconsin, Version 8.1), SegMan (DNA-Star, Lasergene), „MatInspector“ (Version 2.2, Quandt et al., 1995) und Clustal W (Thompson et al., 1994) verwendet.

3. Ergebnisse

Die Indolglycerinphosphat-Lyasen IGL und BX1 katalysieren effizient die Bildung von Indol. Obwohl BX1 und IGL funktionell austauschbar sind, sind sie unterschiedlichen Biosynthesewegen zugeordnet und können sich nicht gegenseitig ersetzen. Die Funktion der Gene wird wesentlich durch ihr Regulationsmuster bestimmt. Das Ziel der Untersuchungen war es Komponenten der Genregulation zu bestimmen.

3.1 Analyse des *Igl*-Promotors

3.1.1 Identifizierung von Sequenzmotiven und ihre *in vitro*-Untersuchung

Das *Igl*-Gen wurde als zu *Bxl* homologe Sequenz isoliert (Frey et al., 2000) und der Transkriptionsstart bestimmt (Stettner, 1998). Eine putative TATA-Box konnte identifiziert werden. Das ATG-Start-Codon befindet sich an Position +200 in Bezug auf den Transkriptionsstart. Die vorliegende genomische Sequenz wurde mit Standardprogrammen nach bekannten Transkriptionsfaktor-Bindemotiven abgesucht. Mit dem Programm „MatInspector“ (Version 2.2, Quandt et al., 1995) wurden im 5'-upstream-Bereich pro 1000 bp zwischen 19 und 34 Sequenzen mit Ähnlichkeit (Core similarity $\geq 0,75$, Matrix similarity $\geq 0,59$) zu Bindestellen von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren identifiziert.

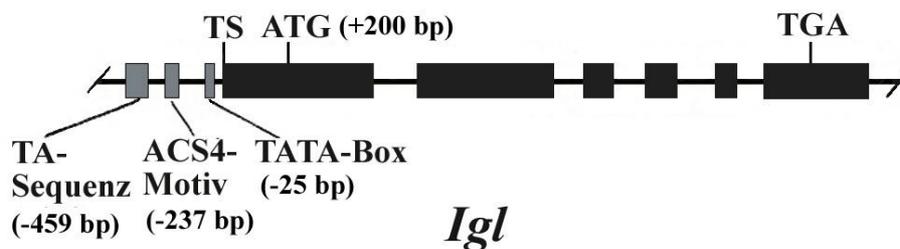


Abbildung 2. Struktur des *Igl*-Gens. Die putative TATA-Box, $(TA)_{37}$ T-Sequenz und ACS4-Motiv sind als graue Kästchen dargestellt. Ihre Lage relativ zum Transkriptionsstart ist in Klammern angegeben. Exons sind als schwarze Kästchen dargestellt, Introns und nicht codierender Bereich als schwarze Linie. Der Transkriptionsstart (TS) liegt 200 bp vor dem ATG-Startcodon. TGA: Stop-Codon. bp: Basenpaar.

Eine BLAST-Analyse (Altschul et al., 1997) gegen die Gesamtheit der bekannten Sequenzen aller Organismen gab eine signifikante Übereinstimmung über 26 bp (Tab.1) mit der 5'-upstream-Sequenz des Auxin-induzierbaren 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat (ACC)-Synthase-Gens *ACS4* von *Arabidopsis thaliana* (Abel et al., 1995). Ein weiteres auffallendes Sequenzmotiv findet sich mit der Folge „(TA)₃₇T“ 459 bp upstream vom Transkriptionsstart. Es liegt auf der Hand, dass die *in silico* gefundenen Motive nicht alle eine Rolle bei der Regulation der *Igl*-Transkription einnehmen können (Abb. 2).

Zusätzliche Bewertungskriterien, wie z. B. das übereinstimmende Auftreten von Motiven bei orthologen Genen oder bei Genen mit übereinstimmendem Regulationsmuster, standen zu Beginn der Untersuchungen für das *Igl*-Gen nicht zur Verfügung. Deshalb wurde die Technik des „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) (Marzabal et al., 1998) ausgeführt, um eine spezifische Interaktion von Sequenzen im 5'-upstream-Bereich des Gens mit Kernproteinen nachzuweisen. Dazu wurde das *ACS4* und *Igl* gemeinsame 26-bp-Motiv (*ACS4*-Motiv) und überlappende 80-bp-Oligomere als Sonden eingesetzt (Abb. 4).

Tabelle 1: Sequenzen im 5'-upstream-Bereich

Gen	Organismus	Position (bzg. Transkriptionsstart)	Strang	Sequenz
<i>Igl</i>	<i>Z. mays</i>	-459 bp	+	(TA) ₃₇ T
<i>Igl</i>	<i>Z. mays</i> *)	-237 bp	+	ATAGGATAAGATAG GA ATAGGATAGA
<i>ACS4</i>	<i>A. thaliana</i> *)	-795 bp	-	ATAGGATAAGATAG AA ATAGGATAGA

*) Unterschied der Sequenzmotive von *Z. mays* und *A. thaliana* ist durch Fettdruck hervorgehoben

Da die Applikation des Elicitors Volicitin zu einer schnellen Veränderung der Transkriptmenge von *Igl*, mit einem Maximum nach 1 - 2 Stunden Inkubation, führt, kann angenommen werden, dass die Elicitierung innerhalb dieser Zeit eine Änderung der Protein-DNA-Interaktionen im Promotor von *Igl* bewirkt. Bindung von Proteinen verändert das Laufverhalten der DNA-Sonden bei der Elektrophorese im nativen Polyacrylamid-Gel (EMSA). Werden Kernprotein-Extrakte

von Kontrollpflanzen und von induziertem Pflanzenmaterial mittels EMSA verglichen, sollten sich Unterschiede in den jeweils ausgebildeten Protein-DNA-Komplexen ergeben, wenn die eingesetzte DNA-Sonde Bindemotive enthält, die für die Induktion des *Igl*-Gens relevant sind. Für die Analyse wurden Pflanzen 45 - 60 Minuten mit Volicitin inkubiert. Dieser Zeitwert wurde gewählt, da angenommen werden kann, dass Veränderungen der Interaktionen in der Promotorregion dem Maximum der induzierten Transkription vorausgehen. Parallel wurden von unbehandelten Pflanzen Kernproteine isoliert (s. 2.8.1). Die Inkubation und gelelektrophoretische Analyse erfolgte wie in 2.8.3 beschrieben. Die Induktion der *Igl*-Transkription wurde durch quantitative PCR mit einem Aliquot des Pflanzenmaterials überprüft (2.6.5).

Zunächst wurde das ACS4-Motiv untersucht (Abb. 3).

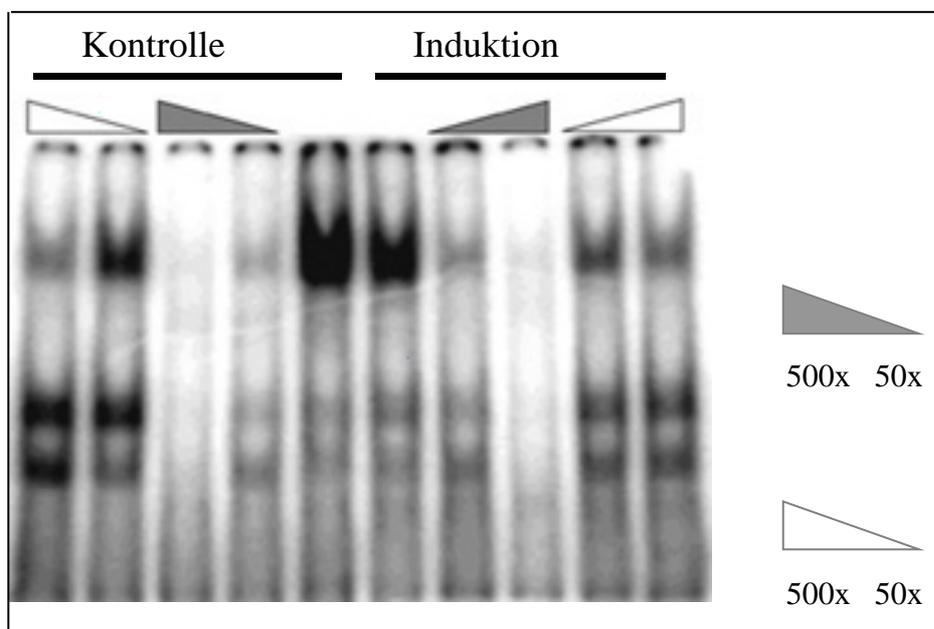


Abbildung 3: EMSA-Analyse mit dem ACS4-Motiv. Es wurde Kernextrakt von Kontrollpflanzen und von induzierten Pflanzen eingesetzt. Die Bindung wurde mit nicht markiertem ACS4-Motiv und dem mutierten Sequenzmotiv kompetitiert. Die Art und Menge des Kompetitors ist durch die Keile über den Spuren angegeben. Die ACS4 Sonde ist durch graue Keile, die mutierte Sonde durch weiße Keile markiert. Es wurde 500-facher und 50-facher Überschuss der nicht markierten DNA eingesetzt, im Zentrum findet sich jeweils die Bindereaktion ohne Kompetitor-DNA.

Inkubation von Mais-Kernextrakt mit dem ACS4-Motiv führte zur Bildung von DNA-Protein-Komplexen (Abb. 3). Diese Komplexe waren spezifisch für die eingesetzte Sonde. Es erfolgte keine Konkurrenz mit einer ähnlichen Sonde (ACS4mut, jede „G“-Position der Sequenz wurde

durch „C“ ersetzt), die ACS4-Sonde war dagegen ein effizienter Kompetitor der Bildung aller drei nachgewiesenen Komplexe. Es ergab sich kein Unterschied in der Ausbildung von DNA-Proteinkomplexen bei Einsatz von Extrakten aus induzierten und aus Kontrollpflanzen.

Für die weitere Untersuchung des *Igl*-Promotorbereiches wurde 500 bp 5'-upstream vom Transkriptionsstart in überlappende 80 bp lange Oligonukleotide aufgeteilt und diese *in vitro* mittels EMSA analysiert (Abb. 4). Der Überlapp betrug jeweils 20 bp. Mit allen acht Sonden kam es zur Protein-DNA-Komplexbildung (Abb. 5). Nur mit Sonde 2 ergab sich reproduzierbar mit dem induzierten Kernextrakt ein DNA-Proteinkomplex, der mit dem Kontrollextrakt nicht oder nur in geringem Umfang auftrat. Dieser Komplex war spezifisch kompetitierbar (Sonde 2), blieb aber mit dem unspezifischen Kompetitor (Sonde 6) erhalten (Abb. 5 B). Die Spezifität der Komplexbildung für den induzierten Zustand der Pflanzen konnte aber mit unabhängig isolierten Kernextrakten nicht bestätigt werden. Innerhalb des untersuchten 5'-upstream-Bereiches des *Igl*-Gens findet sich also keine DNA-Sequenz, die *in vitro* eine für den induzierten Pflanzenzustand spezifische Proteinbindung vermittelt.

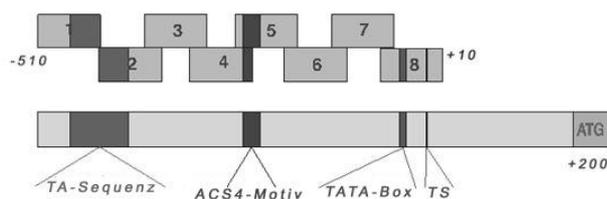


Abbildung 4. Schematische Darstellung der analysierten überlappenden 80-mer Oligonukleotide des *Igl*-Promotors (Position +10 bis -510). Die Lage von Startcodon, Transkriptionsstart, ACS4- und (TA)₃₇T-Motiv sind angegeben.

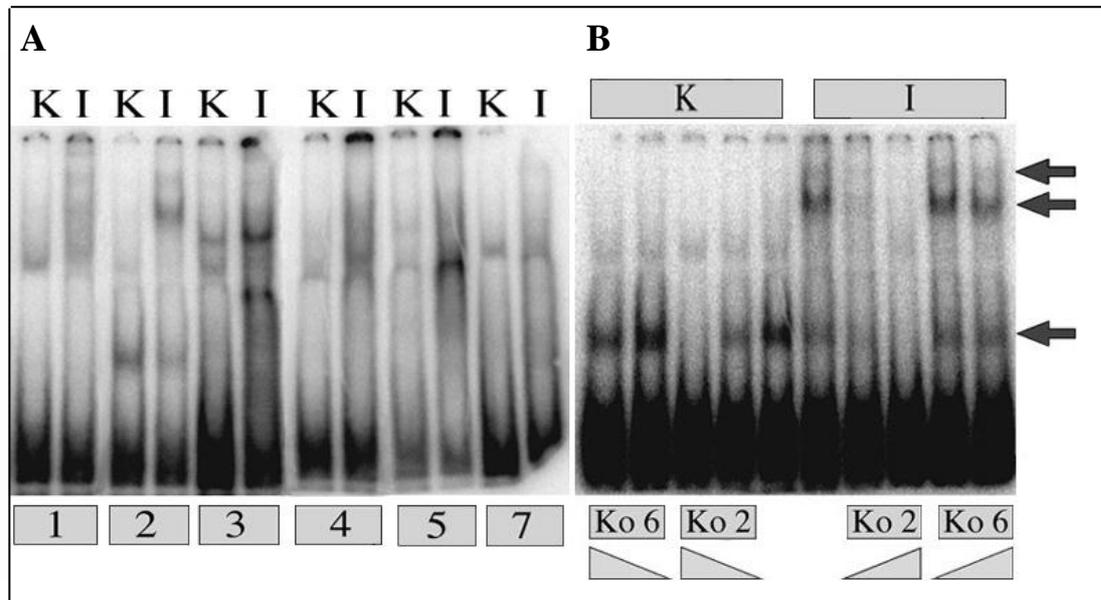


Abbildung 5. EMSA-Analyse mit den Sonden 1 - 5 und 7. Es wurde Kernextrakt aus Kontrollpflanzen (K) und aus induzierten Pflanzen (I) eingesetzt (A). Die Analyse der Sonde 2 wurde mit Kompetitor-DNA fortgesetzt. Als unspezifischer Kompetitor diente die nicht radioaktiv markierte Sonde 6, als spezifischer Kompetitor die nicht radioaktiv markierte Sonde 2. Es wurde ein 500-facher und 50-facher Überschuss des Kompetitors zugegeben, die Konkurrenz ist durch die Keile unter den entsprechenden Spuren angegeben (B). Die Pfeile deuten auf die spezifisch gebildeten Komplexe.

3.2 Analyse von 5'-upstream-Sequenzen des *Igl*-Gens durch Transformation von Reportergen-Konstrukten

Für die transiente Expression durch „Particle Bombardment“ und PEG-Protoplastenfusion können die Reportergen-Konstrukte in den Plasmiden pUC19 oder pBluescript kloniert werden. Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mit binären Ti-Plasmiden, dazu wurde in den Vektor pBAR B kloniert. Transformation von monokotylen Pflanzen erfordert ein spezifisches Agrobakterien/Ti-Plasmid-System. Die Reportergen-Konstrukte wurden aus diesem Grund in das Plasmid pTG101B kloniert.

3.2.1 Klonierung von Reportergen-Konstrukten mit 5'-upstream-Sequenzen des *Igl*-Gens

Für die funktionale Analyse der *Igl*-Promotorsequenz wurden verschiedene Promotorkonstrukte als 5'-Deletionsfragmente kloniert. 5'-upstream-Bereiche des *Igl*-Gens wurden durch translationale Fusion mit dem Reportergen β -Glucuronidase (*Gus*, uid A-Gen von *E. coli*, Jefferson et al., 1987 a, b) verbunden.

Promotorkonstrukte für die transiente Expression. Grundlagen für die Konstruktionen (Abb. 6) waren das *Gus*-Gen in Verbindung mit dem 35S-Promotor und dem *nos*-Terminator (Ohnhäuser, 2000) kloniert im Plasmid pBluescript und die klonierte genomische Sequenz des *Igl*-Gens (Stettner, 1998). Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem genomischen *Igl*-Klon durchgeführt (2.7.1).

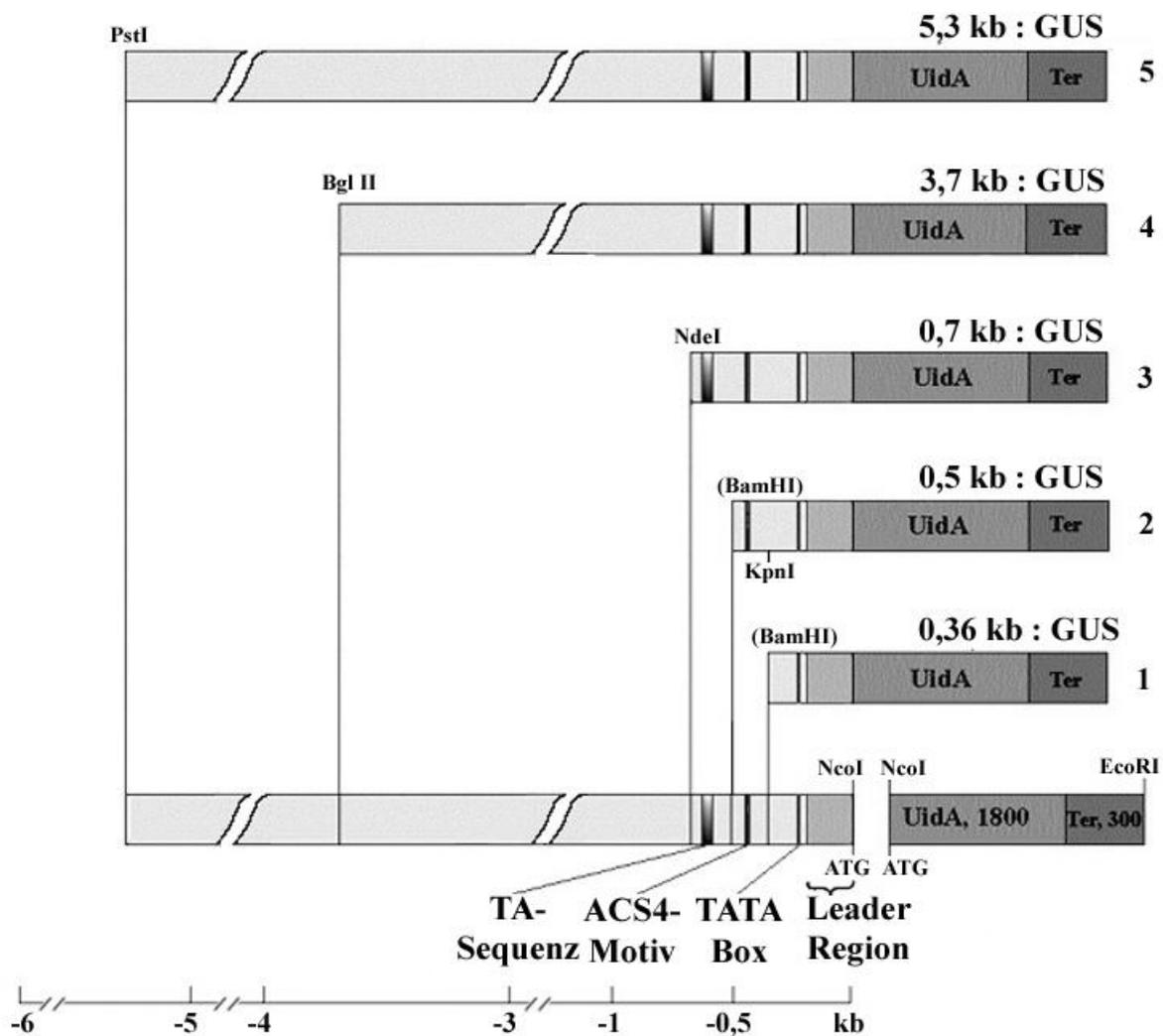


Abbildung 6. *Igl*-Promotorkonstrukte (1-5). Die 5'-flankierenden Regionen des *Igl*-Gens wurden translational über die jeweilige NcoI-Schnittstelle mit dem *UidA*-Reportergen fusioniert. Die putative TATA-Box, (TA)₃₇T-Sequenz, ACS4-Motiv und die Leaderregion sind angegeben. Die für die Klonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Durch die Klonierung der Promotorsequenzen in die Vektoren pUC19 und pBluescript KS wurde am 5'-Ende eine unique HindIII-Schnittstelle erhalten.

Das 0,36-kb-Promotorkonstrukt wurde über Mismatch-PCR erstellt, es wurde am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingeführt und in das Startcodon ATG eine NcoI-Schnittstelle (Abb. 7, s. 2.7.1).

Die korrekte Klonierung wurde durch Sequenzieren des Promotorbereiches und des Überganges zwischen dem Promotorfragment und dem *Gus*-Gen überprüft. Dieses Promotorfragment enthält nicht das ACS4-Motiv. Das 0,5-kb-Promotorkonstrukt, das das ACS4-Motiv umfasst, wurde analog zum 0,36-kb-Konstrukt nach entsprechender Mismatch-PCR kloniert (2.7.1). Zur Bildung des „No-Promotor“-Konstrukts wurde das 0,5-kb-Reportergen-Konstrukt mit BamHI und NcoI geöffnet, die Enden mit T4-DNA-Polymerase geglättet und danach religiert.

Das 0,5-kb-Promotorkonstrukt diente nach Umklonierung in pUC19 (0,5 kb-pUC) als Ausgangspunkt für die Erstellung des 5,3-kb-Reportergens. Nach Öffnung von 0,5 kb-pUC mit KpnI und PstI wurde das genomische 4,8-kb-KpnI-PstI-Fragment von *Igl* ligiert und damit das 5,3-kb-Reportergen-Konstrukt erhalten. Schneiden des 5,3-kb-Konstrukts mit PstI und BglIII, Glätten der Enden mit T4-DNA-Polymerase und Religation führte zur Gewinnung des 3,7-kb-Reporterkonstrukts.

Der 0,7-kb-Promotor wurde aus dem 3,7-kb-Promotorkonstrukt gewonnen. Dieses wurde mit NdeI geschnitten (NdeI Schnittstelle bei 697 bp) und die Enden mit T4-DNA-Polymerase geglättet (NdeI*). Nachfolgendes Schneiden mit NcoI liefert das 697-bp-NdeI*-NcoI-Promotorfragment. Parallel wurde das 0,5-kb-Promotorkonstrukt mit BamHI geöffnet, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet (BamHI*) und der Promotor durch nachfolgendes Schneiden mit NcoI entfernt. In diesen BamHI*-NcoI-Vektor (pUC19 mit dem *Gus*-Gen in Verbindung mit dem *nos*-Terminator) wurde das 697-bp-NdeI*-NcoI-Fragment ligiert.

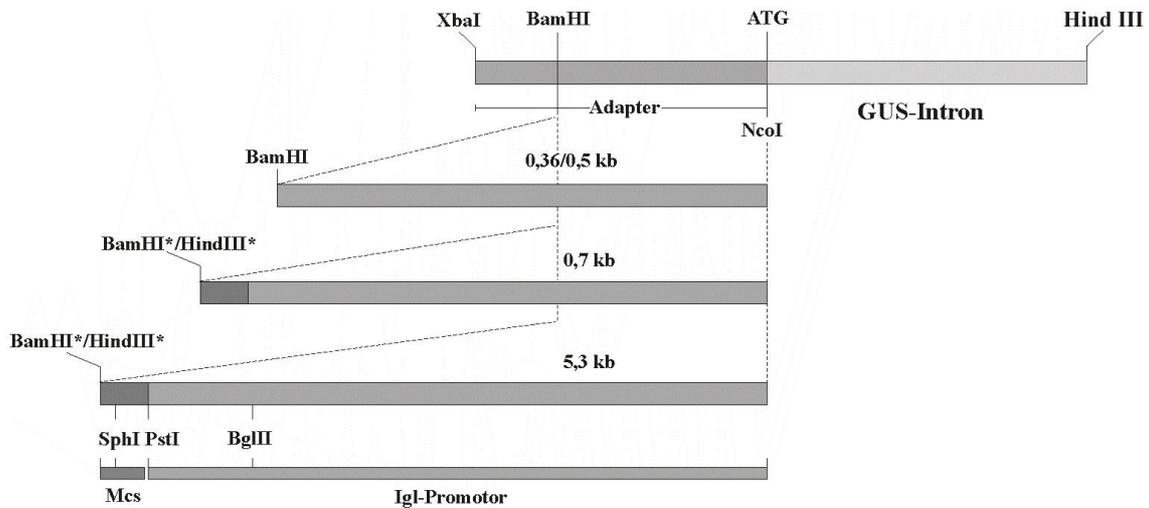


Abbildung 7. Schematische Darstellung der *Gus*-Intron-Promotorkonstrukte. Über die *Nco*I-Schnittstelle im Startcodon des *Gus*-Gens und die *Xba*I-Schnittstelle des Vektors wurde ein Adapter ligiert. Die *Igl*-Promotorfragmente wurden über ihre *Nco*I und *Bam*HI-Schnittstelle kloniert oder nach Glätten der *Bam*HI-Schnittstelle (*Bam*HI*) des Vektors als Fragmente mit *Nco*I-Schnitt und geglättetem *Hind*III-Schnitt (*Hind*III*). Das 3,7-kb-Deletionskonstrukt wurde durch Schneiden des 5,3-kb-Promotors mit *Sph*I und *Bgl*III erhalten. Ein Teil der „Multiple Kloning Site“ von pUC 19 ist in die Klonierung einbezogen. In die unique *Xba*I-Schnittstelle wurde für weitere Klonierungen über einen Adapter eine *Hind*III-Schnittstelle eingeführt.

Promotorkonstrukte für die Transformation von *Arabidopsis thaliana*. Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte für die stabile *A. thaliana*-Transformation wurden aus den oben beschriebenen Konstrukten (Abb. 6, Konstrukte 1-5) hergestellt. Die Promotor-Reporter-Gen-Fragmente wurden mit *Eco*RI und *Hind*III ausgeschnitten und in den mit denselben Enzymen geschnittenen pGPTV-BAR B-Vektor kloniert.

Promotorkonstrukte für *Hordeum vulgare* Transformation. Für die Gerstetransformation war es nötig, alle Promotorsequenzen mit *Gus*-Intron-Reporter-Genen zu verbinden, da das intronhaltige Gen in der Pflanzenzelle besser exprimiert wird und eine Agrobakterien-Hintergrundexpression ausgeschlossen werden kann. Das 35S-Promotor-*Gus*-Intron-Terminator-Gen (Vancanneyt et al., 1990) wurde mit *Xba*I und *Sma*I geschnitten und dadurch der 35S-Promotor entfernt. Es wurde ein Adapter (Adapter 1, s. 2.2) ligiert. Nach Ligation dieses Adapters konnten die zur Untersuchung anstehenden 5'-upstream-Sequenzen des *Igl*-Gens als *Bam*HI-*Nco*I-Fragmente (0,36-kb- und 0,5-kb-Promotor) oder als *Hind*III*-*Nco*I-Fragmente (0,7-kb-Promotor, 5,3-kb-Promotor) in das mit *Nco*I-*Bam*HI bzw. *Nco*I-*Bam*HI* geöffnete Plasmid kloniert werden. Das 3,7-kb-Konstrukt wurde aus dem 5,3-kb-Konstrukt durch Schneiden mit *Bgl*III und *Sph*I, Glätten der

Enden und anschließende Ligation gewonnen (Abb. 7). Für die weitere Klonierung dieser Promotor-*Gus*-Intron-Terminator-Kassette wurde im 5'-Bereich mit einem Adapter (Adapter 2, s. 2.2) über die unique *Xba*I-Schnittstelle (Abb. 7) eine *Hind*III-Erkennungsstelle eingeführt. Dadurch war es möglich, die Promotor-*Gus*-Intron-Terminator-Kassette als *Hind*III-Fragment zu gewinnen und in die einzige *Hind*III-Schnittstelle des binären Vektors pTG101B (Abb. 8) einzufügen. Die Orientierung der in pTG101B integrierten Promotor-*Gus*-Intron-Terminator-Kassette wurde durch Schneiden mit *Nco*I bestimmt. Es wurden Klone ausgewählt, die die Promotorkonstrukte und das zur Selektion verwendete *Bar*-Gen in Kopf-zu-Schwanz-Orientierung tragen (Abb. 8).

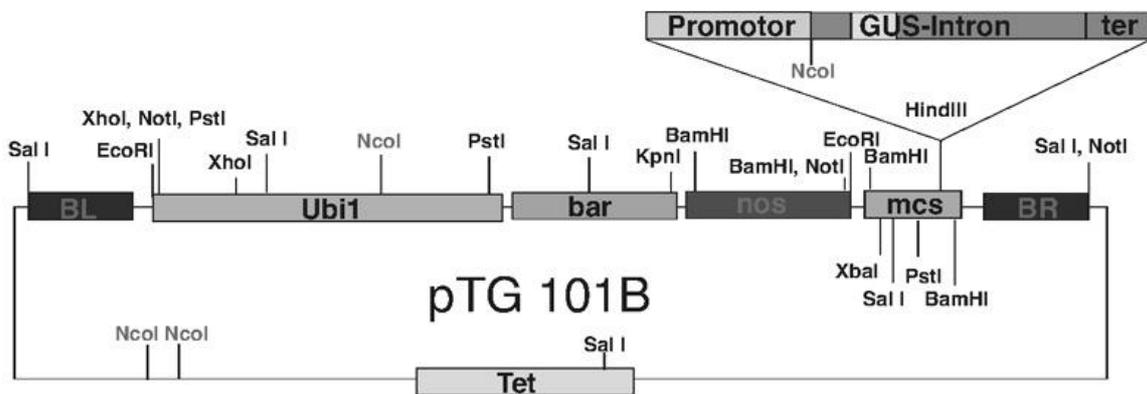


Abbildung 8. Schematische Darstellung des binären Vektors pTG101B und der Klonierung der *Igl*-Promotor-*Gus*-Intron-Konstrukte. Das Pflanzenresistenzgen *BarB* ist mit dem Promotor *Ubi1* verbunden und wird am 5'-Ende von der „Left Border“ (BL) der T-DNA flankiert. Die *Igl*-Promotor-Reportersequenzen wurden über die *Hind*III-Schnittstelle des Vektors kloniert, die Sequenz ist von der „Right Border“ (BR) flankiert. Der Selektionsmarker *BarB* und das *Gus*-Reporter-gen haben die gleiche Orientierung. Alle relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Das Plasmid trägt das TetA-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien.

3.2.2 Transiente Expressionssysteme

Analyse von Maisprotoplasten. Maisprotoplasten wurden aus 11 - 13 Tage alten, im Licht gezogenen Pflänzchen isoliert. Die Ausbeute betrug 10^6 Protoplasten pro g Blattmaterial. Die isolierten Protoplasten wurden mit Volicitin inkubiert (1,2 μ g/ml und 0,12 μ g/ml) und die Induktion der *Igl*-Transkription untersucht. Es wurde RNA isoliert und *Igl*-Transkripte je durch RT-PCR im LC bestimmt (s. 2.6.4, 2.6.5, 2.10). Es konnte keine Elicitierung für *Igl* festgestellt

werden. Damit stellen Protoplasten kein geeignetes transientes Expressionssystem für die Untersuchung des *Igl*-Promotors dar.

„Particle Bombardment“ von Maisblättern und -keimlingen. Der Einsatz der Genkanone hat sich als effektive Methode für transiente und stabile Transformation von biologischem Material erwiesen (Eскурra et al., 2000). Zur Etablierung des transienten Gentransfers in Maisblätter wurde das 35S-Promotor-*Gus*-Reporterkonstrukt eingesetzt (Abb. 9). Vollentfaltete Blätter wurden in ca. 2 - 3 cm große Stücke geschnitten und mit der Unterseite auf MS-Medium gelegt. Danach erfolgte der Beschuss. Nach dem Bombardment erfolgte eine Inkubation für 16 h im Licht. Anschließend wurde die *Gus*-Genaktivität histologisch durch Umsatz von X-Gluc nachgewiesen. Parallel wurde eine Bestimmung der *Igl*-Transkription nach Volicitin-Induktion mit entsprechend behandeltem Blattmaterial ausgeführt. Dazu wurden Mais-Pflänzchen wie beschrieben (Frey et al., 2000) 30 - 60 Minuten in Volicitin inkubiert, danach die Blätter für das Bombardment präpariert und beschossen. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben mit RT-PCR. In diesem Material erfolgte keine Elicitierung. Das Ausbleiben der *Igl*-Induktion könnte auf die wiederholte Verwundung, der das Gewebe bei diesem Verfahren ausgesetzt ist, zurückzuführen sein (siehe 4.2).



Abbildung 9. „Particle Bombardment“ von jungen Maisblättern (11 - 13 Tage). Verwendet wurde das No-Promotor-Konstrukt (oben) und das 35S-*Gus*-Reportergen (unten). *Gus*-Gen-Aktivität wurde durch Umsatz von X-Gluc nachgewiesen.

Mais-Zellkultur. Die Zellkultur PC-1116 *Zea mays* L. cv. Black Mexican Sweet Corn wurde im Labor etabliert. Sie wurde auf ihre Elicitierbarkeit mit Volicitin untersucht. Die Zellkultur wurde 45 min und 1,5 h mit 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Volicitin versetzt, die Zellen eingefroren, anschließend RNA isoliert und wie beschrieben analysiert. Es konnte keine spezifische *Igl*-Expression festgestellt werden. Damit stellt die Zellkultur kein geeignetes Ausgangsmaterial dar.

Transiente Expression durch Agrobakterientransfer in Maisblätter und -keimlinge.

Agrobacterium tumefaciens infiziert in der Natur dikotyle Pflanzen. Inzwischen wurden auch Methoden für die stabile transiente Transformation von monokotylen Pflanzen (Tingey et al., 1997; Frame et al., 2002; Ishida et al., 1995) etabliert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass der Gentransfer in die intakte Pflanze erfolgt und mehrere Stunden vor der Elicitierung erfolgen kann. Außerdem ist die Verwundung durch Injektion verglichen mit dem Bombardment minimal und das Verfahren könnte daher ein geeignetes Testsystem für die *Igl*-Promotoranalyse bilden. Die transiente Transformation wurden in der Literatur für 3 Tage alte Keimlinge und für aus Maiskörnern 14 Tage nach Pollinierung isolierte Embryonen beschrieben (Shen und Escudero, 1999). Verwendet wurden jeweils stark virulente *Agrobacterium*-Stämme wie LBA4404 und AGL1 (Ishida et al., 1995; Tingay et al., 1997). Diese Stämme wurden für den Versuch der transienten Transformation (s. 2.11.3) von Maiskeimlingen mit dem binären Vektor pMDmcs 35S-Promotor-*Gus*-Intron (s. 2.7.1) benutzt. Zusätzlich wurde das „superbinäre“ Agrobakterien-Ti-Plasmid-Vektorsystem LBA4404 mit dem Helferplasmid pSB1- und pSB11-35S-*Gus*-Intron (s. 2.7.1) eingesetzt. Das Verfahren der transienten Transformation durch Agrobakterien-Infiltration und die benutzten *Agrobacterium*-Stämme wurden durch erfolgreiche Transformation von Tabak-Blättern überprüft. Mit 11 - 13 Tage alten Maispflanzen sowie 3 Tage alten Maiskeimlingen konnte jedoch keine transiente GUS-Expression erzielt werden.

3.2.3 Analyse von Reporter-gen-Konstrukten in heterologen Pflanzensystemen

Für die Analyse der Promotoraktivität durch stabile Transformation heterologer Systeme wurden *Arabidopsis thaliana* und *Hordeum vulgare* verwendet. Die dicotyledonen *Arabidopsis*-Pflanzen lassen sich leicht transformieren. Gerste ist als Monokotyledone und Mitglied der Familie der Gräser mit Mais enger verwandt und kann als passenderes Expressionssystem angesehen werden. Im Vergleich mit der Agrobakterien-Transformation von *Arabidopsis thaliana* ist die Transformation von *Hordeum vulgare* jedoch anspruchsvoll. Im *Arabidopsis*-Expressionssystem kann mit den Reporter-gen-Konstrukten festgestellt werden, ob konservierte Regulationselemente vorliegen, die sowohl bei Monokot- als auch bei Dikot-Pflanzen benutzt werden. *Hordeum vulgare* stellt ein Expressionssystem dar, dessen Reaktion auf das Pflanzenwundhormon Jasmonat bekannt ist (Creelman und Mullet, 1997; Walters et al., 2002; Wasternack und Parthier, 1997). Wenn die Elicitierung durch Volicitin Komponenten des „Jasmonat-Signalings“ benutzt, könnten *Igl*-Promotorelemente vorliegen, die auch in Gerste funktional sind.

3.2.3.1 Expression der Reporter-gen-Konstrukte in *Arabidopsis thaliana*

Die Promotorkonstrukte des *Igl*-Gens wurden mit Hilfe des binären pGPTV-BAR B-Vektors und *A. tumefaciens* GV3101 pMB 90-Stammes in *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Col-0, transformiert. Es wurden 25 - 30 primäre Transformanten (T_0) pro Konstrukt isoliert. Die T_0 -Generation wurde geselbstet, und die Samen geerntet. Die Nachkommen von 3 - 5 Primärtransformanten pro Konstrukt wurden einer Southern-Analyse unterzogen, um Kopien-Anzahl und Intaktheit der transformierten Gene zu bestimmen. Es wurden Pflanzen mit einer Kopie der T-DNA weiteruntersucht. Bei den individuellen Pflanzenlinien desselben Konstruktes traten Schwankungen der Expressionsstärke auf (Abb. 13), das Muster der Expression war aber jeweils übereinstimmend. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen unterschiedlichen Alters wurden mittels histochemischen GUS-Assays analysiert. Parallel wurden Transformanten mit dem Auxin-Reporterkonstrukt DR5 (Sabatini et al., 1999) analysiert.

Expressionsmuster in 13 Tage alten Keimlingen. In jungen, 13 Tage alten Keimlingen zeigten alle *Igl*-Konstrukte, außer dem 0,36-kb-Promotorkonstrukt, dem das ACS4-Motiv fehlt, eine deutliche Färbung distaler Zellen in einem punktförmigen Bereich nahe der Blattspitze (Abb. 10). Die geringste Färbungsintensität wurde mit dem 0,5-kb-Promotorkonstrukt beobachtet. Bei dem 0,7-kb-Promotorkonstrukt war die Expression des *Gus*-Gens in diesem Bereich der Blätter erhöht. Die weitere Vergrößerung des untersuchten Promotorbereiches führte zu keiner weiteren Steigerung der punktförmigen Expression (Abb. 10). Die Reporter-gen-Konstrukte 3,7-kb-Promotor und 5,3-kb-Promotor vermittelten aber zusätzlich eine Expression des Reportergens in Hypokotyl und Petiolen, diese Expression war am stärksten mit dem 5,3-kb-Promotor.

Die DR5-Transformanten zeigten in den Kotyledonen ein ähnliches Expressionsmuster wie die *Igl*-Transformanten. Allerdings war die Expressionsregion weniger scharf begrenzt und weniger punktförmig. Zusätzlich wiesen die DR5-Pflanzen eine Färbung der Wurzelspitze auf, was bei den *Igl*-Promotor-Transformanten nicht der Fall war (Abb. 10).

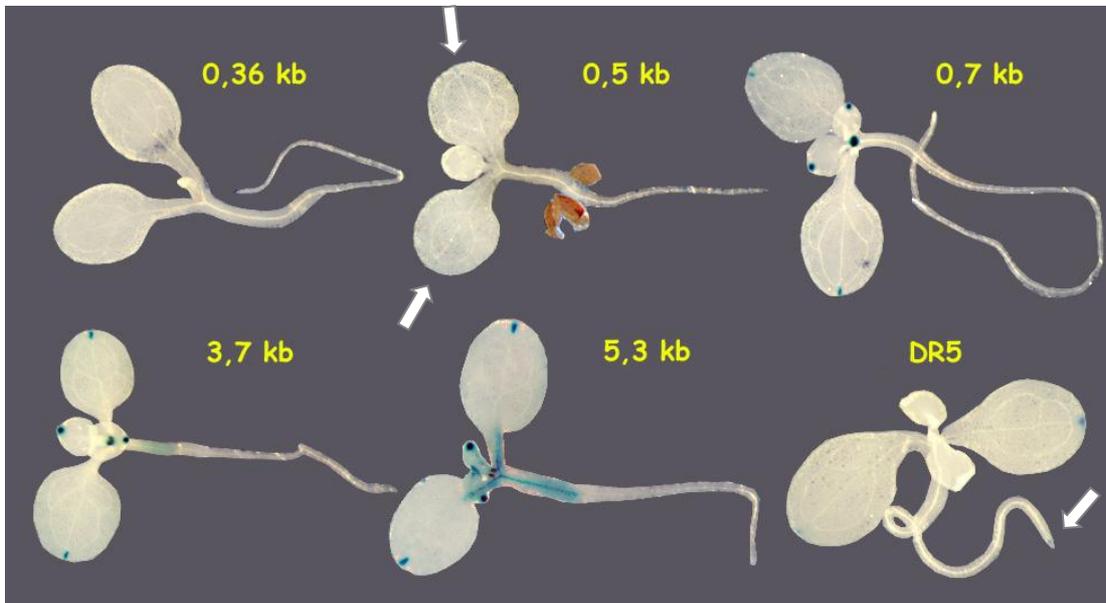


Abbildung 10. Expression der *Igl*-Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte in 13 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Analysiert wurden die *Igl*-Promotorkonstrukte (0,36-kb- bis 5,3-kb-Konstrukt) im Vergleich mit dem Auxin-Reporter-Gen-Konstrukt DR5. Auffallend ist eine distinkte punktförmige Expressionsregion an der Spitze von Keimblättern und Blättern, die mit dem 0,36-kb-Konstrukt (markiert durch die Pfeile) und mit allen größeren Promotorsequenzen ausgeprägt wird. Es kommt zur Expression des Reportergens im Hypokotyl (3,7-kb- und 5,3-kb-Konstrukt) und in den Petiolen (5,3-kb-Konstrukt). Nur mit dem DR5-Reporter-Gen wird eine Expression in der Wurzel detektiert (Pfeil).

Expressionsmuster in den 6-Blatt-Stadium-Keimlingen. Im 6-Blatt-Stadium der *Arabidopsis*-Keimlinge wurde wiederum eine distinkte Genexpression in den Blättern aufgezeigt (Abb. 11). Das 0,36-kb-Reporterkonstrukt vermittelte keine *Gus*-Genexpression. Mit dem nächst größeren Promotor (0,5 kb) trat eine punktförmige Expression des *Gus*-Gens am Blattrand auf, diese ist jeweils den Anlagen zahnförmiger Blattausswüchse benachbart. Es traten pro Blatt bis zu 7 solche exprimierenden Bereiche auf. Der 3,7-kb-Promotor führte außerdem zur *Gus*-Genexpression an der Basis der Seitenwurzeln. Mit dem 5,3-kb-Reporterkonstrukt wurde zusätzlich *Gus*-Genexpression in den Petiolen und im Hypokotyl beobachtet. Wie in den jungen Keimlingen fand sich mit dem 5,3-kb-Promotor z. T. eine diffuse Hintergrundfärbung über die gesamte Blattspreite.

Die DR5-Transformanten zeigten in diesem Stadium eine diffuse Färbung, die sich ausgehend von distalem Blattbereich z. T. am Blattrand entlang zog, und sich ebenfalls im Bereich der Anlagen für Blattspitzen konzentrieren konnte. Wiederum wurde das DR5-*Gus*-Reporter-Gen in den Wurzelspitzen exprimiert.

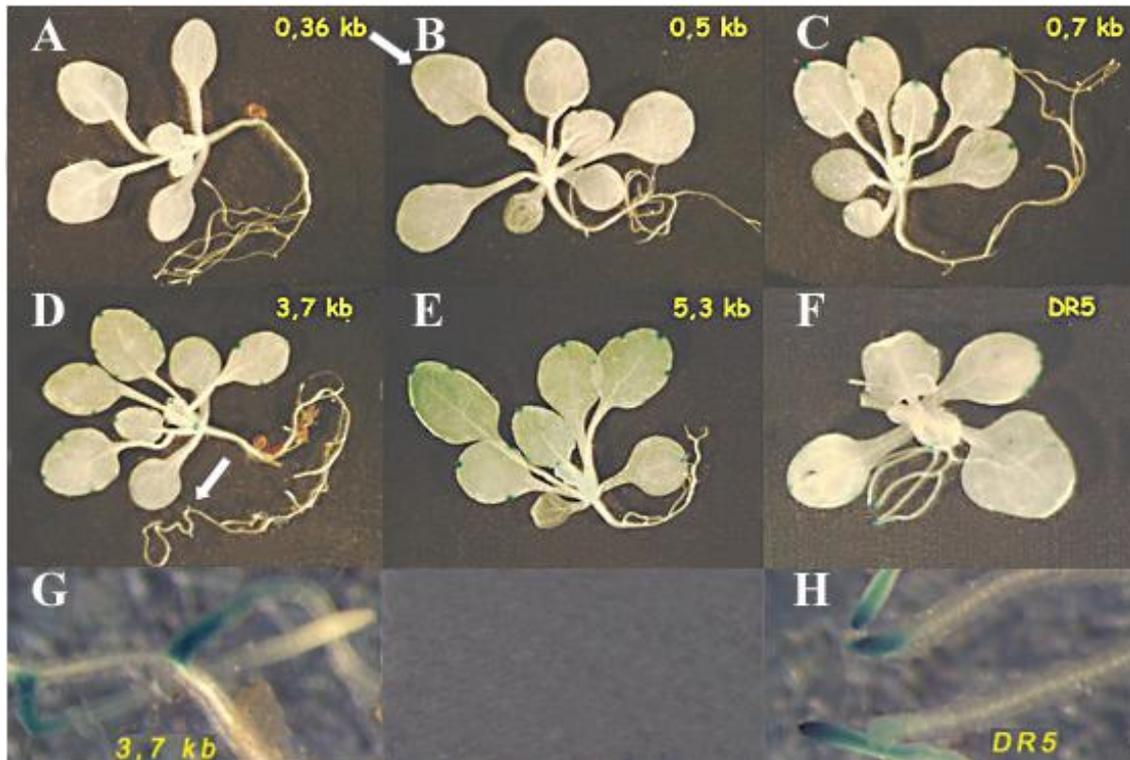


Abbildung 11. Expression der *Igl*-Promotor-Reporter-Konstrukte im 6-Blatt-Stadium von *Arabidopsis thaliana*. Analysiert wurden die *Igl*-Promotorkonstrukte (0,36-kb- bis 5,3-kb-Konstrukt, **A-E**) im Vergleich mit dem Auxin-Reporter-Konstrukt DR5 (**F**). Mit dem 0,36-kb-Promotorkonstrukt ist keine *Gus*-Genexpression nachweisbar. Bei den anderen Konstrukten konzentriert sich die Expression auf punktförmige Bereiche am Blattrand. Für das 0,5-kb-Promotorkonstrukt liegt die Genexpression an der Nachweisgrenze, GUS-Aktivität wird nur im Bereich der Blattspitze gefunden (**B**, Pfeil). Bei Konstrukten 0,7-kb-, 3,7-kb- und 5,3-kb-Promotor finden sich am Blattrand mehrere Expressionsorte. Die beiden größten Promotorkonstrukte weisen bei manchen Pflanzen eine Transgen-Expression in der Wurzel auf (in **D** durch den Pfeil markiert). Diese Färbung konzentriert sich auf die Basis der Seitenwurzeln (**G**). Mit dem DR5-Promotor kommt es zu einer Expression an mehreren Stellen des Blattrandes, diese ist jedoch nicht so punktförmig wie bei den *Igl*-Promotorkonstrukten. Mit diesem Konstrukt kam es in allen Wurzelspitzen zur Expression des *Gus*-Gens (**H**).

Expressionsmuster im Rosetten-Stadium. Im Rosetten-Stadium zeigte nur das 0,7-kb-Promotorkonstrukt eine starke Blattexpression des Reportergens mit dem gleichen Muster wie im 6-Blatt-Stadium (Abb. 12). Für die 3,7-kb- und 5,3-kb-Reporter-Konstrukte war die Expression im Blattbereich gering, punktförmige exprimierende Bereiche wurden vor allem an der Spitze der Blätter detektiert. Diese beiden Konstrukte vermittelten im Rosettenstadium eine Expression in den Petiolen. Wurzeln und Blattspreite wiesen bei keinem Reporter-Konstrukt eine Färbung auf.

Das DR5-Konstrukt zeigte in den Blättern ein ähnliches Expressionsmuster wie das 0,7-kb-Promotorkonstrukt, allerdings ist mit dem DR5-Promotor die exprimierte Region weniger punktförmig und nicht so scharf begrenzt wie mit dem 0,7-kb-*Igl*-Promotorkonstrukt. Starke *Gus*-Genexpression wurde bei den DR5-Reportergeren-Pflanzen in den Wurzelspitzen festgestellt.



Abbildung 12. Expression der *Igl*-Promotor-Reportergeren-Konstrukte im Rosetten-Stadium von *Arabidopsis thaliana*. Analysiert wurden die *Igl*-Promotorkonstrukte (0,36-kb- bis 5,3-kb-Konstrukt) im Vergleich mit dem Auxin-Reportergeren-Konstrukt DR5. Mit dem 0,36-kb-Promotorkonstrukt ist keine *Gus*-Genexpression nachweisbar. Klare Expression in den Blättern zeigt sich nur beim 0,7-kb-Promotorkonstrukt und beim DR5-Reportergeren. Geringe Expression an den Blattspitzen findet sich mit dem 3,7-kb-Promotorkonstrukt (siehe vergrößerter Einschub) und mit dem 5,3-kb-Promotorkonstrukt (weiße Pfeile). Der schwarze Pfeil deutet auf Bereiche mit *Gus*-Expression in den Petiolen, die mit dem 3,7-kb- und dem 5,3-kb-Konstrukt gefunden wird. Mit dem DR5-Reportergeren ergibt sich eine Expression am Blattrand und in den Wurzelspitzen.

Systematische Analyse der Reportergerenexpression im *Arabidopsis*-Blatt. In verschiedenen Stadien der *Arabidopsis*-Entwicklung hatte sich eine Änderung des Expressionsmusters der Reportergeren in den unterschiedlich differenzierten Blättern ergeben. Diese Musterbildung wurde durch eine systematische Analyse untersucht. Dazu wurde das 0,7-kb-Promotorkonstrukt verwendet, das das klarste Expressionsmuster aufweist. Im Vergleich dazu wurde das DR5-Konstrukt analysiert. Es wurden 30 Tage alte Pflanzen untersucht.

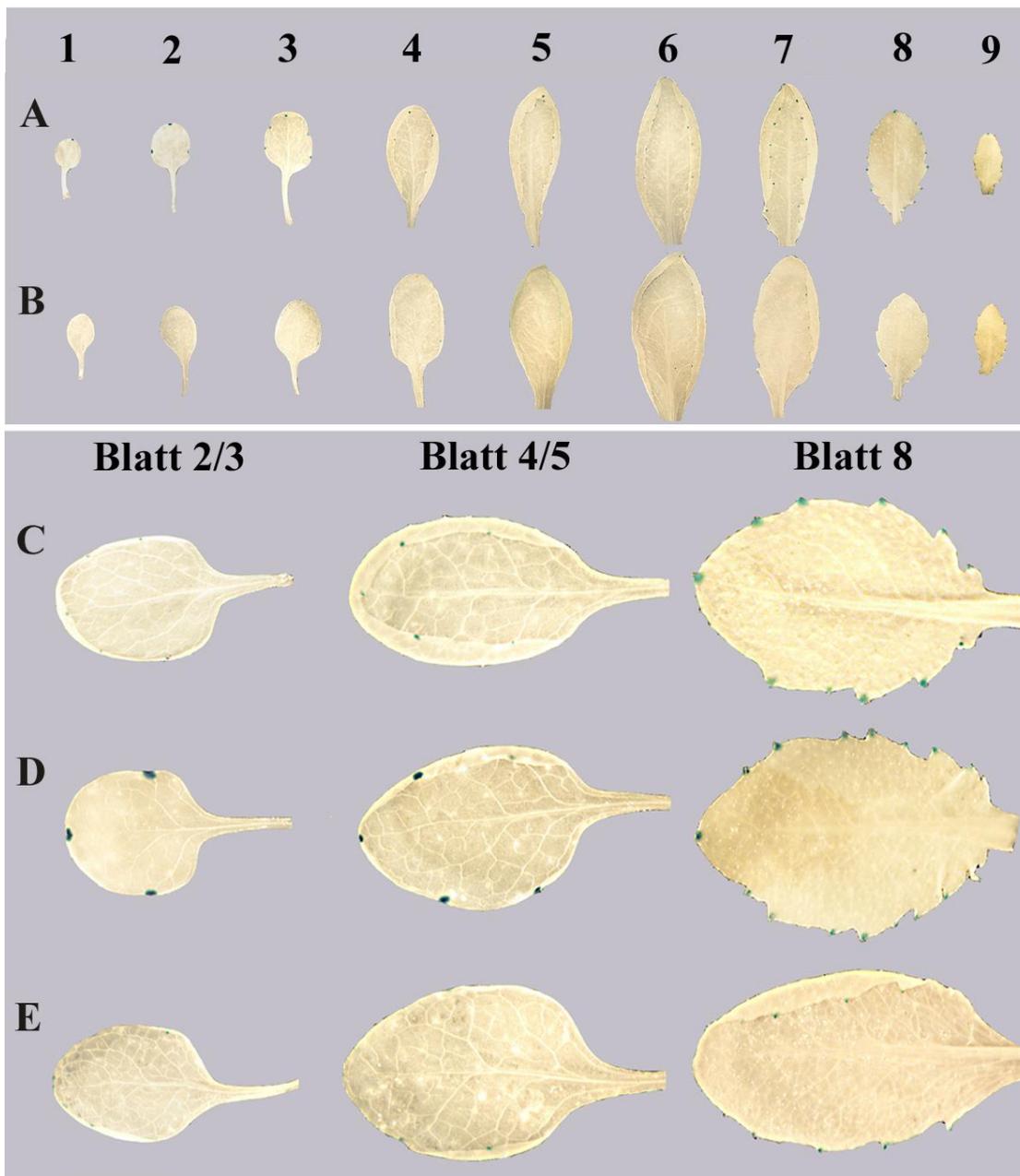


Abbildung 13. Systematische Analyse der Transgen-Expression in *Arabidopsis thaliana* Blättern. Blatt 1 (ältestes Blatt) bis Blatt 9 (jüngstes Blatt) wurden auf die Expression des *Gus*-Reportergens untersucht. Analysiert wurde 0,7-kb-Promotorkonstrukt, es wurden in **A**, **C** und **D** unterschiedliche Primärtransformanten eingesetzt. Zum Vergleich wurde das DR5-Promotorkonstrukt analysiert, in **B** und **E** sind unterschiedliche DR5-Reporter-Transformanten analysiert. Mit zunehmender Differenzierung der Auszahnungen des Blattrandes zeigt sich ein Ansteigen der Zahl der Expressionsorte. Bei den jüngsten Blättern erfolgt die Transgen-Expression dagegen nur an der Blattspitze. Die Stärke der Genexpression variiert in den individuellen Transformanten.

Das älteste Blatt (1, Abb. 13) gleicht mit seiner ovalen Form und glatterm Rand einem Keimblatt. Das Keimblatt ist in diesem Entwicklungsstadium bereits degeneriert. Die nachfolgenden Blätter (2 - 7) zeigen zunehmende Größe und fortschreitend eine Ausdifferenzierung der Blattform durch

zahnförmige Auswüchse am Blattrand. Die jüngsten Blätter (8,9) sind wieder kleiner, haben aber einen stark gezackten Blattrand.

Für das 0,7-kb-Reportergen ergab sich parallel zum Ausdifferenzieren des Blattes durch Ausformen von Blattspitzen eine Zunahme der punktförmigen Expressionsorte an der Basis dieser Spitzen. Die Anzahl der gefärbten punktförmigen Bereiche und der Blattspitzen stimmten zumeist überein. Dies galt nicht für die jüngsten Blätter, beim jüngsten Blatt gab es nur eine Expressionsstelle an der Spitze des Blattes.

In den ältesten Blättern der DR5-Transformanten war keine scharfe punktförmige Expression des Reportergens zu finden, die Färbung verlief hier diffus, ausgehend von der Blattspitze am Blattrand (Blatt 1 - 6). Jüngere Blätter zeigen eine Konzentrierung der Genexpression auf Regionen, die denen der Expression durch den 0,7-kb-Promotorkonstrukt entsprechen (Blatt 7). Die jüngsten Blätter (1-9) wiesen keine GUS-Expression auf.

In diese Untersuchungen wurden unterschiedliche primäre Transformanten des 0,7-kb-Promotorkonstruktes und DR5-Reporters einbezogen (Abb. 13 C,D,E). Diese unterschieden sich lediglich in der Intensität der Reporterexpression, nicht im ausgeprägten Muster.

Definition des Expressionsortes. Um den Ort der Expression zu definieren, wurde die Hoyers-Methode verwendet (Torres-Ruiz und Jürgens, 1994). Hoyers-Reagenz löst den Inhalt der Zelle auf und macht dadurch das Gewebe durchsichtig, so dass feine Strukturen, wie z. B. die Leitbündel, gut sichtbar werden. Durch diese Analyse sollte die Beziehung von Reporterexpression und Leitbündelverteilung in den Blättern bestimmt werden (s. Abb. 14). In fast allen Fällen fand sich am Ort der *Gus*-Genexpression ein Zusammentreffen von Leitbündelsträngen. Es wurden rund 50 Expressionsorte analysiert (s. Abb. 14), nur in zwei Fällen konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden. Durch die Vereinigung von Leitbündeln sind im Blatt Wasserporen, sogenannte Hydathoden, charakterisiert (Tsukaya und Uchimiya, 1997). Die Expression des Reportergens könnte damit mit der Differenzierung der Hydathoden in Verbindung stehen.

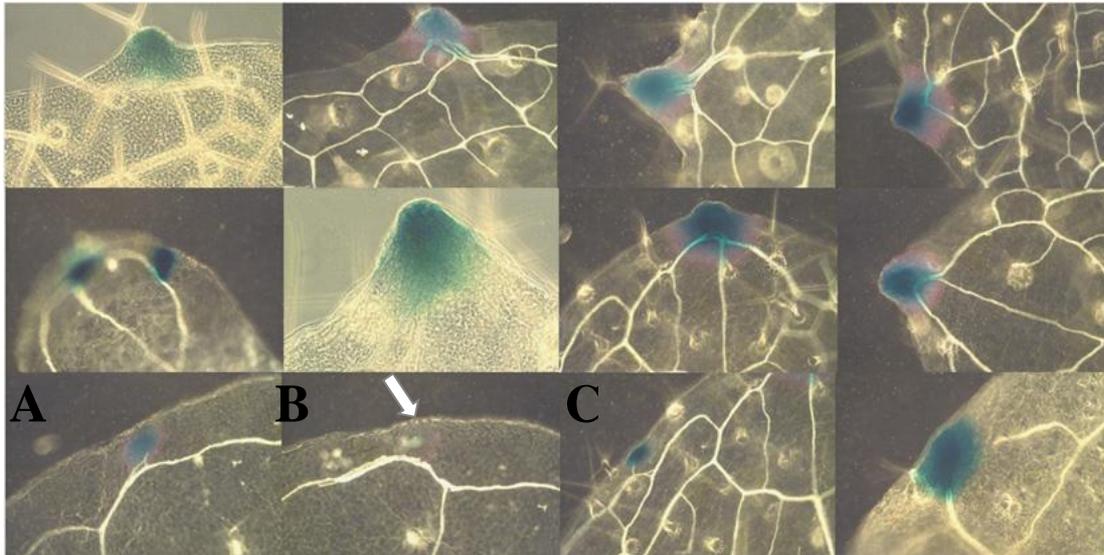


Abbildung 14. Definition des Expressionsortes. Blattpräparate wurden nach Inkubation mit X-Gluc nach Hoyers geklärt und mikroskopisch untersucht. *Gus*-Genexpression findet sich an der Vereinigung von Leitbündelsträngen. Die einzigen drei Beispiele, in denen diese Lokalisation nicht eindeutig ist, sind in **A**, **B** und **C** dargestellt.

Expressionsmuster in den Blüten und Tragblättern. Die Tragblätter wurden nur für das 0,7-kb-Promotorkonstrukt analysiert und zeigten GUS-Expression in einem Muster, das mit dem der Laubblätter überein stimmte, die Stärke der Expression war geringer (Abb. 15).



Abbildung 15. Expression in den Tragblättern. Mit dem 0,7-kb-Konstrukt wird in den Tragblättern wie in den Rosettenblättern eine punktförmige *Gus*-Genexpression im Bereich der Blattspitze und der zahnförmigen Auswüchse des Blattrands vermittelt.

In den Blüten wurde mit den 0,5-kb-, 0,7-kb-, 3,7-kb- und 5,3-kb-Promotorkonstrukten GUS-Expression in manchen Stigmata beobachtet (Abb. 16). Dagegen zeigte das DR5-Konstrukt, ebenfalls nur bei manchen Pflanzen, eine Färbung der Antheren.

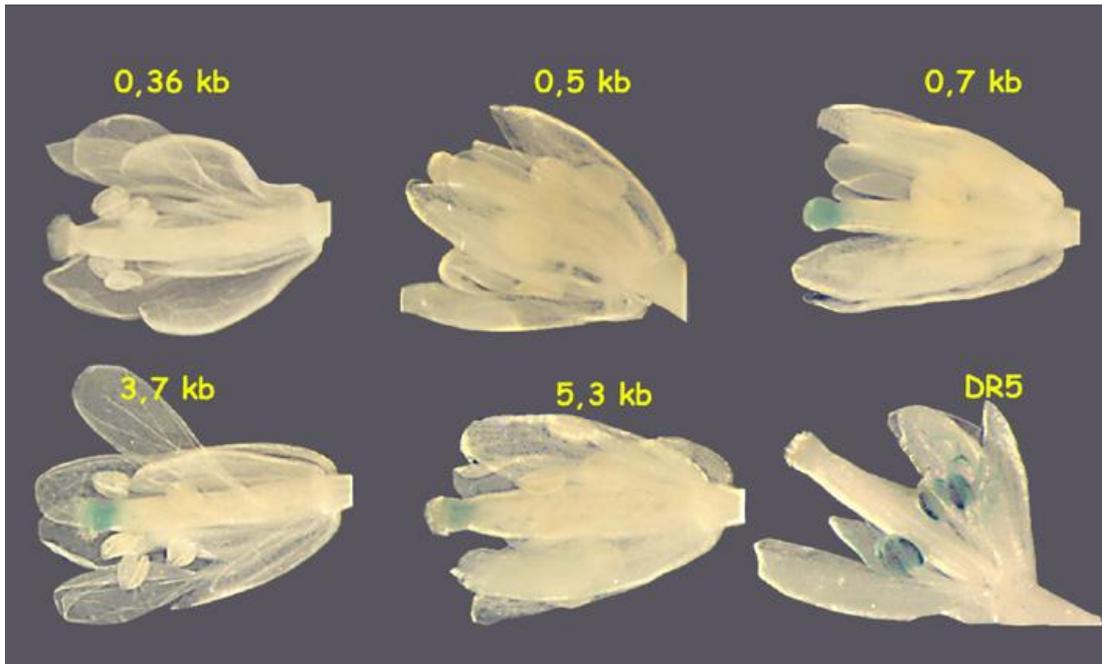


Abbildung 16. Expression in der Blüte. Mit den Konstrukten des 0,7-kb-, 3,7-kb- und 5,3-kb-Igl-Promotors kommt es zu *Gus*-Expression im Pistill. Das DR5-Reporterkonstrukt zeigt dagegen eine Expression in den Antheren.

Inkubation mit Volicitin und Jasmonat. Die Expression des *Igl*-Gens wird in Mais durch den Elicitor Volicitin induziert. Volicitin und Jasmonat sind von Fettsäure-Aminosäure-Konjugaten abgeleitete Substanzen. Beide Signalstoffe könnten aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Struktur gemeinsame Signaltransduktionskomponenten benutzen. Es kann spekuliert werden, dass diese in Pflanzen konserviert sind, da es sich bei Jasmonat um ein generelles Pflanzenhormon handelt. Durch Applikation von Volicitin und Jasmonat sollte überprüft werden, ob diese Substanzen in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen die Expression der Reporter-gen-Konstrukte beeinflussen.

Für den Induktionstest wurden die 13 Tage alten *Arabidopsis*-Keimlinge von der Wurzel abgetrennt und in 1,2 µg/ml Volicitin- bzw. 100 µM (-)-Jasmonat-Lösung 1 h inkubiert und anschließend die Reporter-genexpression histologisch bestimmt. Parallel wurden in Puffer inkubierte Kontrollpflanzen analysiert. Für alle *Igl*-Promotor-Reporter-gen-Konstrukte wurde keine Veränderung der Expression festgestellt (Ergebnis nicht dargestellt).

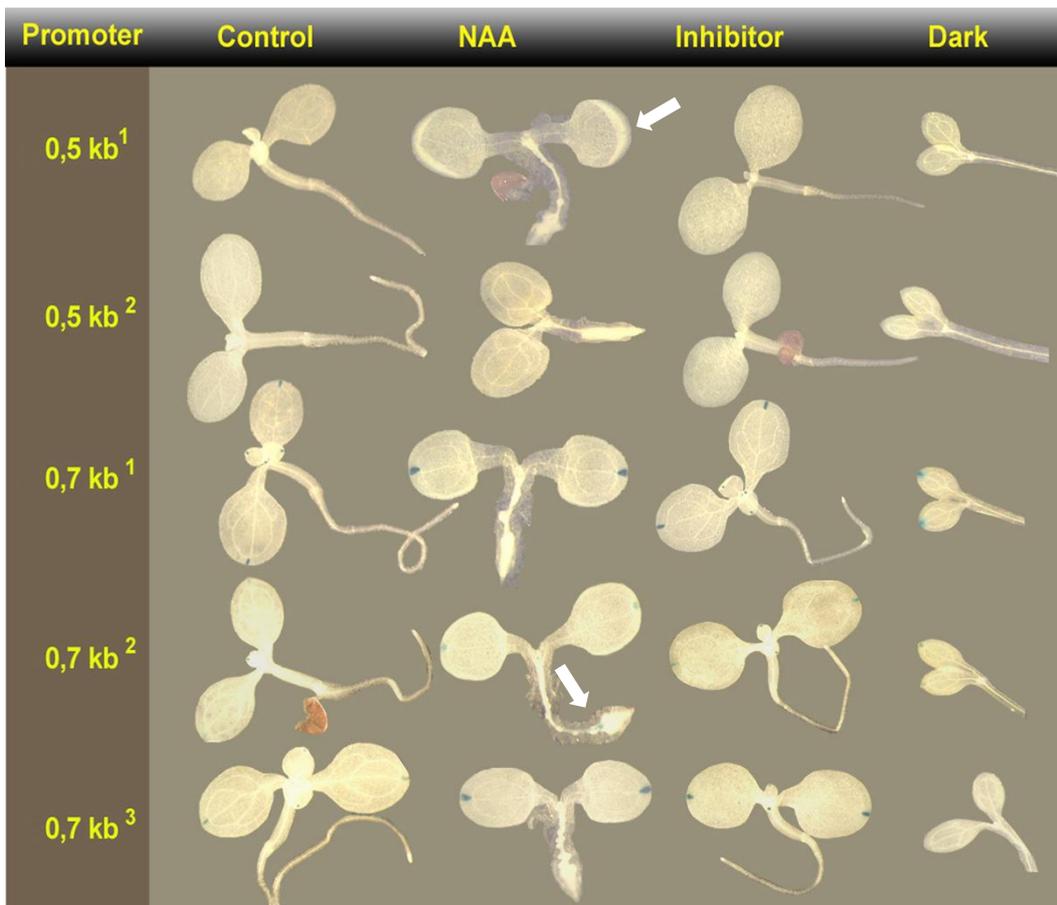


Abbildung 17. Einfluss von Auxin und Licht auf die Reporterexpression. Transgene Pflanzen mit dem 0,5-kb- und dem 0,7-kb-Konstrukt wurden auf NAA und auf dem Auxin-Antagonisten PCIB und im Dunklen angezogen. Es wurden zwei unabhängige Linien für den 0,5-kb-Promotor (1,2) und drei unabhängige Linien (1, 2, 3) für den 0,7-kb-Promotor analysiert. Das Expressionsmuster ist in den Blättern bei allen Inkubationsbedingungen übereinstimmend. Die Applikation von NAA führt beim 0,7-kb-Konstrukt bei einzelnen Pflanzen zu Genexpression in der Wurzel (Pfeil).

Einfluss von Licht auf die Reporterexpression. In Mais ist die Induktion des *Igl*-Gens durch Volicitin von Wachstum und Licht abhängig (Frey, unveröffentlichte Ergebnisse). Deshalb wurde der Einfluss von Licht auf die Reporterexpression in *Arabidopsis thaliana* durch Anzucht im Dunklen (13 Tage) und anschließende histologische Analyse der *Gus*-Genexpression untersucht. Es ergab sich kein Unterschied zu in Licht gezogenen Pflanzen (Abb. 17).

Einfluss von Auxin auf die Reporterexpression. Das ACS4-Motiv des *Igl*-Gens wird auch im 5'-upstream-Bereich des Auxin-induzierbaren *ACS4*-Gens von *Arabidopsis thaliana* (Abel et al., 1995) gefunden, und das DR5-Reportergen, das die Gegenwart von Auxin durch *Gus*-Genexpression anzeigt, hat im Blatt ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie die *Igl*-Promotor-Reporter gene (Abb. 10). Daher kann spekuliert werden, dass auch die für die *Igl*-Promotor-konstrukte in *Arabidopsis thaliana* gefundene definierte Expression im Zusammenhang mit der

lokalen endogenen Auxinverteilung steht. Um den Einfluss von Auxin zu untersuchen, wurde den transgenen Pflanzen Auxin exogen durch Gabe von β -NAA (β -Naphthyl-Acetat-Säure) zugesetzt. Parallel dazu wurde der Auxin-Antagonist PCIB (2-(p-chlorophenoxy)-2-methyl-propionic acid) eingesetzt, um die Auxin-Konzentration zu erniedrigen. Die Keimlinge wurden 14 Tage auf MS-Medium (Kontrolle), MS-Medium mit 10 μ M β -NAA und MS-Medium mit 10 μ M PCIB angezogen. Die Analyse erfolgte durch X-Gluc-Färbung (Abb. 17).

Durch Inkubation mit exogenem Auxin traten morphologische Veränderungen der Keimlinge auf. Exogenes Auxin rief eine Verkürzung des Hypokotyls und der Wurzel, starke Wurzelhaarbildung und Verkrümmen der Kotyledone hervor. Der Inhibitor PCIB verursachte nur geringe morphologische Veränderungen der Keimlinge (Abb. 17). Hypokotyl und Wurzel sind, verglichen mit den Kontrollpflanzen, ein wenig verkürzt. Eine leichte Verkürzung von Hypokotyl und Wurzel wurde auch für die Doppelmutante *cyp79B2cyp79B3*, deren endogene Auxinkonzentration verringert ist, beobachtet (Zhao et al., 2002). Die Blätter von Kontrollpflanzen, NAA- und PCIB-inkubierten Pflanzen hatten alle eine ähnliche Morphologie.

Auf dem auxinhaltigen Medium wurde in rund einem Drittel der Pflanzen mit dem 0,7-kb-Promotorkonstrukt das *Gus*-Gen im Wurzelbereich exprimiert. Wurzelexpression konnte weder in den Kontrollpflanzen noch in den PCIB-inkubierten Pflanzen nachgewiesen werden. In den Blättern führte der Zusatz von NAA und PCIB zu keiner wesentlichen Veränderung der Expression des Reportergens.

3.2.3.2 Herstellung transgener Pflanzen von *Hordeum vulgare*

Test der virulenten Agrobakterienstämme durch Einsatz zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* wurde, wie in 2.12 beschrieben, transformiert mit den binären Vektoren pTG101B (0,36-kb-, 0,5-kb-, 0,7-kb-, 3,7-kb-Promotor-*Gus*) (siehe 3.2.1) in *A. tumefaciens* EHA101. Die transgenen Pflanzen zeigten dasselbe Expressionsmuster wie die zuvor beschriebenen, mit dem binären Vektor pBAR im *Agrobacterium* GV3101 erzeugten transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (3.2.3.1). Dies zeigt, dass mit den erzeugten virulenten Agrobakterienstämmen intakte Promotor-Reporter-Kassetten in Pflanzen übertragen werden. Die *A. tumefa-*

ciens-Stämme mit den Reporter-Gen-Konstrukten 0,7-kb- und 3,7-kb-Promotor-*Gus*-Intron (3.2.1) wurden zur Transformation von *Hordeum vulgare* eingesetzt.

Transformation von *Hordeum vulgare*. Die Transformation erfolgte wie in 2.13 beschrieben. Für das Reporter-Gen 0,7-kb-Promotor-*Gus* wurden 1772 Embryonenhälften, für das 3,7-kb-Promotor-*Gus*-Konstrukt 1671 Embryonenhälften in 20 bzw. 21 Versuchen mit Agrobakterien infiziert. Es wurden 101 bzw. 81 transgene Kalli erhalten (s. Tab. 2).

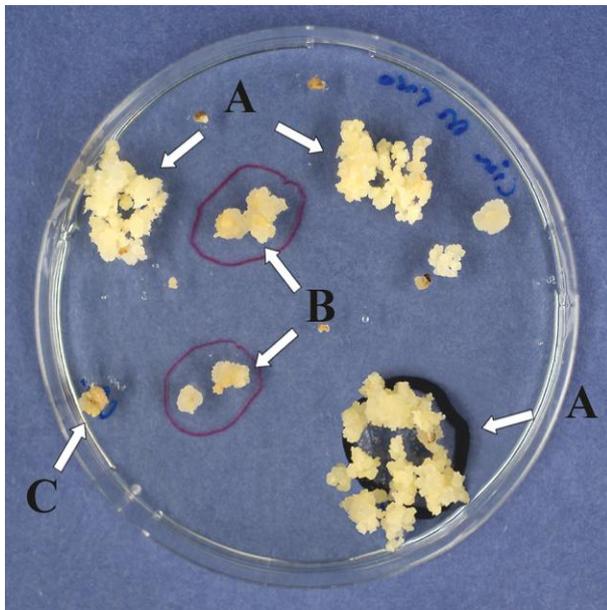


Abbildung 18. Wachstum transgener Kalli auf Selektionsmedium. Transgene Kalli (A) proliferieren, während nicht-transformiertes Gewebe im Wachstum stagniert (B) oder abstirbt (C).

Legende zu Abbildung 19: Erzeugung transgener Gerstenpflanzen. Entwicklungsstadium der Gerstenähre bei der Entnahme der Samen (A). Isolierte, von Spelzen befreite Samen (B). Isolierte, halbierte Embryonen nach der Inkubation mit Agrobakterien (C nach 0 Tagen, D nach 7 Tagen). Kallus mit somatischen Embryonen (Pfeile) (E). Unter Selektion ausdifferenzierende transgene Gerstenpflanzen (F). Bewurzelung der Gerste (G). Segregationsanalyse in der F1-Generation: Nachkommen einer transgenen Pflanze (H) und einer Kontrollpflanze (I). Test auf Basta-Resistenz durch Besprühen von Blättern (J, K), Beispiel der Applikation an einem Blatt einer Kontrollpflanze (J) und Vergleich resistenter Pflanzen (2, 3, 4) und nicht resistenter Pflanzen (1) (K).

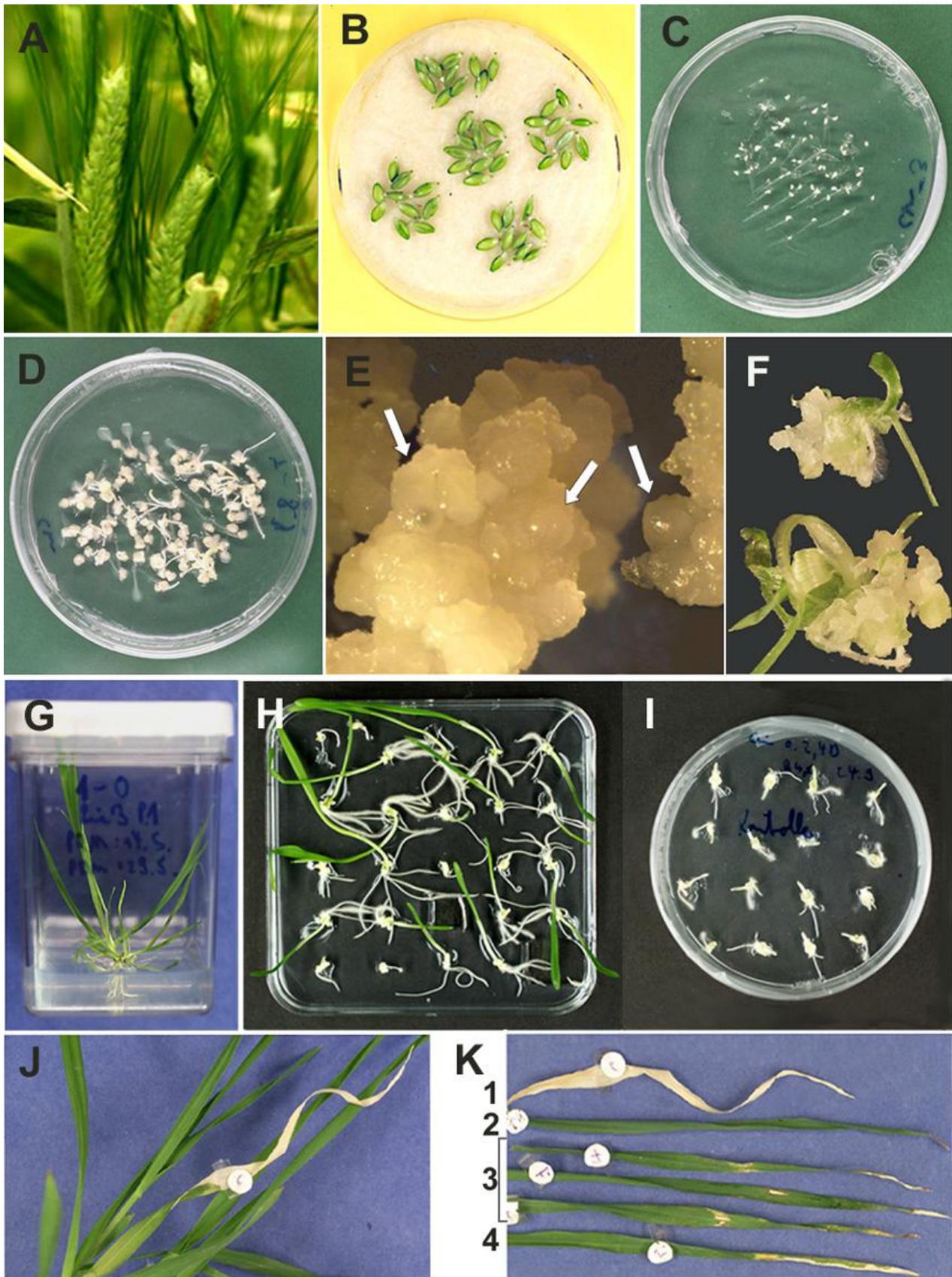


Abbildung 19. Erzeugung transgener Gerstenpflanzen

Tabelle 2: Gewebekultur und Basta-Resistenz-Test

*) 1-12: Tage der ausgeführten Versuche

0,7-kb-Promotor Versuch, Nr.	Anzahl der Embryonen- hälften	Anzahl der resistenten Linien	Transforma- tionsrate, %	Regenera- tionsrate, %	Anzahl der resistenten Pflanzen-Linien
1 ₁ *)	84	7	8,3	57	4
2 ₁	112	11	9,8	9,1	1
8 ₂	96	12	12,5	25	3
9 ₂	87	13	14,9	23,1	3
12 ₃	112	2	1,8	100	2
13 ₃	88	0	0	0	0
16 ₄	81	8	9,9	25	2
17 ₄	80	5	6,3	40	2
18 ₅	92	8	8,7	25	2
19 ₅	76	0	0		0
23 ₆	32	1	3,1	100	1
25 ₇	103	1	1	100	1
26 ₇	97	4	4,1	25	1
29 ₈	77	0	0		0
31 ₉	97	6	6,3	33,3	2
32 ₉	107	5	4,7	20	1
35 ₁₀	94	2	2,1	50	1
38 ₁₁	97	8	8,2	12,5	1
39 ₁₁	89	8	9	25	2
41 ₁₂	71	0	0		0
Summe/Mittelwert	1772	101	5,5	40	29

3,7-kb-Promotor Versuch, Nr.	Anzahl der Embryonen- hälften	Anzahl der resistenten Linien	Transforma- tionsrate, %	Regenera- tionsrate, %	Anzahl der resistenten Pflanzen-Linien
3 ₁	112	12	10,7	66,7	8
4 ₁	104	5	4,8	80	4
5 ₁	82	16	19,5	37,5	6
6 ₂	85	4	4,7	25	1
7 ₂	69	8	11,6	25	2
10 ₃	118	5	4,2	60	3
11 ₃	85	0	0		0
14 ₄	82	5	6,1	20	1
15 ₄	79	1	1,3	100	1
20 ₅	78	7	9	42,9	3
21 ₆	14	0	0		0
22 ₆	26	0	0		0
24 ₇	92	1	1,1	100	1
27 ₈	78	3	3,8	66,7	1
28 ₈	62	0	0		0
30 ₉	79	0	0		0
33 ₁₀	83	2	2,4	50,0	1
34 ₁₀	109	6	5,5	33,3	2
36 ₁₁	89	0	0		0
37 ₁₁	74	6	8,1	16,7	1
40 ₁₂	71	0	0		0
Summe/Mittelwert	1671	81	4,4	52	35
Insgesamt	Summe 3443	Summe 182	Mittelwert 5	Mittelwert 46	Summe 64

Als transgen wurden Kalli eingestuft, die auf Selektionsmedium starkes Wachstum zeigten (Verdoppelung der Zellmasse in ca. 10 Tagen), keinerlei Verbräunung aufwiesen, körnige Struktur und somatische Embryonen ausbildeten (Abb. 18). Die Transformationsrate (Anzahl transgener Kalli-Linien/Anzahl eingesetzter Embryonenhälften) variierte in den Versuchen zwischen 0 und 19,5 % (Tab. 2). Die Durchschnittsraten sind mit 5,5 % für das 0,7-kb-Konstrukt und 4,4 % für das 3,7-kb-Konstrukt ähnlich; insgesamt ergab sich eine Durchschnittsrate von 5 %.

Die Regenerationsrate gibt den Anteil der Kalli an, aus denen bewurzelte Pflanzen gewonnen werden konnten, die im Blatt-Resistenz-Test (2.13.3, Abb. 19 J, K) durch Basta nicht wesentlich

geschädigt wurden. Die Regenerationsrate (Anzahl Basta-resistenter Pflanzen-Linien/Anzahl transgener Kalli-Linien) lag für das 0,7-kb-Promotorkonstrukt bei 40 %, und für das 3,7-kb-Konstrukt bei 52 %.

Nach dem Basta-Resistenz-Test erfolgte eine Untersuchung der resistenten Pflanzen auf DNA-Ebene. Von den insgesamt ca. 90 regenerierten Basta-resistenten Pflanzen wurden 31 Transformanten des 0,7-kb-Promotorkonstrukts und 29 Pflanzen des 3,7-kb-Promotorkonstrukts einer PCR-Analyse unterzogen (Tab. 3).

Tabelle 3: Analyse Basta-positiver Pflanzen

Promotor- konstrukt	Anzahl der durchgeführten Analysen					
	PCRs insgesamt	<i>Gus</i> -negative Ereignisse	Plasmid- Rückgrat- Ereignisse	Pflanzen für weitere Untersu- chungen	Segregations- test & Histochemische Analyse	Southern- Analyse
0,7 kb	31	3	7	21	8	2
3,7 kb	29	2	2	25	8	2

Mit den verwendeten Primern wurde die Anwesenheit des Promotor-*Gus*-Bereiches (Primerpaar *Gus*-r, 2.2, Abb. 20 B) und des Plasmid-Rückgrats in Form eines Fragments des Tetracyclin-resistenzgens (Tet-Fragment, Bevan et al., 1992) (Primerpaar TetA, 2.2, Abb. 20 A) abgefragt. Nur bei Pflanzen, die das Promotor-*Gus*-Genfragment, nicht aber das Tet-Fragment enthalten, ist sicher, dass eine intakte, nicht rearrangierte T-DNA transferiert wurde. Grund für das Vorliegen des Vektor-Rückgrats kann sein, dass der Ableseprozess nicht in der LB der T-DNA abgebrochen wurde oder dass eingesetzte Agrobakterien sich in der Pflanze etabliert haben. Im Falle des 0,7-kb-Promotorkonstrukts wurde für 21 Pflanzen die Anwesenheit des *Gus*-Promotorfragments und gleichzeitiges Fehlen des Tet-Fragments nachgewiesen, für das 3,7-kb-Promotorkonstrukt wurde dies für 25 der analysierten Pflanzen gezeigt. Je 2 dieser Pflanzen wurden mittels Southernanalyse charakterisiert (Abb. 21) und je 8 wurden einer Segregationsanalyse (Tab. 4) unterzogen.

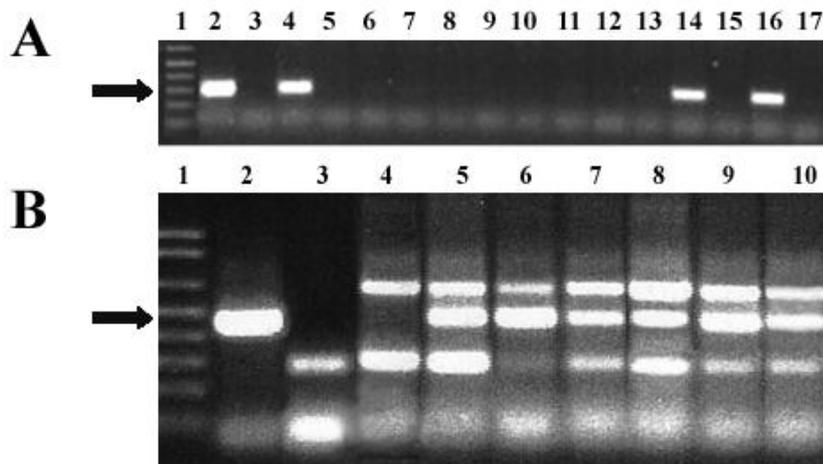


Abbildung 20. PCR-Analyse von Gerste. Analyse von 14 Transformanten (Spur 4-17). Mit der PCR wurde das TetA-Fragment (320 bp Fragment, Pfeil) des Plasmid-Rückgrats nachgewiesen (**A**) oder der Transfer des *Gus*-Reportergens (450 bp-Fragment, der Pfeil bezeichnet die indikative Bande) (**B**). Pflanzen, die das TetA-Fragment enthalten oder das *Gus*-Reportergen nicht enthalten, wurden nicht weiter analysiert. **A, B** Spur 1: 1kb+-Leiter, Spur 2: positive Kontrolle, Spur 3: negative Kontrolle; **B** Spur 4: WT-Gerste.

Die Southernanalyse bestätigte die Integration des Promotor-*Gus*-Genbereiches. Eine eindeutige Aussage über die Anzahl integrierter T-DNA-Kopien war nicht möglich, da die hierfür nachzuweisenden Banden in der Southernanalyse im hochmolekularen Bereich zu erwarten sind (größer 12 kb) und in diesem Bereich nur unklare Signale auftraten.

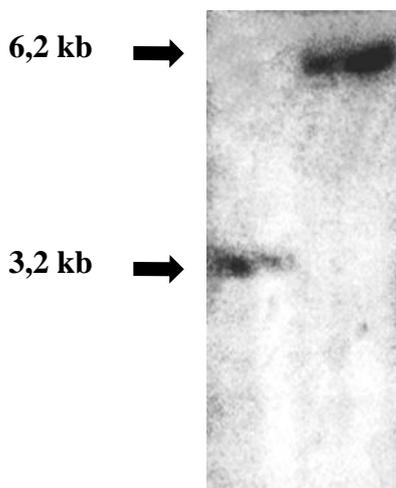


Abbildung 21. Southern-Analyse der DNA aus den transgenen Pflanzen. Die Bande 3,2 kb entspricht dem 0,7-kb-*Gus*-Promotorkonstrukt; die Bande 6,2 kb entspricht dem 3,7-kb-*Gus*-Promotorkonstrukt

Die Segregationsanalyse wurde mit je 25 - 35 Samen durchgeführt. Die Samenruhe wurde gebrochen (2.13.4) und die Keimung erfolgte auf Medium mit Bialaphos (Abb. 19 H, I).

Die Hälfte dieser Pflanzen zeigte in der durch Selbstung erzeugten Nachkommenschaft (T_1) eine Segregation von 3:1 (Resistente Pflanzen : nicht resistente Pflanzen, Tab. 4). Dies wird bei Transfer einer Kopie der T-DNA erwartet. Ein entsprechendes Segregationsverhältnis tritt auch bei Transfer mehrerer Kopien an einen Integrationsort auf.

Tabelle 4: Segregationsverhältnis der T_1 -Generation

Anzahl der Pflanzen	8	2	2	1	1	1	1
T1-Segregation: resistente/ nicht resistente	3:1	2:1	5:1	6:1	9:1	14:1	23:1

Zwei Pflanzen hatten in der Nachkommenschaft ein Verhältnis von resistenten zu susceptible Pflanzen von 2 : 1. Dieses Verhältnis kann durch einen statistischen Fehler erklärt werden, der bei der kleinen Zahl der untersuchten Pflanzen auftreten kann, durch den Ausfall der homozygoten Pflanzen (Lethalität durch Integration des Transgens in ein essenzielles Gen) oder dadurch, dass in den Pflanzen teilweise ein „Silencing“ des Transgens erfolgte. Alle anderen Pflanzen wiesen relativ zu viele resistente Nachkommen auf. Diese ungewöhnlichen Spaltungsverhältnisse (5 : 1 bis 23 : 1) sind durch unabhängige Integration von T-DNA-Kopien an nicht gekoppelte Orte zu erklären. Für weitere Untersuchungen sind nur die Pflanzen mit der für Einzelkopie-Integration erwarteten 3 : 1-Spaltung brauchbar. Im Versuch macht dieses 50 % der getesteten transgenen Gerstenpflanzen aus.

Histologische Analyse der Keimlinge. Die heterologe Expression des *Igl*-Promotors in *Arabidopsis* hat ein distinktes Expressionsmuster in den Keimblättern und Tragblättern gezeigt. Es sollte geklärt werden, ob dieses Expressionsmuster durch Interaktionen genereller Regulationselemente von Pflanzen vermittelt wird. Dann wäre auch in Gerste ein solches distinktes Expressionsmuster zu erwarten. Um dies zu bestimmen wurden die transgenen Gerstenpflanzen histologisch auf die Expression des *Gus*-Gens untersucht. Die Keimlinge der T_1 -Generation wurden nach Erreichen des 2-Blatt-Stadiums (ca. 2 Wochen alt) am Stengelgrund abgeschnitten und mit der X-Gluc-Lösung inkubiert. Dieses Stadium der Gerste entspricht den 4 Wochen alten,

für histologische Untersuchung eingesetzten *Arabidopsis*-Pflanzen (Abb. 10 und 11: 2-Blatt und 6-Blatt-Stadien). Es konnte keine *Gus*-Aktivität nachgewiesen werden. Die verwendeten Sequenzen des *Igl*-Promotors werden in Gerste nicht in vergleichbarer Weise wie in *Arabidopsis*-Pflanzen als regulierende Elemente erkannt.

In Gerste werden durch Jasmonat Wundreaktionen induziert (Wasternack und Parthier, 1997; Creelman und Mullet, 1997). Wie bereits erwähnt (s. 3.2.3) kann spekuliert werden, dass beide Substanzen gemeinsame Elemente in der Signaltransduktionskaskade besitzen. Daher wurden die transformierten Gerstenpflanzen (T_1 -Generation) mit Volicitin und Jasmonat inkubiert. Besitzen die transgenen Promotor-*Gus*-Gen-Konstrukte *cis*-Elemente dieses Signaltransduktionsweges, an die sich entsprechende Transfaktoren der Gerste binden, sollte dies zu *Gus*-Gen-Aktivität durch die Reporter-gen-Konstrukte führen. In Mais ist verlässlich eine Induktion erst möglich, wenn die Pflanzen zwei voll entfaltete Blätter besitzen. Die Gerste-Keimlinge der T_1 -Generation (16 Pflanzen von je 8 Transformanten je Reporter-gen-Konstrukt), die eine Größe von 3 cm erreicht hatten, wurden daher in Töpfe mit Erde überführt. Nach der Ausbildung der ersten zwei Blätter wurden die Keimlinge am Stengelgrund abgeschnitten. Ein Teil von ihnen wurde 3 h bzw. 24 h in Puffer (Kontrolle) inkubiert, der Rest in 1,2 µg/ml Volicitin-Lösung bzw. in 100 µM (-)-Jasmonsäure. In einem zweiten Versuch wurden die Blätter bei ca. 5 - 6 Wochen alten Pflanzen in Stücke geschnitten, in einer Wasserkontrolle bzw. in 100 µM (-)-Jasmonsäure 1 bzw. 2 Tage inkubiert. Dies entspricht dem Versuchsablauf bei der Induktion von „Early light inducible protein“ durch Jasmonat in Gerste (Wierstra und Kloppstech, 2000). Danach wurden die Keimlinge in X-Gluc-Lösung inkubiert (s. 2.9) und ausgewertet. Weder bei den induzierten noch bei den nicht induzierten Keimlingen konnte die GUS-Aktivität nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung von Promotorelementen des *Igl*-Gens ist nach diesen Ergebnissen ein heterologes Pflanzensystem nicht möglich. Die erstellten Promotorkonstrukte wurden in Agrobakterien transformiert, die einen Gentransfer in Mais zulassen. Damit ist die Voraussetzung für die notwendige Analyse im homologen System geschaffen.

4. Diskussion

4.1 Bestimmung und Untersuchung von Sequenzmotiven im *Igl*-Promotor *in vitro*

Die Regulation der Genexpression findet zum großen Teil auf der Transkriptionsebene statt (Calkhoven und Ab, 1996). Nach der klassischen Vorstellung, befinden sich die regulierenden Promotorelemente stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Guarente, 1988). Basale Promotorelemente finden sich meist innerhalb der ersten 300 bp upstream vom Transkriptionsstart, weitere *cis*-Elemente können in größerer Entfernung lokalisiert sein (Hong et al., 2000; Ohtsubo et al., 1999; Twell et al., 1991). Der Regulation der Transkription liegt die Bindung regulierender Proteine an diese Elemente zugrunde. Bindung von Protein an DNA ändert deren Laufverhalten bei nativer Gelelektrophorese und kann dadurch nachgewiesen werden. Darauf beruht die EMSA-Technik, mit deren Hilfe der Sequenzbereich von -510 bp bis +10 bp des *Igl*-Promotors auf das Vorkommen von Sequenzelementen untersucht wurde. Diese Methode wurde bereits für andere elicitierbare Systeme erfolgreich eingesetzt (Grimmig und Matern, 1997; Dunn et al., 1998; Sturaro und Viotti, 2001; Yang et al., 1998). Es wurde vermutet, dass die Volicitin-Elicitierung eine Änderung der Bindung von Transfaktoren an *cis*-Elemente zur Folge hat. Diese könnten mit diesem Verfahren definiert werden. Entgegen dieser Annahme ergab sich keine für die Elicitierung spezifische DNA-Protein-Interaktion. Dieses Ergebnis könnte darin begründet sein, dass nur ein limitierter DNA-Bereich untersucht wurde. Sequenzmotive, die eine definierte Genexpression vermitteln, wurden z. B. im Glutaminsynthetase-Gen von Sojabohnen *Glycine max* L. noch bis zu 3,4 kb vom Transkriptionsstart entfernt gefunden (Reisdorf-Cren et al., 2002). In der Literatur sind auch Fälle beschrieben, in denen sich die regulierenden Elemente im Intron (Norris et al., 1993; Maas et al., 1991), in der nicht translatierten „Leader“-Region, in der 3'-untranslatierten Region (Larkin et al., 1994) oder im codierenden Bereich (Dietrich et al., 1992; Douglas et al., 1991; Yang et al., 1998) befinden können. Das Design der eingesetzten Sonden gewährleistet, dass Motive bis zu 20 bp Umfang intakt zur Bindung angeboten werden. Komplexere Sequenzmotive werden dagegen unter Umständen zerstückelt und können nicht erkannt werden. Die meisten bisher charakterisierten pflanzlichen Transkriptionsfaktor-Bindemotive umfassen eine „Core“-Sequenz von vier bis sechs Basenpaaren und sind in eine Matrix von weniger als 20 Basenpaaren eingebunden (MatInspector Bibliothek, Version 2.2, Quandt et al., 1995). Ein Gegenbeispiel bildet das ORCA-Motiv, die Bindung des Transkriptionsfaktors erfolgt an eine 48-bp-Sequenz. Eine EMSA-Analyse, die einen weiten Sequenzbereich umfasst

und systematisch auch größere Sequenzeinheiten abfragt, ist äußerst aufwendig. Daher muss eine weitere Analyse in dieser Technik durch eine Eingrenzung des zu untersuchenden Sequenzbereiches, etwa durch Reporter-gen-Untersuchungen, vorbereitet werden.

Für verschiedene eingesetzte Sonden, z. B. für das ACS4-Motiv (Abb. 2), ergab sich eine sehr sequenzspezifische Proteininteraktion. Dies könnte darauf hindeuten, dass hier Transfaktoren der *Igl*-Gen-Regulation gebunden sind. Die Konstanz der Interaktion im Kontrollmaterial und in den induzierten Pflanzen könnte darauf beruhen, dass zum falschen Zeitpunkt analysiert wurde. Die *Igl*-Transkriptmenge steigt innerhalb der ersten Stunde der Elicitierung an und erreicht ihren Höhepunkt nach zwei Stunden (Frey et al., 2000). Zum Zeitpunkt der Isolierung der Kernproteine, 45 - 60 Minuten nach Elicitierung, sollten die Kernproteine den induzierten Zustand widerspiegeln. Es könnte aber sein, dass dieser Zustand nicht die Bindung der Kernproteine an die DNA beeinflusst, wohl aber die Effizienz des Transkriptionskomplexes. Dies wäre möglich durch Modifikation, z. B. die Phosphorylierung eines bereits gebundenen Transkriptionsfaktors. Alternativ könnte die gefundene spezifische Bindung auch einen Artefakt des *in vitro*-Systems darstellen, das *in vivo* nicht vorliegende DNA- und Protein-Mengen kombiniert. Für die *in vivo*-DNA-Protein-Interaktionen ist die Chromatinstruktur von großer Bedeutung (Lewin, 1994; Singh, 1998). Mutationen (Lusser, 2002; Li et al., 2002) konnten mit Defekten im System der Histon-Modifikation in Zusammenhang gebracht werden und unterstreichen die Bedeutung einer „globalen“ Regulation für die Genexpression. Diese über das Chromatin vermittelte Regulations-ebene wird im *in vitro*-Ansatz nicht gegeben, und dies könnte für das Fehlen einer spezifisch Volicitin-vermittelten DNA-Protein-Bindung in der EMSA-Analyse verantwortlich sein. Aufschluss über *cis*-Elemente könnte durch *in vivo*-footprinting erhalten werden (Busk et al., 1997).

4.2 Transiente Systeme

Transiente Systeme haben sich als wertvolles Instrument zur Bestimmung von Promotorelementen erwiesen. Dazu gehören das „Particle Bombardment“ von Gewebe und Zellkultur (Escarra et al., 2000; Shirasu et al., 1999) und die Protoplast-Transformation (Abel und Theologis, 1994; Hattori et al., 1992). Voraussetzung für den Einsatz dieser Systeme ist, dass sie in Bezug auf die Expression des zu untersuchenden Gens den Zustand der intakten Pflanze widerspiegeln. Dies war für das *Igl*-Gen nicht der Fall, in keinem der untersuchten Systeme konnte die Transkription von *Igl* durch Volicitin-Applikation induziert werden.

Mesophyll-Protoplasten von Mais und *Arabidopsis* bilden ein System, das den physiologischen Zustand des Ausgangsgewebes soweit erhalten hat, dass die Reaktion auf Hormone, Licht, Zucker, oxidativen Stress und Flagellin der intakten Pflanze wiedergegeben wird (zusammengefasst in Sheen, 2001). Die fehlende Induzierbarkeit durch Volicitin könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine intakte Zellwand für die Elicitierung notwendig ist. Es ist auch möglich, dass die durch die Protoplastenherstellung vorgenommene Verwundung selbst ein so starkes „Wundsignal“ darstellt, dass eine Elicitierung durch Volicitin nicht mehr möglich ist. Der Einsatz von Zellkulturen vermeidet eine Verwundung des Gewebes und das eingesetzte Material hat eine intakte Zellwand. Gegenüber Protoplasten hat Zellkulturmaterial aber entscheidende Nachteile: Die notwendigen Passagen der Zellen unter heterotrophen Wachstumsbedingungen führen dazu, dass das Material physiologisch und meist auch genetisch nicht mehr mit dem Ausgangsgewebe übereinstimmt. Das Ausbleiben der *Igl*-Induktion durch Volicitin kann auf diese Degeneration zurückzuführen sein. Eine wichtige Rolle könnte hier spielen, dass die *Igl*-Induktion lichtabhängig ist (Frey, unveröffentlicht), die Zellen der Zellkultur aber keine differenzierten Chloroplasten haben. Wird das notwendige Signal „Licht“ über die Chloroplasten aufgenommen oder weitergeleitet, fehlt dieses im Zellkultursystem.

Das „Particle Bombardment“ von Pflanzengewebe stellt ein transientes Expressionssystem dar, das die Untersuchung der Genexpression unter weitgehend natürlichen Bedingungen erlaubt. Diese Methode wurde für Studien pflanzlicher Promotoren verwendet (Baum et al., 1997; Tuerk und Fromm, 1994). Für *Igl* war jedoch in Kontrollexperimenten mit dem Behandlungsablauf eines „Particle Bombardments“ eine Steigerung der Transkriptmenge nach Volicitingabe nicht nachweisbar. Der kritische Schritt könnte hier sein, dass vor dem Beschießen ein Beschneiden der Blätter erfolgen muss. Dadurch könnte ein „Wundsignal“ ausgelöst werden, das die Volicitin-Induktion überlagern könnte. Ein Behandlungsschema, das die Verwundung vor dem Particle-Beschuss vermeidet, sollte deshalb erarbeitet werden. Der Beschuss selbst stellt allerdings ebenfalls eine Verwundung dar, die mit der Elicitierung interferieren könnte.

4.3 Reporterexpression in *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana wird als Modell-System für genetische Untersuchungen benutzt und lässt sich relativ leicht transformieren (Clought und Bent, 1998; Springer, 2000). So wurde *Arabidopsis thaliana* als heterologes System für die *Igl*-Genexpression eingesetzt. Wenn in die Regulation des *Igl*-Gens generelle pflanzliche *cis*- und *trans*-Faktoren einbezogen sind, die

sowohl in Mais (Monokot) als auch in *Arabidopsis* (Dicot) vorkommen, wären diese im heterologen System identifizierbar.

In der Tat zeigen die *Igl*-Promotorkonstrukte eine spezifische Interpretation der Mais-Gensequenzen durch die *Arabidopsis*-Pflanze (Abb. 10, Tab. 5, 6).

Tabelle 5: Vergleich des Expressionsmusters verschiedener Konstrukte in jungen Pflanzen

Promotor-konstrukt	ACS4-Motiv	(TA) ₃₇ T-Sequenz	Expressionsort	
			13 Tage alte Keimlinge	6-Blatt-Stadium-Keimlinge
0,36 kb	-	-	Keine Expression	Keine Expression
0,5 kb	+	-	Expression ist auf wenige Zellen beschränkt, nicht immer vorhanden	Expression ist auf wenige Zellen beschränkt, nicht immer vorhanden
0,7 kb	+	+	Definierte distale Färbung	Definierte distale Färbung
3,7 kb	+	+	Definierte distale Färbung, Hypokotyl	Definierte distale Färbung, Färbung der Wurzelbasis bei manchen Pflanzen
5,3 kb	+	+	Definierte distale Färbung, Hypokotyl und Petiolen	Definierte distale Färbung, Hypokotyl und Petiolen, schwache Färbung der Wurzelbasis bei manchen Pflanzen
DR5			Definierte distale Färbung und an der Wurzelspitze	Diffuse distale Färbung und an der Wurzelspitze

Auffallend ist die distinkte Expression in punktförmigen Bereichen am Blattrand. Diese Bereiche sind charakterisiert durch das Zusammentreffen von Leitbündeln, hier kommt es zur Ausbildung der sogenannten Hydathoden. Die Hydathoden funktionieren als Wasserporen. Über die gebildeten Guttationströpfchen können Bakterien in den Hydathoden-Raum eindringen, in das Vaskulärsystem gelangen und sich von hier aus schnell in der ganzen Pflanze ausbreiten. Bei *Arabidopsis* sind zwei Gene beschrieben, die, ebenfalls durch Reporter-gen-Konstrukte analysiert, eine vergleichbare Expression im Bereich der Hydathoden aufweisen: Es sind dies *CYP79A2* (Bægebo, 2002) und *AKTI* (Legarde et al, 1996). *CYP79A2* katalysiert die Bildung des Aldoxims in der Biosynthese von Benzylglucosinolaten in *A. thaliana*. Seine Expression im Hydathodenbereich könnte in Verbindung mit der Abwehr von pathogenen Bakterien durch die Biosynthese von Glucosinolaten stehen.

Tabelle 6: Vergleich des Expressionsmusters der Konstrukte in verschiedenen Organen

Konstrukt	Expressionsort					
	0,36 kb	0,5 kb	0,7 kb	3,7 kb	5,3 kb	DR5
Keimblatt & Blatt	keine	schwache distale punktförmige, nicht bei allen Pflanzen	definierte distale punktförmige	definierte distale punktförmige	definierte distale punktförmige, evtl. schwache Färbung der Blattoberfläche	definierte punktförmige distale, diffuse in späterem Stadium
Hypokotyl	keine	keine	selten	manchmal	oft	keine
Tragblatt	keine	keine	punktförmige definierte, bei manchen Pflanzen	manchmal	manchmal	selten
Wurzel	keine	keine	keine	manchmal	manchmal	definierte, bei der Wurzelspitze
Blüte	keine	keine	definierte, bei manchen Pflanzen, in Stigmata	definierte, bei manchen Pflanzen, in Stigmata	definierte, bei manchen Pflanzen, in Stigmata	definierte, bei manchen Pflanzen, in Stamen

Das *AKT1*-Gen kodiert für K^+ -Influx-Kanal in *Arabidopsis* und vermittelt den Zellturgor. Weiterhin weist das DR5-Reporterkonstrukt (Sabatini et al., 1999), das über die Expression des *Gus*-Gens die Anwesenheit von Auxin nachweist, im Blatt eine ähnliche Expression auf. Über ein Transposon-Tagging wurde ein weiteres Gen mit vergleichbarer Blattexpression identifiziert, das aber bisher nicht isoliert wurde (Tsukaya und Uchimiya, 1997). Der Hydathodenbereich stellt also einen Blattbereich dar, in dem Gene unterschiedlicher Funktion gezielt exprimiert werden. Ein Sequenzelement, das die Expression in diesem Bereich vermittelt, sollte im *Igl*-Promotor vorhanden sein. Ein Kandidat hierfür ist das ACS4-Motiv: Die distinkte Expression im Hydathodenbereich wird mit dem 0,5-kb-Promotorkonstrukt und allen größeren Promotorbereichen beobachtet. Sie ist nicht mehr nachweisbar, wenn das Motiv wie im 0,36-kb-Konstrukt fehlt (Tab. 5, 6). Im 5'-upstream-Bereich von *CYP79A2*, *AKT1* kann eine Variation des ACS4-Motivs gefunden werden (Tab. 7). 12 von 26 bp des Motivs sind konserviert, dieses Motiv wird in den *Arabidopsis*-Genen in vergleichbarem Abstand zum Startcodon und je auf dem (-)-Strang der DNA gefunden. Ob dieses Motiv eine Signifikanz für die Expression in *Arabidopsis* hat, müsste durch Minimal-Promotor-Fusionen mit diesem Sequenzmotiv überprüft werden.

Das Gewebe der Volicitin-induzierten Expression von *Igl* in Mais konnte bisher nicht durch *insitu*-Analysen bestimmt werden. Die exprimierenden Bereiche wurden aber durch Quantifizierung der spezifischen RNA in unterschiedlichen Blattbereichen grob bestimmt (Frey et al., 2000 und unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Untersuchungen lokalisieren die Expression in den oberen und mittleren Teil des Blattes. Die proximalen Bereiche der Mittelspreite weisen eine höhere Expression auf als die Blattrandbereiche. Es ergibt sich damit kein Anhaltspunkt für eine Übereinstimmung des Expressionsortes in *Arabidopsis* und dem in Mais.

Tabelle 7: Übereinstimmendes Sequenzmotiv der Gene mit Hydathoden-spezifischer Expression in *A. thaliana*. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Clustal W (Thompson et al., 1994)

Motiv	Organismus	Startcodon (bzg. Position)	Strang	Sequenz
ACS4	<i>Z. mays</i>	- 237bp	+	ATA GGA TAA GAT AGG AAT AGG ATA GA
ACS4	<i>A. thaliana</i>	- 795bp	-	ATA GGA TAA GAT AGA AAT AGG ATA GA
AKT1	<i>A. thaliana</i>	- 820bp	-	GAT GGA CAA GAA GTG AGT AAG ATA GA
CYP79A2	<i>A. thaliana</i>	- 560bp	-	CTT AGA CAA ATA TTG AAT AAA ATA GA
gemeinsame Sequenz				NWW RGA YAA RWW NKR ART ARR ATA GA

übereinstimmende Nukleotide: A/T-W; A/G-R; G/T-K; C/T-Y

Neben der Expression im Blatt vermitteln die Promotoren von *CYP79A2*, *AKT1* und das DR5-Konstrukt die Expression in weiteren Organen von *Arabidopsis*. Hier gibt es jedoch keine Übereinstimmung mit der Expression der *Igl*-Promotorkonstrukte, insbesondere erfolgt für diese Gene keine Expression in den Stigmata der Pistille, wie sie mit den *Igl*-Reporterkonstrukten gefunden wird.

Während im Vergleich von 0,36-kb-Konstrukt und 0,5-kb-Konstrukt ein qualitativer Unterschied in der *Gus*-Genexpression im Blatt gefunden wird, ändert sich die Expression im Blatt quantitativ beim Übergang zum nächst größeren Promotorbereich im 0,7-kb-Konstrukt. Im wesentlichen wird hier die (TA)₃₇T-Sequenz eingeführt. In der Literatur werden AT-reiche Bereiche als positiv (Sandhu et al., 1998; Lam et al., 1990; Tjaden und Coruzzi, 1994) oder negativ regulierende Elemente (Castresana et al., 1998; Nagano et al., 2001) oder als spezifische Bindestellen

für Transfaktoren (Reisdorf-Cren et al., 2002) beschrieben. Im Zusammenhang der *Igl*-Promotorsequenzen scheint diese Sequenz in *Arabidopsis* als Enhancer zu wirken.

Mit der Vergrößerung der untersuchten 5'-upstream-Bereiche geht insbesondere in den jungen Pflanzen eine Expression des Reportergens in weiteren Bereichen der Pflanze einher (Tab. 5, 6). Die Expression wird auf Hypokotyl, Blattspreite, Tragblatt und Wurzel ausgeweitet. Welche Sequenzelemente hierfür verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Es ergibt sich keine Übereinstimmung mit der Expression des Auxin-Reporterkonstrukts DR5, wie sie für die Expression im Hydathodenbereich gefunden wurde.

Die Ähnlichkeit des Expressionsmusters des 0,7-kb-Konstrukts und des DR5-Auxinreportergens und das Vorhandensein des Sequenzelementes ACS4, das in einem Auxin-induzierbaren Gen gefunden wird, führte zu der Hypothese, dass die Expression des Reportergens durch lokal vorhandenes endogenes Auxin hervorgerufen wird. Die Unterschiede der Expression von DR5 und 0,7-kb-Konstrukt in Wurzel und Blüte (Tab. 6) sprechen gegen diese Annahme. Exogene Zugabe von Auxin ändert die Genexpression im Blatt nicht signifikant, in den Wurzeln kommt es dagegen bei rund 30 % der Pflanzen zu einer Reporterexpression, die ohne Auxin-Gabe nicht gefunden wird. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Auxin zusätzlich zu anderen, eventuell gewebespezifischen Faktoren einen Einfluss auf die vom 0,7-kb-Konstrukt vermittelte Expression hat. Gabe des Auxin-Antagonisten hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Reporterexpression.

Faktoren, die bei Mais Einfluss auf die *Igl*-Transkription haben, wie Verwundung und Licht, ändern die Expression des 0,7-kb-Konstruktes nicht. Volicitin ist ein spezifischer Elicitor für die tritrophe Interaktion in Mais. Es ist daher nicht verwunderlich, dass seine Applikation keinen Einfluss auf das Reportergen in *Arabidopsis* hat. Es wird spekuliert, dass die Signaltransduktion in Mais von der Jasmonat-Signalkaskade abgeleitet wird (Turlings et al., 1999, Alborn et al., 2000). Konservierte Elemente des Signalwegs können in *Arabidopsis* und in Mais vorliegen und damit auch im heterologen System erkannt werden. Deshalb wurde zur Induktion auch Jasmonat eingesetzt. Da dies keinen Einfluss auf die Expression des Reportergens hatte, liegen in den Reporter-Konstrukten keine konservierten *cis*-Elemente des Jasmonatsignalwegs vor.

In *Arabidopsis* werden also Sequenzmotive eines Maisgens durch Transkriptionsfaktoren gewebespezifisch interpretiert. Nach allem, was bekannt ist, hat das dadurch im heterologen

System hervorgerufene Expressionsmuster keine Entsprechung in der Expression des *Igl*-Gens im homologen Maissystem. Welche Transkriptionsfaktoren von *Arabidopsis* gebunden werden, ist unbekannt.

4.4 Gerste *Hordeum vulgare* als heterologes Expressionssystem

Durch die Analyse der Reporter-gen-Konstrukte in Gerste sollten zwei Aspekte untersucht werden. Es sollte bestimmt werden, ob das im heterologen *Arabidopsis*-System gefundene distinkte Expressionsmuster Pflanzen generell vermittelt wird, also konservierte *cis*-Elemente in Gerste ähnlich von Transkriptionsfaktoren gebunden werden wie in *Arabidopsis*. Dies würde eine entsprechende *cis*-Element/*trans*-Faktor-Interaktion auch in Mais nahe legen. Da Gerste und Mais als Vertreter der Gramineen enger verwandt sind, wurde spekuliert, dass Elemente von Signaltransduktionskaskaden soweit konserviert sein könnten, dass Komponenten aus Mais - die Promotorelemente des *Igl*-Gens - in Gerste über Elemente der Jasmonatsignalkaskade erkannt werden könnten. Wie zuvor ausgeführt lag diesem Ansatz die Spekulation zugrunde, dass Volicitin-Induktion und Jasmonat-Signalkaskade eine Verbindung haben. In der Gerste führen zahlreiche Stressreaktionen zur endogenen Steigerung von Jasmonaten. Es wurden verschiedene externe Stimuli auf ihre Wirkung zur Erhöhung der Jasmonat-Synthese untersucht: Verwundung (Farmer und Ryan, 1992), UV-Licht (Conconi et al., 1996), Verbrennung, Elektrizität (Herde et al., 1996), Oligosaccharide (Doares et al., 1995) und osmotischer Stress (Lehmann et al., 1995). Die Bildung der Jasmonate führt zur Modifizierung der Expression von Zielgenen. Die Induktion kann auch durch exogene Gabe von Jasmonat erreicht werden. Verschiedene Jasmonat-ähnliche Substanzen, die aus dem Oktadekanoid-Stoffwechselweg abgeleitet werden, sind Auslöser spezifischer Genexpression (Stelmach et al., 1998; Parchmann et al., 1997). Daher könnte Volicitin wie andere Octadecanoide eine Elicitierung bewirken.

In Gerste wurde die Expression des 0,7-kb- und des 3,7-kb-Konstruktes analysiert. Im Gegensatz zu *Arabidopsis* konnte für beide Konstrukte keine gewebespezifische Expression festgestellt werden. Damit ist ausgeschlossen, dass „generelle“ *cis*-Elemente eines Pflanzenpromotors in *Arabidopsis* erkannt werden.

Für die Inkubation mit Volicitin und Jasmonat wurden Gerstenpflanzen verwendet, die im Entwicklungsstadium den zur Induktion eingesetzten Maispflanzen entsprachen. Sie wurden unter hohen Lichtgaben angezogen. Damit waren für die Induktion die Bedingungen eingehalten,

die sich bei Mais als notwendig für eine Elicitierung von *Igl* erwiesen hatten. Dennoch konnte mit keinem der Konstrukte eine Reporter-gen-Aktivität nach Gabe der Induktoren nachgewiesen werden. Jasmonat wurde exogen in einer Konzentration zugegeben, die bei Gerste zur Induktion der JIP Gene (z. B. JIP 60, Dunaeva et al., 1999) führte. Vorausgesetzt, das transformierte 3,7-kb-Konstrukt enthält alle notwendigen *cis*-Elemente des *Igl*-Promotors, kann das Ausbleiben der Aktivierung der Reporterkonstrukte bei Jasmonat-Applikation darauf zurückzuführen sein, dass diese Signalkaskade nicht in die Regulation von *Igl* eingebunden ist. Alternativ könnten die *cis*-Elemente oder *trans*-Faktoren dieses Signaltransduktionsweges zwischen Gerste und Mais nicht ausreichend konserviert sein. Bisher liegen nur für die Indolalkaloidbiosynthese in *Catharanthus roseus* mit den ORCA-Transkriptionsfaktoren und ihren Bindemotiven Informationen über die durch Octadecanoide regulierte Genexpression vor (Menke et al., 1999; van der Fits et al., 2001). Über die Konservierung der Elemente gibt es daher keine Daten.

Zur Bestimmung der *cis*-Elemente des *Igl*-Promotors haben sich die heterologen Systeme als untauglich erwiesen. Es bleibt die Aufgabe die Expression von Reporter-gen-Konstrukten in Mais zu etablieren.

4. 5 Transformation von *Hordeum vulgare*

Die Transformation von monokotylen Pflanzen stellt im Vergleich mit der von Dikotylen ein sehr anspruchsvolles System dar. Für Gerste wurde die Agroinfektion und T-DNA-Transfer (aber keine DNA-Integration in Genom) erstmals 1990 beschrieben (Creissen et al., 1990; Deng et al., 1990); Über die Transformation mittels „Particle Bombardment“ wurde im Jahre 1994 (Wan and Lemaux, 1994; Jähne et al., 1994) und über die Protoplasten-Transfektion im Jahre 1995 (Funatsuki et al., 1995) berichtet. Während zunächst die Transformation mit nackter DNA im Vordergrund stand, wurde erst seit 1987 für die Monokotyle *Asparagus officinalis* und *Dioscorea bulbifera* (Bytebier et al., 1987; Schafer et al., 1987) und für Gramineae (Reis, Raineri et al., 1990) die Trans-formation mit *Agrobacterium tumefaciens* entwickelt. Dieses Verfahren hat vor allem den Vorteil, dass im Vergleich zu den anderen Transferverfahren einfache, durch die „T-DNA-Border“ begrenzte Insertionsmuster entstehen. Es wird ein hoher Anteil von transgenen Pflanzen mit einer oder wenigen T-DNA-Insertionen erzeugt. Dadurch wird eine stabile Expression des Transgens vermittelt. Maßgebend für Erfolge in diesem Bereich der Transformation war die Entwicklung von Agrobakterien-Ti-Plasmid-Kombinationen, die einen Transfer in Monokotyle Pflanzen erlaubte. Die Transformation von *Hordeum vulgare* mit

Agrobakterien wurde 1997 von Tingay et al. berichtet. Sie wurde auch im Rahmen einer Dissertation von Ch. Schäfer durchgeführt (2003). Es handelt sich aber nicht um ein Routineverfahren. Bei der Erzeugung der transgenen Gerstenpflanzen mit den *Igl*-Promotorkonstrukten wurden Erkenntnisse über das Transformationssystem erhalten, die diskutiert werden sollen.

Zur Transformation wurde der supervirulente Agrobakterienstamm EHA101 verwendet. Dieser Stamm kann für ein binäres Vektorsystem verwendet werden. Die Transformation der Zellen erfolgt durch Elektroporation, was einfacher und effizienter ist als die „Triparental Mating“-Methode, die bei einem „superbinären“ System eingesetzt werden muss. Hier vermindert die notwendige homologe Rekombination, die eine Frequenz von ca. 10^{-5} hat, die Erfolgsrate. Die Effizienz des T-DNA-Transfers der Agrobakterienstämme LBA4404 und EHA101 ist ungefähr gleich. Der EHA101-Stamm bietet sich an, da das Ti-Helfer-Plasmid mit den zusätzlichen *Vir*-Genen über ein Resistenzgen selektionierbar ist (s. 2.4.1); diese Möglichkeit besteht beim Stamm LBA4404 nicht. Der Stamm EHA101 wurde bereits für die Mais-Transformation verwendet (Gould et al., 1990; Frame et al., 2002).

Bei der Kokultivierung der Embryonen war die Konzentration der eingesetzten Agrobakterien kritisch. Dass zu viele Agrobakterien die Transformationsrate vermindern, wurde auch von Zhao et al. (2002) diskutiert. Die optimale Konzentration für Mais-Hill-Linie betrug $0,5 \times 10^9$ c.f.u.ml⁻¹. Höhere Konzentration verursachte bei Mais die Übertragung von mehreren Kopien der T-DNA und eine niedrigere Transformationsrate. Eine Inkubationsdauer von 3 Tagen erwies sich als optimal. Für Gerste wurde die Kokultivierungsperiode auf 7 Tage verlängert.

Ein weiterer wichtiger Schritt für die erfolgreiche Transformation ist ein rechtzeitiges Aufteilen der nachwachsenden transgenen Kalli, da sonst der Selektionsdruck nicht ausreichend ist und nicht transformierte Zellen proliferieren können. Somatische Embryonen verlieren rasch ihre Regenerationskompetenz und müssen daher umgehend in Licht inkubiert werden. Rund die Hälfte der resistenten Kalli-Linien konnten zu Basta-resistenten Pflanzen-Linien regeneriert werden. Es wurde eine Gesamttransformationsrate von 5 % erreicht.

Auf DNA-Ebene wurden die Pflanzen mittels PCR analysiert. Ungefähr 1 % der PCR-getesteten Pflanzen enthielt kein *Gus*-Gen, obwohl das *Gus*-Gen an der „Right Border“ der T-DNA eingebaut wurde und der Gentransfer hier seinen Ausgang nimmt und mit dem Transfer der „Left

Border“ abgeschlossen wird (Becker et al., 1992). Vor der „Left Border“ wurde das Selektionsgen „BAR“ kloniert. Eine mögliche Erklärung ist, dass während des Transfers ein DNA-Rearrangement stattgefunden hat (Tinland, 1996; Rossi et al., 1996). Bei ca. 15 % der PCR-getesteten Basta-resistenten Primärtransformanten wurde das Plasmid-Rückgrat nachgewiesen. Dies kann ebenfalls durch Fehler und Rearrangement während des T-DNA-Transfers hervorgerufen werden. Die alternative Erklärung, das Etablieren Basta-resistenter Agrobakterien in der Pflanze scheint unwahrscheinlich, da die Resistenz in der Nachkommenschaft segregierte. In den Tabakpflanzen lassen sich Agrobakterien z. B. nach Einsatz zur Transformation nur im unteren Stengelbereich und in der Wurzel noch über Monate nachweisen, werden aber nicht über den Samen an die Nachkommen weitergegeben (Matzk et al., 1996).

Die Segregationsrate zeigte bei 50 % der Pflanzen die nach Mendel für ein hemizygoten Gen erwartete 3 : 1-Verteilung. Daneben gab es Segregationsverhältnisse von 2 : 1 bis 23 : 1. Solche Verhältnisse treten bei Übertragung von mehreren Genkopien auf, in späteren Generationen kommt es dann verstärkt zu „Silencing“-Effekten (Matzke und Matzke, 1998 a, b; Iyer et al., 2000).

Die ersten fünf Versuchs-Tage der Transformation lieferten die höchsten Transformationsraten. Es gibt anscheinend einen optimalen Zeitraum der Transformationskompetenz der Embryonen. Dies wurde auch von Schäfer (2003) beschrieben.

5. Zusammenfassung

Das *Igl*-Gen codiert die durch Volicitin induzierbare Indolglycerinphosphatlyase der tritrophen Interaktion bei Mais. Seine Transkriptmenge wird durch Inkubation mit dem Elicitor innerhalb von 1 - 2 Stunden rund 50-fach erhöht. Mit dieser Arbeit sollten Systeme für die Identifizierung und Charakterisierung der *cis*-Elemente der Transkriptionsregulation des *Igl*-Gens etabliert werden.

Die 5'-upstream-Region des *Igl*-Gens wurde mit dem „Elektrophoretic Mobility Shift Assay“ auf eine für den elicitierten Zustand spezifische DNA-Protein-Interaktion untersucht. In diesem *in vitro*-Ansatz ergab sich kein Hinweis auf eine durch Volicitin-Inkubation hervorgerufene veränderte DNA-Protein-Bindung. Eine Untersuchung von Reporter-gen-Konstrukten zur Definition von *cis*-Elementen war nicht möglich, da sowohl Mais-Mesophyll-Protoplasten als auch Zellkultur-Material keine *Igl*-Transkription nach Induktion zeigten. Auch der Versuchsablauf beim „Particle Bombardment“ ließ keine Elicitierung des Pflanzenmaterials durch Volicitin zu und stellt daher kein System für die transiente Expression zur Definition von *cis*-Elementen dar.

Es wurden Promotor-Reporter-gen-Konstrukte für die stabile Transformation von monokotylen und dikotylen Pflanzen über T-DNA-Transfer durch *Agrobacterium tumefaciens* erzeugt. Als Reporter-gen wurde das *Gus*-Gen verwendet, die Konstrukte umfassen 0,36 kb bis 5,3 kb der 5'-upstream-Sequenz des *Igl*-Gens. Mit diesen Konstrukten wurden transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* und *Hordeum vulgare* erzeugt und die Expression des Transgens untersucht.

Eine Analyse des *Igl*-Promotors durch stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* ergab, dass das 26 bp umfassende ACS4-Motiv, das im *Igl*-Gen von Mais und im Promotor der Auxin-induzierbaren ACC-Synthase 4 von *Arabidopsis thaliana* gefunden wird, im Blatt die Expression im Bereich der Hydathoden vermittelt. Die in Position -459 bp lokalisierte (TA)₃₇T-Sequenz scheint in *Arabidopsis* als Enhancer zu wirken. Die Expression der Promotor-Reporter-gen-Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* wird nicht durch Verwundung, Applikation von Jasmonat oder Volicitin oder Dunkelinkubation beeinflusst. Eine exogene Zugabe von Auxin änderte die

Genexpression im Blatt nicht signifikant, dagegen findet unter diesen Bedingungen eine Expression in der Wurzel statt.

In Gerste wurden die entsprechenden Reporter-gen-Konstrukte nicht exprimiert. Die *Igl*-Promotorsequenz enthält also Elemente, die speciesspezifisch in *Arabidopsis thaliana* eine distinkte Genexpression vermitteln, es handelt sich also nicht um generelle pflanzliche Regulationssequenzen. Ob diese Sequenzen auch in Mais eine funktionelle Bedeutung haben, bleibt zu zeigen.

Wie in *Arabidopsis thaliana*, haben Verwundung und Gabe von Volicitin und Jasmonat keinen Einfluss auf die Expression des Transgens in Gerste. Die Ergebnisse in den heterologen Pflanzensystemen zeigen, dass für eine aussagekräftige Promotoranalyse die erzeugten Konstrukte in Mais analysiert werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

- Abel S, Nguen MD, Chow W and Theologis A (1995) ACS4, a primary indolacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. J Biol. Chem. 279 (32): 19093-19099
- Abel S, Theologis A (1994) Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. Plant J Mar; 5(3):421-7
- Alborn HT, Jones TH, Stenhagen GS, Tumlinson JH (2000) Identification and synthesis of volicitin and related components from beet armyworm oral secretions. J Chem. Ecol. 26:203-220
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. Science 276:945-949
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. Sep 25(17):3389-402
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1993) Current Protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York
- Baum K, Groning B, Meier I (1997) Improved ballistic transient transformation conditions for tomato fruit allow identification of organ-specific contributions of I-box and G-box to the RBCS2 promoter activity. Plant J Aug; 12(2):463-9
- Bechthold N, Ellis J and Pelletier G (1993) *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316: 1194-1199
- Becker D, Kemper E, Schell J and Masterson R (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol. Biol. 20:1195-1197
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1992) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Biotechnology 24:367-370
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7:1513-1523
- Boland W, Hopke J, Donath J, Nüske J, Bublitz F (1995) Jasmonsäure und Coronatin-induzierte Duftproduktion in Pflanzen. Angew Chem. 107:1715-1717
- Bullock WO, Fernandez JM and Short JM (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques 5: 376-379
- Busk PK, Jensen AB and Pages M (1997) Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene rab 17 from maize. Plant J 11(6):1285-1295

- Bytebier B, Deboeck F, Greve HD, Van Montagu M, Hernalsteens JP (1987) T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5345-5349
- Calkhoven CF, Ab G (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. Biochem. J Jul 15; 317 (Pt 2):329-42 Review
- Castresana C, Garcia-Luque I, Alonso E, Malik VS, Cashmore AR (1988) Both positive and negative regulatory elements mediate expression of a photoregulated CAB gene from *Nicotiana plumbaginifolia*. EMBO J Jul; 7(7):1929-36
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263(5148):802-805
- Clough SJ and Ben AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16:735-743
- Conconi A, Smerdon MJ, Howe GA, Ryan CA (1996) The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. Nature Oct 31; 383(6603):826-9
- Cone KC, Burr FA and Burr B (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. Proc. Nat. Akad. Sci. USA 83:9631-9635
- Cone KC, Cocciolone SM, Burr FA, Burr B (1993) Maize anthocyanin regulatory gene p l is a duplicate of cl that functions in the plant. Plant Cell 5:1795-1805
- Creelman RA and Mullet JE (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:355-381
- Creissen G, Smith C, Franic R, Reynolds H and Mullineaux P (1990) *Agrobacterium*-and microprojectile-mediated viral DNA delivery into barley microspore-derived cultures. Plant Cell Rep. 8:680-683
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21
- Deng WY, Lin XY and Shao QQ (1990) *Agrobacterium tumefaciens* can transform *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* of Gramineae. Science in China (ser B) 33:27-34
- Dietrich RA, Radke SE, Harada JJ (1992) Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings. Plant Cell Nov; 4(11):1371-82
- Ditta G, Stenfield S, Corbin D and Helinski D (1980) Broad Host Range DNA Cloning System for Gram-negative Bacteria: Construction of a Gene Bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351

- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* May 9; 92(10):4095-8
- Douglas CJ, Hauffe KD, Ites-Morales ME, Ellard M, Paszkowski U, Hahlbrock K, Dangl JL (1991) Exonic sequences are required for elicitor and light activation of a plant defence gene, but promoter sequences are sufficient for tissue specific expression. *EMBO J* Jul; 10(7):1767-75
- Dunaeva M, Goebel C, Wasternack C, Parthier B, Goerschen E (1999) The jasmonate-induced 60 kDa protein of barley exhibits N-glycosidase activity *in vivo*. *FEBS Lett.* Jun 11; 452(3):263-6
- Dunn MA, White AJ, Vural S, Hughes MA (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.* Nov 1; 38(4):551-64
- Eisenreich W, Kupfer E, Weber W, Bacher A (1997) Tracer studies with crude U-13C-lipid mixtures. Biosynthesis of the lipase inhibitor lipstatin. *J Biol. Chem.* Jan 10; 272(2):867-74
- Escurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerström M and Rask L (2000) Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different *cis*-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J* 24(1):57-66
- Farmer EE, Ryan CA (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* Feb; 4(2):129-134
- Figurski DH and Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(4):1648-1652
- Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Zhang Z, Xiang C, Fonger TM, Pegg SEK, Li B, Nettleton DS, Pei D, Wang K (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol.* 129:13-22
- Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grün S, Winklmaier A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP, Simcox K, Gierl A (1997) Analysis of a chemical plant defence mechanism in grasses. *Science* Aug 1; 277(5326):696-9
- Frey M, Stettner C, Pare PW, Schmelz EA, Tumlinson JH and Gierl A (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *PNAS* 97(26):14801-14806
- Fritzsche Hoballah ME, Tamo C, Turlings TCJ (2002) Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*- Is quality or quantity important? *J Chem. Ecol.* 28:951-968
- Funatsuki H, Kuroda H, Kihara M, Lazzeri PA, Müller E, Lörz H and Kishinami I (1995) Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 91:707-712

- Gadgil H, Jarrett HW (2002) Oligonucleotide trapping method for purification of transcription factors. *J Chromatogr. A*. Aug 9; 966(1-2):99-110
- Gierl A, Frey M (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* Aug; 213(4):493-8
- Gouinguene S, Degen T, Turlings TT (2001) Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* 1:9-16
- Gould J, Devey M, Hasegava O, Ulian EC, Peterson G and Smith RH (1990) Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shot apex. *Plant Physiol.* 20:426-435
- Grimmig B, Matern U (1997) Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive *cis*-acting element. *Plant Mol. Biol.* Jan; 33(2):323-41
- Guarente L (1988) UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* Feb 12; 52(3):303-5 Review
- Hamilton RH (1964) A corn mutant deficient in 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one with an altered tolerance of atrazine. *Weeds* 12:27-30
- Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Microbiol.* 166 (4):557-580
- Hattori T, Vasil V, Rosenkranz L, Hannah LC, McCarty DR, Vasil IK (1992) The Viviparous-1 gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* Apr; 6(4):609-18
- He XZ, Dixon RA (2000) Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Plant Cell Sep*; 12(9):1689-702
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternack C, Willmitzer L, Pena-Cortes H (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* Oct; 112(2):853-860
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ and Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and *T*-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-181
- Hong SB, Sexton R, Tucker ML (2000) Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol.* Jul; 123(3): 869-81
- Hood EE, Helmer GL, Fraley RT and Chilton M-D (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol.* 168 (3):1291-1301

- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T and Kumashiro T (1995) High efficiency transformation of maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14:745-750
- Iyer LM, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC (2000) Transgene silencing in monocots. *Plant Mol. Biol. Jun*; 43(2-3):323-46 Review
- Jähne A, Becker D, Brettschneider R and Lörz H (1994) Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theor. Appl. Genet.* 89:525-533
- Jefferson RA (1997a) Assaying chimeric genes in plants: the *Gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MV (1987b) *Gus* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Jung W, Yu O, Lau SM, O'Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat. Biotechnol. Feb*; 18(2):208-12
- Kemper EL, Neto GC, Papes F, Moraes KC, Leite A, Arruda P (1999) The role of opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell Oct*; 11(10): 981-94
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N and Kumashiro T (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* 10(1):165-174
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396
- Kreuz K, Tommasini R, Martinoia E (1996) Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiol. Jun*; 111(2):349-353
- Krumm T, Bandemer K, Boland W (1995) Induction of volatile biosynthesis in the lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway. *FEBS Letters* 377:52
- Lam E, Kano-Murakami Y, Gilmartin P, Niner B, Chua NH (1990) A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. *Plant Cell Sep*; 2(9):857-66
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Lloyd AM, Paparozzi ET, Marks MD (1994) Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA Genes in *Arabidopsis* Trichome Development. *Plant Cell Aug*; 6(8):1065-1076

- Lazo GR, Stein PA and Ludwig RA (1991) A D NA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* 9:963-967
- Lechelt C, Peterson T, Laird A, Chen J, Dellaporta SL, Dennis E, Peacock WL and Starlinger P (1989) Isolation and molecular analysis of the maize P locus. *Mol. Gen. Genet.* 219:225-234
- Legarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S, Grington C (1996) Tissue-specific expression of *Arabidopsis AKT1* gene is consistent with a role of K⁺ nutrition. *Plant J* 9:195-203
- Lehmann J, Atzorn R, Brückner C, Reinbothe S, Leopold J, Wasternack C, Parthier B (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed batley leaf segments. *Planta* 197:156-162
- Lewin B (1994) Chromatin and gene expression: constant questions, but changing answers. *Cell* 79:397-406
- Li G, Hall TC, Holmes-Davis R (2002) Plant chromatin: development and gene control. *Bioassays*. Mar; 24(3):234-43
- Ludwig SR, Habera LF, Dellaporta SL, Wessler SR (1989) Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Sep*; 86(18):7092-6
- Lusser A. (2002) Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* Oct; 5(5):437-43
- Maas C, Laufs J, Grant S, Korihage C and Werr W (1991) The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. *Plant Mol. Biol.* 16:199-207
- Manjunath S, Sachs MM (1994) Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680
- Martin C and Paz-Ares J (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* 13(2):67-73
- Marzabal P, Busk PK, Ludevid MD, Torrent M. (1998) The bifactorial endosperm box of gamma-zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZM *cis*-acting elements. *Plant J* Oct; 16(1):41-52
- Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA (1995) Beta glucosidase an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2036
- Matzk et al. (1996) Localisation of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant Microbe Interaction* MPMI 9:373-381

- Matzke AJ and Matzke MA (1998a) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* Apr; 1(2):142-8 Review
- Matzke MA and Matzke AJ (1998b) Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. *Cell Mol. Life Sci.* Jan; 54(1):94-103 Review
- Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor ORCA2. *EMBO J* 18:4455-4463
- Meyer R, Figurski D, Helinski DR (1975) Molecular vehicle properties of the broad host range plasmid RK2. *Science* Dec 19; 190(4220):1226-8
- Nagano Y, Furuhashi H, Inaba T, Sasaki Y (2001) A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to A/T-rich DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* Oct 15; 29(20):4097-105
- Norris SR, Meyer SE, Callis J (1993) The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO, Bowles DJ (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* Dec 13; 274(5294):1914-7
- Ohnhäuser R (2000) Analyse der Promotorelemente des Gens *Bx4* von *Zea mays* mit Hilfe von Reporter-Gen-Konstrukten. Diplomarbeit. Technische Universität München
- Ohtsubo N, Nakayama T, Terada R, Shimamoto K, Iwabuchi M (1993) Proximal promoter region of the wheat histone H3 gene confers S phase-specific gene expression in transformed rice cells. *Plant Mol. Biol.* Nov; 23(3):553-65
- Parchmann S, Gundlach H, Mueller MJ (1997) Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* Nov; 115(3):1057-64
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H (1987) The regulatory *cl* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J* 6:3553-3558
- Pieterse CM, van Loon LC (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* Feb; 4(2):52-58
- Planchais S, Perennes C, Glab N, Mironov V, Inze D, Bergounioux C (2002) Characterization of *cis*-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath*;CycB1;1 transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Mol. Biol.* Sep; 50(1):111-27

- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucl. Acids Res. Dec 11; 23(23):4878-84
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP and Nester EW (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). Bio/Technology 8:33-38
- Reisdorf-Cren M, Carrayol E, Terce-Laforgue T, Hirel B (2002) A novel HMG A-like protein binds differentially to the AT-rich regions located in the far distal and proximal parts of a soybean glutamine synthetase gene (*GS15*) promoter. Plant Cell Physiol. Sep; 43(9):1006-16
- Robatzek S, Somssich IE (2001) A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. Plant J Oct; 28(2):123-33
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui D, Lin S-W, Dunn JJ and Studier FW (1987) Vectors for selective expression for cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. Gene 56:125-135
- Rossi L, Hohn B, Tinland B (1996) Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Jan 9; 93(1):126-30
- Rushton PJ, Somssich IE (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. Curr. Opin. Plant Biol. Aug; 1(4):311-5
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. Cell Nov 24; 99(5):463-72
- Sainz MB, Grotewold E, Chandler VL (1997) Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. Plant Cell Apr; 9(4):611-25
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Sandhu JS, Webster CI, and Gray JC (1998) A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. Plant Mol. Biol. 37:885-896
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Dec; 74(12):5463-7
- Schafer W, Gorz A, Kahl G (1987) T-DNA integration and expression in monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. Nature 327:529-531
- Sheen J (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell Oct; 2(10):1027-38

-
- Sheen J (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* Dec; 127(4):1466-75
- Sheen J (2002) Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science* May 31; 296(5573):1650-2 Review
- Shen B, Zheng Z, Dooner HK (2000) A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14807-12
- Shen W-H, Escudero J and Hohn B (1999) T-DNA transfer to maize plants. *Molecular Biotechnology* 13:165-169
- Shirasu K, Nielsen K, Piffanelli P, Oliver R and Schulze-Lefert P (1999) Cell-autonomous complementation of *mlo* resistance using a biolistic transient expression system. *Plant J* 17(3):293-299
- Singh KB (1998) Transcriptional regulation in plants: The importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* 118:1111-1120
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517
- Springer PS (2000) Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell* Jul; 12(7):1007-20
- Stelmach BA, Muller A, Hennig P, Laudert D, Andert L, Weiler EW (1998) Quantitation of the octadecanoid 12-oxo-phytodienoic acid, a signalling compound in plant mechanotransduction. *Phytochemistry* Feb; 47(4):539-46
- Stettner C (1998) DIMBOA-Biosynthese in Mais: Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *BxI*-Gens. Dissertation. Technische Universität München
- Studier FW and Mofat BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol. Biol.* 189:113-130
- Sturaro M, Viotti A (2001) Methylation of the Opaque2 box in zein genes is parent-dependent and affects O2 DNA binding activity *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* Jul; 46(5):549-60
- Takabaysahi J and Dicke M (1996) Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends Plant Sci.* 4:109
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, *Nucl. Acids Res.* Nov 11; 22(22):4673-80

- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S and Brettell R (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J* 1(6):1369-1376
- Tinland B (1997) The Integration of T-DNA into plant genomes. *Trans. Plant Sci.* 1(6):178-184
- Tjaden G and Coruzzi GM (1994) A novel AT-rich DNA binding protein that combines an HMG I-like DNA binding domain with a putative transcription domain. *Plant Cell* 6:107-118
- Torres-Ruiz RA, Jurgens G (1994) Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* Oct; 120(10):2967-78
- Tsukaya H, Uchimiya H (1997) Genetic analysis of the formation of the serrated margin of leaf blades in *Arabidopsis*: combination of a mutational analysis of leaf morphogenesis with the characterization of a specific marker gene expressed in hydathodes and stipules. *Mol. Gen. Genet.* Oct; 256(3):231-8
- Tuerck JA, Fromm ME (1994) Elements of the maize A1 promoter required for transactivation by the anthocyanin B/C1 or phlobaphene P regulatory genes. *Plant Cell* Nov; 6(11):1655-63
- Turlings TC, Fritzsche ME (1999) Attraction of parasitic wasps by caterpillar-damaged plants. *Novartis Found Symp.*; 223:21-32
- Turlings TC, Tumlinson JH (1992) Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Sep 1; 89(17):8399-402
- Turlings TC, Tumlinson JH and Lewis WJ (1990) Exploration of herbivore-induced plant odors by host seeking parasitic wasps. *Science* 250:1251-1253
- Twell D, Yamaguchi J, Wing RA, Ushiba J, McCormick S (1991) Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev.* Mar; 5(3):496-507
- van der Fits L, Zhang H, Menke FLH, Deneka M, Memelink J (2000) A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a JA- independent signal transduction pathway. *Plant Mol. Biol.* 44: 675-685
- Vancanneyt G, Smidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L and Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250
- von Rad U, Huttel R, Lottspeich F, Gierl A, Frey M (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J* Dec; 28(6):633-42
- Walkerpeach CR, Veltens J (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In S.B. Gelvin and R.A. Schilpoot (Hrsg.): *Plant Molecular Biology Manual*, B1:1-19. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers

-
- Walters D, Cowley T and Mitchell A (2002) Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *Journal of Experimental Botany* 53(369):747-756
- Wan Y and Lemaux PG (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 104:37-48
- Wang X and Lino M (1997) Blue-light induced shrinking of protoplasts from maize coleoptiles and its relationship to coleoptile growth. *Plant Physiol.* 114:009-1020
- Wasternack C and Parthier B (1997) Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.* Aug; 2(8):302-307
- Weber H, Vick BA, Farmer EE (1997) Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Sep 16; 94(19):10473-8
- Wierstra I, Kloppstech K (2000) Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley. *Plant Physiol.* 124(2): 836-842
- Yang Q, Grimmig B, Matern U (1998) Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase gene from carnation: rapid elicitation of transcription and promoter analysis. *Plant Mol. Biol.* Dec; 38(6):1201-14
- Yang Y, Li R and Qi M (2000) *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J* 22(6):543-551
- Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains. Nucleotide sequences of the M13mp and pUC 19 vectors. *Gene* 33:103-119
- Yunes JA, Cord Neto G, Leite A, Ottoboni LM, Arruda P (1994) The role of the Opaque2 transcriptional factor in the regulation of protein accumulation and amino acid metabolism in maize seeds. *An Acad Bras Cienc.* 66 Su 1(Pt2):227-37; quiz 237-8
- Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* Dec 1; 16(23):3100-12
- Zhao Z, Gu W, Cai T, Tagliana L, Hondred D, Bond D, Schroeder S, Rudert M and Pierce D (2002) High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Breeding* 8:323-333

Danksagung

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Alfons Gierl für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, für sein Interesse an diesem Thema und seine Unterstützung durch stete Diskussionsbereitschaft.

In gleicher Weise bedanke ich mich bei Frau Dr. Monika Frey für ihre große Bereitschaft, die unzähligen Hilfestellungen, vielen aufbauenden Vorschläge und die schier jederzeitige Möglichkeit, mit ihr die Arbeit voran zu bewegen. Desgleichen für ihre Geduld und unablässige Mühe, die sie aufwendete.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern unseres Lehrstuhls für ihre Unterstützung bei den vielen großen und kleinen Problemen bedanken. Herzlich bedanke ich mich bei Karolin Schmäzlin für ihre stetige Hilfsbereitschaft, Aufmerksamkeit und fruchtbaren Hinweise bezüglich der Computerwelt; bei Peter Dobos für Unterstützung bei Arbeiten an der Gewebekultur und die fachlichen Gespräche; bei Sebastian Grün und Christine Schäfer für ihre fachliche und freundschaftliche Zusammenarbeit und bei Regina Hüttl für ihre sachliche Unterstützung.

Ich bedanke mich herzlich auch bei Dr. Woong June Park, Rafal Jonczyk, Annette Martin, Dr. Ulrich Genschel, Dr. Erich Glawischnig, Sabine Merl, Dr. Ramón Torres, Dr. Timothy Golds, Roman Radikewicz, Nikolaus Schantz, Verena Kriechbaumer, Silvia Ronchoni, Uta von Rad, Karin Huber, Hedi Kellner, Dr. Thilo Fischer, Gerti Spielbauer, Maja Kaliani, Jurgen Knott, Peter Weber, Sabine Winderl, Simin Erschadi und Andrea Lohner für interessante fachliche und auch fachfreie Gespräche und ein immer freundliches Arbeitsklima.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Ruslan Kalendar für seine fachliche und moralische Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich auch bei meinem Mann Martin für seine Geduld und Mitgefühl.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Oksana Kortés, geb. Shevchenko
Geburtsdatum	17. März 1970
Geburtsort	Galenki (Russische Föderation)
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Ukraine
Einreise nach Deutschland	1998

Ausbildung:

1977 – 1987	Mittelschule in Odessa: Allgemeine Hochschulreife
1987 – 1992	Studium der Biologie an der Odessaer staatlichen Universität: Diplom
1998	Deutschkurs für Ausländer, Leipziger Gesellschaft für Bildung und Arbeit mbH
1999 – 2003	Dissertation am Lehrstuhl für Genetik an der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr. Alfons Gierl

Berufstätigkeit

1992 – 1996	Laborärztin: Gebietsdispensaire für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Odessa
1996 – 1998	Cheflaborantin: Institut für Selektion und Genetik der Ukrainischen Akademie für Agrarwissenschaften, Abteilung Gentechnik, Odessa