

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München

**Charakterisierung einer Transkriptionsfaktorfamilie aus *Zea mays* und
deren Funktion in der Expression der DIMBOA-Biosynthesegene**

Annette Martin

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

2. Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

Die Dissertation wurde am 22.10.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.12.2003 angenommen.

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 <i>Sekundäre Pflanzenstoffe als Abwehrstrategie</i>	1
1.1.1 Sekundärmetabolite als Abwehrstoffe	1
1.1.2 Benzoxazinoide als pflanzliche Abwehrstoffe	2
1.2 <i>Aspekte der pflanzlichen Genregulation</i>	4
1.2.1 Regulation der Transkription bei Pflanzen	4
1.2.2 Regulation pflanzlicher Sekundärstoffwechselwege	6
1.3 <i>Ziele dieser Arbeit</i>	9
2 Material und Methoden	10
2.1 <i>Material und Bezugsquellen</i>	10
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	10
2.1.2 <i>E. coli</i> -Stämme	11
2.1.3 Phagenbanken	11
2.1.4 Hefestämme	12
2.1.5 Pflanzenmaterial	12
2.1.6 Verwendete Vektoren	13
2.1.7 Oligonukleotide	13
2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	17
2.2.1 DNA-Isolierung	17
2.2.2 RNA-Isolierung	17
2.2.3 Southern Blot-Analyse von Phagen-DNA	17
2.2.4 PCR	18
2.2.5 Quantifizierung von Transkriptmengen mit Hilfe des Lightcyclers	18
2.2.6 Sequenzierung	19
2.2.7 Klonierungen	19
2.2.7.1 Reporterplasmide für den Yeast-One-Hybrid-Screen	19
2.2.7.2 Köderplasmide für den Yeast-Two-Hybrid-Screen	19
2.2.7.3 Konstrukte für heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	20
2.2.7.4 Effektorstrukture für die Protoplastentransfektion	20
2.2.8 Herstellung einer Phagenbank	20
2.2.9 PCR-gestützte Bindestellen-Selektion	21
2.2.10 Gelretardationsexperimente	22
2.2.11 Transiente Genexpressionsstudien in Maisprotoplasten	23
2.2.11.1 Gewinnung von Protoplasten aus Mesophyllzellen von Mais	23
2.2.11.2 Elektroporation von Maisprotoplasten	23
2.2.11.3 Luciferase-Test	24
2.2.11.4 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG)-Test	24
2.2.12 Methoden zur Durchführung von Yeast-Hybrid-Screens	24
2.2.12.1 Hefemedien	24
2.2.12.2 Hefetransformation im großen Maßstab	25
2.2.12.3 Hefetransformation im kleinen Maßstab	25
2.2.12.4 β -Galactosidase-Test	26
2.2.12.5 3-Aminotriazol-Wachstumstest	26
2.2.12.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	27
2.3 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	27
2.3.1 Kernproteinextrakte aus Maiskeimlingen	27

2.3.2 Gewinnung und Aufreinigung von rekombinantem Protein aus <i>E. coli</i>	28
2.3.3 Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese	28
2.4 <i>Naturstoffanalysen</i>	29
2.4.1 Isolierung von DIMBOA aus Maiskeimlingen	29
2.4.2 HPLC-Analyse von DIMBOA	29
3 Ergebnisse	30
3.1 <i>Analyse der Bx-Gen-Promotoren</i>	30
3.1.1 Vergleichende Analyse der Bx-Promotoren	30
3.1.2 Charakterisierung des Bx-Bindemotivs	31
3.2 <i>Isolierung von ZmHD-Zip1</i>	33
3.2.1 Durchführung eines Yeast-One-Hybrid-Screens	33
3.2.2 Die Bindspezifität von ZmHD-Zip1	34
3.2.3 Isolierung des genomischen und cDNA-Klons von <i>ZmHD-Zip1</i>	36
3.3 <i>Isolierung von ZmHD-Zip2</i>	38
3.3.1 Durchführung eines Yeast-Two-Hybrid-Screens	38
3.3.2 Herstellung des <i>ZmHD-Zip1</i> -Köderplasmids	39
3.3.3 Isolierung der cDNA von <i>ZmHD-Zip2</i>	40
3.4 <i>Vergleichende Charakterisierung von ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2</i>	43
3.4.1 Sequenzvergleich	43
3.4.2 Dimerisierungseigenschaften von ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2	46
3.4.3 DNA-Bindeeigenschaften im Hefesystem	47
3.4.4 DNA-Bindeeigenschaften <i>in vitro</i>	48
3.4.4.1 Gewinnung von rekombinantem ZmHD-Zip1- und -2-Protein	48
3.4.4.2 Ermittlung des bevorzugten Bindemotivs für rZmHD-Zip1	49
3.4.4.3 Gelretardationsexperimente	51
3.5 <i>Funktionelle Charakterisierung von ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2</i>	54
3.5.1 Charakterisierung von ZmHD-Zip1 und -2 im Protoplastensystem	54
3.5.1.1 Aktivierungseigenschaften von ZmHD-Zip1 und -2	54
3.5.1.2 Dimerisierungseigenschaften im Protoplastensystem	57
3.5.2 Charakterisierung von <i>ZmHD-Zip1</i> durch Transposon-Insertionsmutanten	59
3.5.2.1 Charakterisierung zweier <i>ZmHD-Zip1::Mu</i> -Insertionslinien	60
3.5.3 Die Expression von <i>ZmHD-Zip1</i> und <i>ZmHD-Zip2</i> in der Maispflanze	64
4 Diskussion	67
4.1 <i>ZmHD-Zip1 und -2: Zwei HD-Zip-Proteine aus Mais</i>	67
4.1.1 ZmHD-Zip1 und -2 gehören zur Klasse I der HD-Zip-Proteine	67
4.1.2 ZmHD-Zip1 und -2 besitzen unterschiedliche DNA-Bindepräferenzen	68
4.1.3 ZmHD-Zip1 und -2 binden an das Bx2.box-Bindemotiv	69
4.1.4 ZmHD-Zip1 und -2 bilden Homo- und Heterodimere	70
4.2 <i>ZmHD-Zip1 und -2 als mögliche Regulatoren der Bx-Gene</i>	72
4.2.1 ZmHD-Zip1 und -2 wirken als Aktivatoren der Transkription	72
4.2.2 <i>ZmHD-Zip1::Mu</i> -Insertionsmutanten zeigen keinen DIMBOA-defizienten Phänotyp	74
4.2.3 <i>ZmHD-Zip1</i> und -2 zeigen verschiedene Expressionsmuster	75
4.3 <i>Ausblick</i>	77
5 Zusammenfassung	78
6 Literatur	79

Abkürzungen

Neben SI-Einheiten, Elementsymbolen und dem Einbuchstabencode für Aminosäuren und Nukleotide wurden folgende Abkürzungen verwendet:

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
AT	Adenosintriphosphat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>bx</i>	Benzoxazineless-Mutation
cDNA	Komplementäre DNA
CPHB	<i>Craterostigma plantagineum</i> Homeobox
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DIBOA	2,4-Dihydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-Tetraacetat
FDA	Fluoresceindiacetat
FG	Frischgewicht
<i>g</i>	Fallbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamat
GST	Glutathion S-Transferase
GUS	β -Glucuronidase
H ₂ O dest.	Destilliertes Wasser
HBOA	2-Hydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
HD	Homeodomäne
HDMBOA	2-Hydroxy-4,7-dimethoxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on

HD-Zip	Homeodomain Leucine Zipper
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIS	Histidinsynthase
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kb	Kilobasenpaare
kd	Kilodalton
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LUC	Luciferase
MeJa	Methyljasmonat
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
mM	millimolar
μ M	micromolar
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
Oshox	<i>Oryza sativa</i> Homeobox
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIF3	Phytochrome Interacting Factor 3
ppm	Millionster Teil
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
TRIBOA	2,4,7-Trihydroxy-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-on
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TUSC	Trait Utility System for Corn
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
ZmHD-Zip	<i>Zea mays</i> Homeodomain Leucine Zipper
ZmOCL	<i>Zea mays</i> Outer Cell Layer

1 Einleitung

1.1 Sekundäre Pflanzenstoffe als Abwehrstrategie

1.1.1 Sekundärmetabolite als Abwehrstoffe

Im Pflanzenreich existiert eine immense Anzahl chemischer Substanzen, die unter dem Begriff „sekundäre Pflanzenstoffe“ zusammengefasst werden. Die mehr als 200 000 bisher identifizierten Sekundärstoffe der Pflanzen sind ein unermessliches Reservoir chemischer Biodiversität. Man nimmt an, dass sie unentbehrliche Funktionen für Wechselwirkungen des Individuums mit seiner Umwelt erfüllen, zum Beispiel bei der Abwehr potentieller Feinde oder unerwünschter Konkurrenten und für die Kommunikation mit anderen Arten. Die größte Substanzklasse innerhalb der sekundären Pflanzenstoffe stellen die Terpenoide mit etwa 30 000 bekannten Substanzen (Facchini, 1999) dar. Andere wichtige Vertreter sind beispielsweise die Alkaloide (Kutchan, 1995), Glucosinolate (Wittstock and Halkier, 2002), Saponine (Osborn, 1996), Gerbstoffe (Nultsch, 1996), Flavonoide (Dixon and Steele, 1999) und Benzoxazinoide (Sicker *et al.*, 2000).

Innerhalb der pflanzlichen Abwehr kann unterschieden werden zwischen Phytoantizipinen, die konstitutiv gebildet werden und Phytoalexinen, deren Synthese als Antwort auf Schädigung durch ein Pathogen erfolgt (VanEtten *et al.*, 1994). Viele Phytoantizipine sind auch für die Pflanze selbst toxisch und werden daher häufig in speziellen Zellen gespeichert. Beispiele dafür sind Gerbstoffzellen, Alkaloidzellen, Drüsenhaare oder Harzgänge. Eine weitere Strategie stellt die Speicherung toxischer Substanzen in Form von inaktiven Vorstufen dar. So werden viele pflanzliche Sekundärstoffe in Form von Glycosiden in der Vakuole gespeichert und sind damit von den aktivierenden Enzymen räumlich getrennt (Jones and Vogt, 2001). Diese Trennung von inaktivem Sekundärstoff und aktivierendem Enzym ist beispielsweise in der Klasse der Glucosinolate verwirklicht, die besonders häufig in der Familie der *Brassicaceae* vorkommen. Während die Glucosinolate in verschiedenen pflanzlichen Geweben zu finden sind, wird das aktivierende Enzym Myrosinase in speziellen Myrosinzellen gespeichert (Wittstock and Gershenzon, 2002). Erst durch Verletzung des pflanzlichen Gewebes treffen beide Komponenten aufeinander, und es kommt durch Hydrolyse zur Freisetzung des

entsprechenden Aglycons (Koroleva *et al.*, 2000; Rask *et al.*, 2000; Wittstock and Halkier, 2002).

1.1.2 Benzoxazinoide als pflanzliche Abwehrstoffe

Benzoxazinoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die vor allem in Gräsern (*Gramineae*), aber auch in wenigen Familien der dikotylen Pflanzen (*Acanthaceae*, *Scrophulariaceae*, *Ranunculaceae*) vorkommen (Sicker *et al.*, 2000). Sie stellen einen Teil der generellen Pflanzenabwehr dar, die sich im Gegensatz zur spezifischen Resistenz gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Insekten und mikrobieller Pathogene richtet (Heath, 1985). Für die Reaktivität der Benzoxazinoide ist das Stickstoffatom im cyclischen Halbacetal maßgeblich verantwortlich (Sicker *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Reaktivität werden Benzoxazinoide als D-Glucoside in der Vakuole der Zelle gespeichert, um eine Schädigung der Pflanze (Autotoxie) zu vermeiden.

In Mais (*Zea mays*) und Weizen (*Triticum aestivum*) ist DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) das vorherrschende Benzoxazinoid, während dessen biosynthetische Vorstufe DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) den größten Anteil dieser Substanzklasse in Roggen (*Secale cereale*) stellt (Niemeyer, 1988). DIMBOA verleiht der Maispflanze eine breit gefächerte Resistenz gegen verschiedene Insekten, beispielsweise gegen den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*). Möglicherweise interagiert das Benzoxazinoid dabei mit Verdauungsenzymen der Insekten. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass DIMBOA *in vitro* zu einer Inaktivierung des Verdauungsenzyms α -Chymotrypsin führt (Cuevas *et al.*, 1990). Darüber hinaus zeigt DIMBOA auch eine Wirkung gegen phytopathogene Pilze und Bakterien (Woodward *et al.*, 1978; Sahi *et al.*, 1990; Niemeyer, 1988). Es wurden außerdem allelopathische Effekte (Friebe *et al.*, 1995; von Rad *et al.*, 2001) und eine Resistenz der Maispflanze gegenüber dem Herbizid Atrazin (Niemeyer, 1988) beobachtet, die ebenfalls durch DIMBOA bewirkt werden. Die Mais-Mutante *bx1*, die eine Mutation im Gen *Bx1* der DIMBOA-Biosynthese trägt und daher kein DIMBOA synthetisiert, ist dagegen Atrazin-sensitiv.

Biosynthese von DIMBOA. Benzoxazinoide werden fast ausschließlich im Maiskeimling synthetisiert (Cambier *et al.*, 2000): Die Konzentration von DIMBOA-Glucosid ist zwei Tage nach der Keimung maximal und nimmt anschließend ab. Das Benzoxazinoid wird aber bis zehn Tage nach der Keimung weiter gebildet, was zu einem steten Anstieg der absoluten

Menge bis zu diesem Zeitpunkt führt. Danach nimmt die Menge an DIMBOA-Glucosid sehr schnell ab. Es wird vermutlich in diesem Stadium aktiv abgebaut oder ausgeschieden (Cambier *et al.*, 2000). Neben der entwicklungsspezifischen Produktion von Benzoxazinoiden im Maiskeimling, kann deren Bildung auch durch den Einsatz von Elicitoren induziert werden.

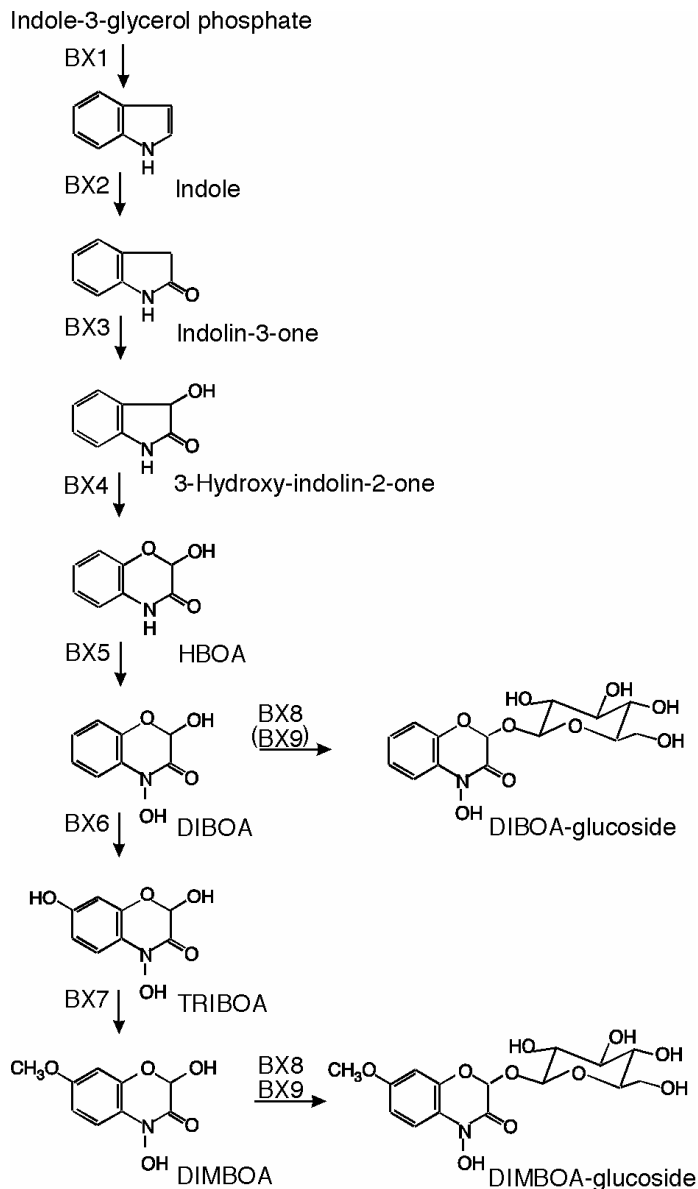


Abb. 1.1: DIMBOA-Biosynthese in Mais. Indol wird im Chloroplasten durch BX1 synthetisiert. Die P450-Enzyme BX2-BX5 bilden durch vier aufeinander folgende Hydroxylierungsreaktionen aus Indol das Benzoxazinoid DIBOA. Die Hydroxylierung an Position C-7 katalysiert die 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase BX6. Die O-Methyltransferase BX7 der DIMBOA-Biosynthese muss noch identifiziert werden. DIBOA oder DIMBOA werden durch die Glucosyltransferasen BX8 und BX9 in die entsprechenden Glucoside überführt.

So konnte in Maisblättern die Zunahme des Benzoxazinoids HDMBOA-Glucosid nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren, beispielsweise Jasmonsäure, beobachtet werden (Oikawa *et al.*, 2001).

Die Biosynthese von DIMBOA ist bei Mais weitgehend aufgeklärt (Frey *et al.*, 1997; von Rad *et al.*, 2001; Frey *et al.*, 2003) und beginnt mit der Umsetzung von Indolglycerin-3-phosphat zu Indol (Abb. 1.1). Dieser Schritt wird von BX1 katalysiert und stellt den Verzweigungspunkt der DIMBOA-Biosynthese vom Primärstoffwechsel dar. BX1 ist homolog zur α -Untereinheit der Tryptophansynthase (Stettner, 1998). Mutanten mit einem Defekt im *Bx1*-Gen bilden kein DIMBOA (Frey *et al.*, 1997; Melanson *et al.*, 1997). Die folgenden vier Hydroxylierungen und eine Ringerweiterung, die zur Bildung von DIBOA führen, werden durch die vier Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen BX2 bis BX5 katalysiert. Eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (BX6) katalysiert die Hydroxylierung von DIBOA an Position C-7. Es entsteht TRIBOA. Die anschließende Me-

thylierung zu DIMBOA erfolgt durch eine O-Methyltransferase (BX7). Dieses Enzym konnte bislang nicht isoliert werden. DIBOA und DIMBOA werden wegen ihrer autotoxischen Wirkung als Glucoside in der Vakuole gespeichert. Die O-Glucosylierungen werden von den Glucosyltransferasen BX8 und -9 katalysiert (von Rad *et al.*, 2001).

Expression der Bx-Gene. Die Gene *Bx1* bis -5 weisen ein transientes, keimlingsspezifisches Expressionsmuster auf. Die höchsten Transkriptmengen wurden zwischen drei und sieben Tagen nach Keimung im Spross festgestellt (Frey *et al.*, 1995; von Rad *et al.*, 2001). Die Expression der Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* zeigt ebenfalls einen transienten Verlauf im Maiskeimling. Maximale Transkriptmengen werden hier vier Tage nach Keimung beobachtet und zeigen nicht, wie bei den übrigen *Bx*-Genen, eine Präferenz des Sprosses gegenüber der Wurzel (von Rad *et al.*, 2001). In Lightcycler-Analysen zeigten die Gene *Bx1*, -3, -8 und -9 in unterschiedlichen Wurzeltypen (Primär-, Embryonal- und Kronwurzeln) dasselbe charakteristische Expressionsmuster (Schmäzlin, 2003): Besonders auffallend ist die starke Expression von *Bx1* in der Differenzierungszone des jeweiligen Wurzeltyps. Die Transkriptmengen für *Bx8/9* verändern sich zwischen Übergangszone und Differenzierungszone kaum und liegen generell über den für die Wurzelspitze bestimmten Werten. Die strenge Festlegung des Expressionsmusters der *Bx*-Gene während der Wurzelentwicklung deutet darauf hin, dass die spezifische Regulation dieser Gene einen wesentlichen Aspekt für ihre Funktion darstellt.

1.2 Aspekte der pflanzlichen Genregulation

1.2.1 Regulation der Transkription bei Pflanzen

Die Regulation der Genexpression ist eines der meist bearbeiteten Gebiete der Biologie. Vor allem seit die vollständigen Sequenzdaten verschiedener pflanzlicher und tierischer Genome (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Adams *et al.*, 2000; Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) vorliegen, wird die Genregulation als Basis der Komplexität von Organismen diskutiert (Levine and Tjian, 2003). Die Regulation der Genexpression kann auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. Einen wichtigen Teil stellt die Regulation auf Transkriptionsebene durch die Wechselwirkung von *trans*-aktivierenden Transkriptionsfaktoren mit spezifischen Bindestellen (*cis*-Elementen) in den

Promotor-Bereichen von Genen dar. Man unterscheidet dabei generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren (Roeder, 1996).

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* widmet etwa 6 % ihres Genoms der Codierung von über 1500 Transkriptionsfaktoren (Riechmann *et al.*, 2000). Ungefähr 45 % dieser Gene sind pflanzenspezifisch. Dazu gehören beispielsweise die Familien der AP2/EREBP- (APETA-LA2/Ethylene Responsive Element Binding Protein; Jofuku *et al.*, 1994) und WRKY-Faktoren (Eulgem *et al.*, 2000), ARF- (Auxin Response Factors; Guilfoyle *et al.*, 1998) und HD-Zip-Proteine (Homeodomain Leucine Zipper; Schena and Davis, 1992).

Pflanzliche Transkriptionsfaktoren haben wie alle eukaryotischen Transkriptionsfaktoren einen modularen Aufbau aus funktionellen Domänen, die der DNA-Bindung, der Transaktivierung und der Interaktion mit anderen Proteinen dienen. Die drei größten Transkriptionsfaktor-Familien in *Arabidopsis* sind AP2/EREB- (144 Vertreter), MYB- (190 Vertreter) und bHLH-Proteine (133 Vertreter; Riechmann *et al.*, 2000; Heim *et al.*, 2003).

Charakteristisch für AP2/EREB-Proteine ist eine Domäne von 68 Aminosäuren, die als konservierte Region eine amphipathische α -Helix beinhaltet (Liansen *et al.*, 1999). Viele Faktoren dieser Klasse spielen eine Rolle in der pflanzlichen Stressantwort (Riechmann and Meyerowitz, 1998).

Das MYB-Motiv besteht aus einer *helix-turn-helix*-Struktur mit drei Tryptophanresten, die durch regelmäßige Abstände voneinander getrennt sind. In Pflanzen kommen vorwiegend R2R3-MYB-Proteine vor, die sich durch zwei unvollständige Wiederholungen des MYB-Motivs auszeichnen. Viele R2R3-MYB-Proteine spielen eine wichtige Rolle im Sekundärmetabolismus von Pflanzen und bei ihrer Interaktion mit der Umwelt (Rabinowicz *et al.*, 1999).

Eine bHLH-Domäne besteht am N-Terminus aus einer basischen Region, gefolgt von zwei langen α -Helices, die durch eine Schleife voneinander getrennt sind (*helix-loop-helix*). Nach Heim *et al.* (2003) lassen sich in *Arabidopsis* zwölf Unterfamilien dieser Transkriptionsfaktoren unterscheiden, deren Funktionen von Entwicklungsgenen wie *GLABRA3* bis zu Faktoren der Lichtsignaltransduktion (*PIF3*) reichen. Besonders interessant ist die häufige Dimerisierung von bHLH-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren der MYB-Klasse. Durch eine solche Heterodimerisierung zwischen verschiedenen Proteinklassen werden die Möglichkeiten der spezifischen Genregulation zusätzlich erweitert.

Eine Klasse von Transkriptionsfaktoren, die vor allem in tierischen, aber auch in pflanzlichen Systemen eine wichtige Rolle in der Steuerung von Entwicklungsvorgängen einnimmt, sind die Homeodomain (HD)-Proteine. Die dreidimensionale Struktur der Homeodomäne wurde zuerst für das Protein ANTENNAPEDIA aus *Drosophila melanogaster* aufgeklärt. Die

Homeodomäne ist eine Region von 60 Aminosäuren, die ein *helix-loop-helix-turn-helix*-Motiv ausbildet und für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Dabei ist Helix III als Erkennungshelix in der großen Furche der DNA positioniert und bindet sequenzspezifisch. Helices I und II liegen außerhalb der Doppelhelix in antiparalleler Anordnung nah beieinander (Gehring *et al.*, 1994). Als erstes pflanzliches Homeobox-Gen wurde *Knotted1* (*Kn1*) aus Mais identifiziert (Vollbrecht *et al.*, 1991). Der *Kn1*-Locus ist durch mehrere dominante Gain-of-Function-Mutationen, die sich auf die Blattentwicklung auswirken, definiert. Das entsprechende Gen wurde durch Transposon-Tagging kloniert. Kurz darauf konnten Schena und Davis (1992) in einem cDNA-Screen, bei dem als Sonden hochkonservierte Bereiche von Helix III aus tierischen Homeodomänen eingesetzt wurden, mehrere cDNAs aus *Arabidopsis* isolieren. Diese unterschieden sich von den bisher charakterisierten HD-Proteinen durch den unmittelbaren Anschluss einer Leucin-Zipper-Domäne an den C-Terminus der Homeodomäne (HD-Zip).

HD-Zip-Gene sind pflanzenspezifisch und können aufgrund von Sequenzkriterien in vier Klassen (HD-Zip I bis IV) unterteilt werden (Sessa *et al.*, 1994). Charakteristischerweise binden sie als Dimere an pseudopalindrome DNA-Motive. Als Dimerisierungsdomäne dient die Leucin-Zipper-Domäne, die vermutlich mit dem Leucin-Zipper des Dimerisierungspartners eine amphipathische α -Helix ausbildet (Lee and Chun, 1998).

1.2.2 Regulation pflanzlicher Sekundärstoffwechselwege

Pflanzliche Sekundärmetabolite werden entwicklungspezifisch in definierten Geweben gebildet. Ihre Synthese kann aber auch durch exogene Faktoren induziert werden. Ein Modell für einen sekundären Stoffwechselweg, der auf all diesen Ebenen reguliert wird, ist die Flavonoidbiosynthese. Anthocyane werden beispielsweise in Blüten, jungen Blättern, dem Hypokotylhaken, aber auch bei abiotischem Stress wie UV-Licht (Weisshaar *et al.*, 1991) und bei Schädlingsbefall (Lawton and Lamb, 1987) induziert. Eine Induktion der Flavonoidbiosynthese erfolgt bei verschiedenen Pflanzen, oft in Zellkultur, durch definierte Elicitoren (Hahlbrock and Scheel, 1987). Die interessanten Expressionsmuster und die Tatsache, dass für viele Pflanzen die Gene des Flavonoidbiosynthesewegs isoliert sind, haben dazu geführt, dass diese Sekundärstoffbiosynthese auch auf der Ebene der involvierten Transkriptionsfaktoren am besten aufgeklärt ist. Die Regulation der Anthocyanbiosynthese bei Mais ist ein Beispiel für eine gewebespezifische Regulation eines Sekundärstoffbiosynthesewegs durch das Zusammenspiel

verschiedener Transkriptionsfaktoren: Im Aleuron des Maiskorns ist der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktor C1 zusammen mit dem bHLH-Protein R für die Aktivierung der Anthocyanbiosynthesegene verantwortlich (Cone *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1987; Martin and Paz-Ares, 1997; Ludwig *et al.*, 1989). Dagegen kontrolliert Pl, ein sehr ähnliches MYB-Protein, die Anthocyanbiosynthese in der übrigen Maispflanze. Auch dieser Faktor bildet ein Heterodimer mit einem Protein 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*. Bislang wurden neun Gene dieses Biosyntheseweges kloniert. 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- and Elicitor-Responsive Element). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass zwei Transkriptionsfaktoren, ORCA2 und ORCA3 (Octadecanoid-Responsive *Catharanthus* AP2-Domain Proteins), spezifisch mit diesem Element interagieren und die Genexpression der *Str* aktivieren. Die Expression beider Proteine, die zur Klasse der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren gehören, kann durch MeJa induziert werden (Menke *et al.*, 1999; van der Fits and Memelink, 2001). Für ORCA3 konnte außerdem gezeigt werden, dass dessen regulatorische Funktion nicht auf die Terpenindolalkaloidsynthese und damit auf den Sekundärstoffwechsel beschränkt ist, sondern dass dieses Protein auch die Aktivierung zweier Gene des Primärstoffwechsels reguliert: Anthranilatsynthase und D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase sind Enzyme des Primärstoffwechsels, die an der Produktion von Terpenindolalkaloid-Vorstufen beteiligt sind (van der Fits and Memelink, 2000). Damit stellt ORCA3 einen Transkriptionsfaktor dar, der sowohl Strukturgene des Primär- wie des Sekundärmetabolismus von Pflanzen reguliert und damit als ein Bindeglied wirkt, durch das beide Zweige aufeinander abgestimmt und koordiniert werden.

Ein weiteres Beispiel dafür, dass die Regulation von Sekundärstoffwechselwegen nicht isoliert von der übrigen pflanzlichen Entwicklung betrachtet werden kann, ist das Gen *TTG1* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA1*) aus *Arabidopsis thaliana*. *ttg1*-Mutanten zeigen einen multiplen Phänotyp, der sowohl eine gestörte Trichom- und Wurzelhaarbildung wie auch eine fehlende Anthocyanpigmentierung der Samen aufweist (Walker *et al.*, 1999). Interessanterweise kann dieser komplexe Phänotyp durch konstitutive Expression des *R*-Gens aus Mais komplementiert werden (Lloyd *et al.*, 1992). Untersuchungen haben gezeigt, dass TTG1, ein

WD40-Protein, sowohl eine Funktion in der Morphogenese als auch im Sekundärstoffwechsel von *Arabidopsis* einnimmt: Für die Expression von Strukturgenen der Flavonoidsynthese sind *TTG1*, *TT2* (*TRANSPARENT TESTA*) und *TT8* notwendig (Nesi *et al.*, 2001). Gemeinsam mit *GL1* (*GLABROUS1*) wirkt *TTG1* als Schlüsselgen der Trichomentwicklung (Larkin *et al.*, 1994). *TTG1* sorgt also gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren dafür, dass entwicklungspezifisch sowohl Sekundärstoffsynthesen als auch Differenzierungsprozesse ablaufen. Die Regulation der spezifischen Gene ergibt sich dabei aus dem Zusammenspiel und der Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die an der DIMBOA-Biosynthese beteiligten Gene zeigen untereinander ein ähnliches Expressionsmuster in Hinblick auf den zeitlichen Verlauf und die Gewebespezifität ihrer Transkripte (Frey *et al.*, 1995; von Rad *et al.*, 2001; Schmäzlin, 2003). Besonders interessant ist dabei, dass die Expression der Gene in einem zeitlich begrenzten Rahmen zwischen drei und sieben Tagen nach der Keimung maximal ist und anschließend schnell abnimmt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass die an der DIMBOA-Biosynthese beteiligten Gene im Rahmen eines entwicklungspezifischen Programms durch die gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Ziel dieser Doktorarbeit war daher zunächst, in den Promotorsequenzen aller zu diesem Zeitpunkt bekannten *Bx*-Gene konservierte *cis*-Elemente zu identifizieren. Wegen der schlechten Transformierbarkeit von Mais wurde dazu nicht die übliche Promotoranalyse mittels Deletions-Reportergenkonstrukten durchgeführt, sondern auf eine vergleichende, bioinformatische Promotoranalyse zurückgegriffen. Anschließend sollten mit Hilfe eines Yeast-One-Hybrid-Screens mögliche Regulatorproteine identifiziert werden, die spezifisch an das konservierte DNA-Motiv binden und im gleichen Keimlingsstadium exprimiert werden wie die *Bx*-Gene. Mögliche Interaktionspartner solcher Transkriptionsfaktoren sollten mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Screens identifiziert werden.

Die Funktion von Kandidaten-Genen als Regulatoren der DIMBOA-Biosynthese sollte später in transienten Expressionsstudien, aber auch klassisch durch die Analyse von Mutanten untersucht werden.

Bei der Suche nach Regulatoren der DIMBOA-Biosynthese konnten als Kandidaten-Gene Mitglieder einer Klasse von HD-Zip-Transkriptionsfaktoren erstmals aus Mais isoliert werden. Diese sollten in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad) wurden von folgenden Firmen bezogen: BioRad (USA), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (USA).

Enzyme für DNA-Restriktion und -Modifikation wurden bezogen von: Gibco BRL (USA), New England Biolabs (USA), Qiagen (Hilden), Roche (Schweiz), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (USA) und Stratagene (USA).

Oligonukleotide, die zur PCR, für Sequenzierungen oder als Sonden für Gelretardationsexperimente eingesetzt wurden, wurden von Sigma-Genosys (Großbritannien) und Sigma-Ark (Darmstadt) im Auftrag synthetisiert.

Radioaktiv markierte Nukleotide (α -³²P dCTP, α -³²P dATP und γ -³²P ATP, je $1,1 \cdot 10^{14}$ Bq/mmol) wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Zur Reinigung von Plasmid-DNA wurden NUCLEOBOND[®] AX5-, AX20- und AX100-Säulen von Macherey-Nagel (Düren) eingesetzt. Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelelen erfolgte mit dem GFX[™] DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Zur RNA-Extraktion aus kleineren Mengen Pflanzenmaterial wurde der NucleoSpin[®] RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Zur Isolierung von poly A⁺-mRNA wurde das Oligotex-System von Qiagen (Hilden) benutzt. Die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* erfolgte entweder mit Ni-NTA Agarose, magnetischen Ni-NTA Agarose-Kügelchen von Qiagen (Hilden) oder über Glutathion Sepharose 4B von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Zur Erstellung einer cDNA-Bank wurde das HybriZAP[®]-2.1 XR Library Construction and cDNA Synthesis Kit von Stratagene (USA) benutzt. Sequenzierungen erfolgten mit dem BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (USA).

2.1.2 E. coli-Stämme

Folgende *E. coli*-Stämme wurden für verschiedene Methoden eingesetzt:

Tab. 2.1: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Einsatz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ lac</i> [F' <i>proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]; Bullock <i>et al.</i> , 1987.	Standard-Klonierungen
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF [']	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI_qZ ΔM15Tn10(Tetr)</i>]; Stratagene.	Herstellung einer cDNA-Bank
<i>E. coli</i> XLOLR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' <i>proAB lacI^fZΔM15Tn10(Tet^r)</i>] Su ⁻ (non-suppressing) λ^R (lambda resistant); Stratagene.	Herstellung einer cDNA-Bank (Plattierung ausgeschnittener Phagemide)
<i>E. coli</i> K803	F ⁻ <i>e14⁻ (McrA⁻)lacY1</i> or $\Delta(lac)6 glnV44 galK2 galT22 rfbD1 metB1 hsdS3$ ($r_K^- m_K^-$); Wood, 1966.	cDNA-Screen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3); Studier and Mofat, 1986.	Proteinexpression
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi⁻1 relA1</i> ; Hanahan, 1983.	Standard-Klonierungen

2.1.3 Phagenbanken

Es wurden folgende Phagenbanken benutzt:

- cDNA-Bank: CI31A, zwei Tage alte Keimlinge, pAD-GAL4-2.1 Phagemid Vektor (Annette Martin, Primärbank mit $3 \cdot 10^6$ Transformanden)
- cDNA-Bank: CI31A, zwei und vier Tage alte Keimlinge, pKS⁺ Phagemid Vektor (Dr. Monika Frey)
- Genomische Bank: λ EMBL3A-Bank (1994) aus der Maislinie CI31A (Dr. Monika Frey; Frey *et al.*, 1997)

2.1.4 Hefestämme

Folgende Hefestämme wurden als Ausgangsstämme zur Herstellung von Reporterstämmen verwendet:

Tab. 2.2: Verwendete Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Einsatz
<i>S. cerevisiae</i> YM4271	<i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 leu2-3 112 trp1-901 tyr-501 gal4-Δ512 gal80- Δ538 ade5::hisG</i> (Wilson <i>et al.</i> , 1991; Clontech)	Yeast-One-Hybrid-Screen
<i>S. cerevisiae</i> YRG-2	<i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 leu2-3 112 gal4-542 gal80-538</i> LYS::UAS _{GAL1} -TATA _{GAL1} -HIS3 URA3::UAS _{GAL4 17mers (x3)} -TATA _{CYC1} - <i>lacZ</i> (Stratagene)	Yeast-Two-Hybrid-Screen

2.1.5 Pflanzenmaterial

Zur Präparation von Proteinen aus Zellkernen wurde die Hybridmaislinie LG-22 (Limagrain 22.43) verwendet. Genomische und cDNA-Banken wurden aus Keimlingen der Inzuchtlinie CI31A (Ac2175) hergestellt. Diese Linie wurde von Dr. P.A. Peterson (Iowa State University) zur Verfügung gestellt. Adulte Pflanzen und Keimlinge der Inzuchtlinie B73 dienten als Ausgangsmaterial für Genexpressionsstudien und wurden von Prof. Dr. P. Schnable (Iowa State University) zur Verfügung gestellt. Transposon-Insertionsmutanten im B73-Hintergrund wurden freundlicherweise von Pioneer Hi-Bred International (USA) zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung von Protoplasten wurden Keimlinge aus einer unspezifizierten Mischung von Hybridmais verwendet, die von Prof. Dr. E. Grill (TU München) zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Keimung wurden die Maiskörner mindestens für zwei Stunden in H₂O dest. eingeweicht, in feuchtes Filterpapier (603/N, 75 g/m², 193 x 580 mm, Sartorius) eingerollt und bei 28°C im Dunkeln gezogen. Nach zwei Tagen wurden die Keimlinge auf Erde gesetzt und in Lichtschranken (Ehret) weiter angezogen.

2.1.6 Verwendete Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

Tab. 2.3: Verwendete Vektoren.

Vektor	Herkunft	Selektion	Organismus	Verwendung
pBlueskript KS ⁺	Stratagene	Ampicillin	<i>E. coli</i>	Standardklonierungen
pACT1.cas	Dr. R. Brettschneider	Ampicillin	<i>E. coli</i>	Transfektion von Maisprotoplasten
pET-3a His	Rosenberg <i>et al.</i> , 1987	Ampicillin	<i>E. coli</i>	Proteinexpression
pGEX-2T	Amersham Pharmacia Biotech	Ampicillin	<i>E. coli</i>	Proteinexpression
pLacZi	Clontech	Ampicillin Uracil	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Reporterplasmid Yeast-One-Hybrid-Screen
pHISi-1	Clontech	Ampicillin Uracil, Histidin	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Reporterplasmid Yeast-One-Hybrid-Screen
pBD-GAL4 Cam	Stratagene	Chloramphenicol Tryptophan	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Köderplasmid Yeast-Two-Hybrid-Screen
pAD-GAL4-2.1	Stratagene	Ampicillin Leucin	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	Aktivierungsplasmid Yeast-Two-Hybrid-Screen

2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden zum einen als Primer in PCR- und Sequenzreaktionen, zum anderen zur Gewinnung doppelsträngiger DNA-Sonden für Gelretardationsexperimente eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Folgenden tabellarisch nach ihrer Anwendung geordnet.

Tab. 2.4: Primer zur Sequenzierung des genomischen und cDNA-Klons von *ZmHD-Zip1* und zur Lokalisierung von Mu-Insertionen in der genomischen Sequenz.

Name Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Xba1.(Intron).for	ACT CAG ATG ATC ATC ACG
Xba2.rev	CTA TAG GTA GCG AGC GCT
Xba3.for	TCG TCA TCG ATC ATC ATG CA
Xba4.rev	GTA CGT ACT TAC TGG CAG ACG
Xba5.for	GTG TGT GTA CTT ATG CAA GTT A
Xba5.rev	ACG TTA CCT ATC GTT GAC TGA T
Xba6.rev	ATG CGA ACA GCG AGC CGA T
XbaA.for	ATC GGC TCG CTG TTC GCA T
XbaB.for	ATC AGT CAA CGA TAG GTA ACG GT
XbaC.for	CGT CTG CCA GTA AGT ACG TAC
XbaD.for	ATA TAC GTG CAC GCC TAC GC
XbaE.for	AGC GCT CGC TAC CTA TAG
XbaF.for	TGG AAG TCC AAG CAG CTG GA
XbaV.for	CTG CAA CTG CAA GCA CCA
XbaV.rev	CTA CAT GTT CCT GGA TTA CAT GA
XbaW.for	GAA TTC GAG ATC GAG AAG AG
HD-Zip.330.rev	TTG ATC TGC TCC TCG CTG
HD-Zip.spec.rev	CCG CGC CGC CCA CCT CCA
HD-Zip.spec.for	GCC ACG CCG TTG CCA TCA C
HD-Zip.580.for	GAA GCT AGC CGA GAT GCT G
HD-Zip.580.rev	CAG CAT CTC GGC TAG CTT C
HD-Zip.860.for	TCC GGC TGC TGG CCA TC
HD-Zip.PvuII.rev	TCC AGC TGC TGG ACT TCC A
62113F	TCA GCC AGC TAG CCA GGT TGA GAC
HD-Zip.spec.rev.3	ATC GAG CTA GTC GGT CTC AAC CTG
Mu2	AGA GAA GCC AAC GCC AWG GCC TCY ATT TCG

Tab. 2.5: Primer zur Sequenzierung des cDNA-Klons von *ZmHD-Zip2*.

Name Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
GAL1A.for	AGG TGC AGC TGC TAG AGC
GAL1A.rev	ATC CAT CCG CTG ATC AGT T
GAL1A.2.for	AAG GAC AAC CTC CAC AGC A
GAL1A.2.rev	TAA GCA GCC TTA AGG CGG T
GAL1A.3.rev	TAG TCG GTC TCG AGT TGC TT
GAL1A.4.rev	GGT TAT CGT TGT CGG CCA
HD-Zip2.400.for	AGA CCA AGC AAC TCG AG
HD-Zip2.470.rev	TTA TCG TTG TCG GCC AGG A

Tab. 2.6: Primer zur Herstellung von Expressionskonstrukten für *ZmHD-Zip1* und *ZmHD-Zip2*.

Name Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
HD-Zip1.pET3a.for	GGC GTG CAT ATG GAG GGC GAG GAC GAC GGC
HD-Zip1.pET3a.rev	AGA CAC GGA TCC ACT GAG GGA CTC GAA CTC
HD-Zip1.GST.for	GAG GAC GAA TTC CCG GAG TGG ATG ATG GAG
HD-Zip1.minus.S.D.for	AGG GAG AAT TCG GCG CGC TGG ACA AG
HD-Zip1.minus.H.D.for	CCC TCG AAT CAT GTT CGC CAC GCA G
HD-Zip2.pGEX.for	ATC AGC ATG GAA TTC AGC GCG GTC AGT TTC GAC TC
HD-Zip2.pGEX.rev	CTG ATC AGT TCT AGA ACA TGG ATG TCC AGT TGG C
HD-Zip2.minus.20AS.rev	GGC AGC GAA CAT GGC ATC C
HD-Zip2.minus.40AS.rev	CAC CGT CGT CTT CTT CCG AAG

Tab. 2.7: Spezifische Primer für verwendete Plasmide.

Name Oligonukleotid	Vektor	Sequenz 5' → 3'
M13 (-20)	pBlueskript KS ⁺	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13.rev	pBlueskript KS ⁺	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G
pAD.GAL.strat.for	pAD-GAL4-2.1	AGG GAT GTT TAA TAC CAC TAC
pAD.GAL.strat.rev	pAD-GAL4-2.1	GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC
pBD.GAL4.for	pBD-GAL4 Cam	CAT TGA GAC AGC ATA GAA TAA G
pBD.GAL4.rev	pBD-GAL4 Cam	GAA TTA GCT TGG CTG CAG T
pGEX.for	pGEX-2T	GAT CTG GTT CCG CGT GGA
pGEX.rev	pGEX-2T	AGG CAG ATC GTC AGT CAG TC
pLacZi.seq.for	pLacZi	GCT ACA AAG GAC CTA ATG
pHISi-1.seq.for	pHISi-1	ATT ATC ATG ACA TTA ACC

Tab. 2.8: Oligonukleotide zur Herstellung doppelsträngiger DNA-Sonden für Gelretardationsexperimente. 'comp' kennzeichnet den zur oberen Sequenz komplementären Gegenstrang.

Name Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Bx2.box	GCG GCC ACA TTA ATT ATT GGA GTC TG
Bx2.box.comp	CAG ACT CCA ATA ATT AAT GTG GCC GC
Bx2.mut	GCG GCC ACA TAA AAA ATT GGA GTC TG
Bx2.mut.comp	CAG ACT CCA ATT TTT TAT GTG GCC GC
Bx4.box	GAT GAT GAA TAA TTA CAT CTC TAG
Bx4.box.comp	CTA GAG ATG TAA TTA TTC ATC ATC
Bx2.box.BSS.cons	GCG GCC ACA TCA ATC ATT GGA GTC TG
Bx2.box.BSS.cons.comp	CAG ACT CCA ATG ATT GAT GTG GCC GC
Bx2.box.HD-ZipI	GCG GCC ACA TCA ATT ATT GGA GTC TG
Bx2.box.HD-ZipI.comp	CAG ACT CCA ATA ATT GAT GTG GCC GC

Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Herstellung doppelsträngiger DNA-Fragmente für Klonierungen von Reporterkonstrukten für den Yeast-One-Hybrid-Screen. 'comp' kennzeichnet den zur oberen Sequenz komplementären Gegenstrang.

Name Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Bx2.box.one-hybrid	AAT TCG CGG CCA CAT TAA TTA TTG GAG TCT GGC GGC CAC ATT AAT TAT TGG AGT CTG GCG GCC ACA TTA ATT ATT GGA GTC TGG GAG TCG ACG CCA CAT ATT
Bx2.box.one-hybrid.comp	CTA GAA TAT GTG GCG TCG ACT CCC AGA CTC CAA TAA TTA ATG TGG CCG CCA GAC TCC AAT AAT TAA TGT GGC CGC CAG ACT CCA ATA ATT AAT GTG GCG
Bx2.mut.one-hybrid	AAT TCG CGG CCA CAT AAA AAA TTG GAG TCT GGC GGC CAC ATA AAA AAT TGG AGT CTG GCG GCC ACA TAA AAA ATT GGA GTC TGG GAG TCG ACG CCA CAT ATT
Bx2.mut.one-hybrid.comp	CTA GAA TAT GTG GCG TCG ACT CCC AGA CTC CAA TTT TTT ATG TGG CCG CCA GAC TCC AAT TTT TTA TGT GGC CGC CAG ACT CCA ATT TTT TAT GTG GCG

Tab. 2.10: Oligonukleotide für die PCR-gestützte Bindestellen-Selektion.

Name Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
BSS.Bx2.N11	AGA TTG GGG ATC CCG GCC A (N11) AGG CTG CTC GAG CAC TGA T
BSS.Bx2.for	AGA TTG GGG ATC CCG GCC A
BSS.Bx2.rev	ATC AGT GCT CGA GCA GCC T
BSS.Bx2.spec	AGA TTG GGG ATC CCG GCC ACA TTA ATT ATT GAG GCT GCT CGA GCA CTG AT
BSS.Bx2.spec.rev	GCT CGA GCA GCC TCA ATA A

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte durch alkalische Lyse (Birboim and Doly, 1979). Zur Präparation von Phagen-DNA wurden die Methoden von Sommer *et al.* (1990) und Frey *et al.* (1990) angewandt.

2.2.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte nach der Guanidinium-Hydrochlorid-Methode von Logemann *et al.* (1987). Für die RNA-Extraktion aus geringeren Mengen an Pflanzenmaterial wurde der NucleoSpin[®] RNA Plant Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Zur Gewinnung von poly A⁺-mRNA aus Gesamt-RNA wurden Oligo(dT)-Latexkügelchen (Oligotex, Qiagen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.3 Southern Blot-Analyse von Phagen-DNA

Zur Identifizierung von Phagenplaques aus genomischen und cDNA-Screens wurde die Phagen-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* verdaut und auf einem 0,8%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch Kapillarblot (Sambrook and Russell, 2001) über Nacht auf eine Biodyne B Transfer Membran (Pall Biosupport Membranes) transferiert. Als Sonden wurden PCR-Produkte verwendet, die in einer Klenow-Reaktion mit α -³²P dCTP radioaktiv markiert wurden. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines STORM[®] 860 Phosphoimagers (Amersham Pharmacia Biotech) und des Programms ImageQuant (Molecular Dynamics) ausgewertet.

2.2.4 PCR

PCR-Reaktionen (Sambrook and Russell, 2001) wurden als 50 µl-Ansätze im Thermoblock UNO (Biometra) durchgeführt. Die Standard-PCR erfolgte in 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 3 % DMSO mit 1 µM jeden Primers, 0,5 mM dNTPs und 1 Einheit *Taq* DNA Polymerase (Roche). Die PCR wurde standardmäßig als Hot-Start-PCR durchgeführt.

2.2.5 Quantifizierung von Transkriptmengen mit Hilfe des Lightcyclers

Für quantitative PCR-Reaktionen mit dem Lightcycler wurde der FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers verwendet. Jeder Ansatz wurde doppelt ausgeführt. Als Standards zur Quantifizierung wurden linearisierte Plasmide mit der entsprechenden cDNA eingesetzt. Die bestimmten cDNA-Mengen wurden zur Normierung auf die entsprechenden cDNA-Mengen des Gens Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) bezogen. Es wurde vorausgesetzt, dass dieses Gen als Gen des Grundstoffwechsels konstante Expressionsmengen aufweist. Die Quantifizierung einzelner cDNAs erfolgte unter definierten Bedingungen (Tab. 2.11).

Tab. 2.11: Bedingungen für die quantitative PCR mit dem Lightcycler. Zur Amplifizierung der cDNA wurde der folgende PCR-Ablauf gewählt: Denaturierung, Annealing, Extension, wobei die Denaturierung stets bei 95°C für 15 s erfolgte. Die anschließenden Punkte wurden variiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei *Bx1* und *GAPDH* nach der Extension bei 72°C. Bei den übrigen cDNAs wurde wegen der starken Bildung von Primerdimeren eine zusätzliche kurze Extension (5 s) bei höheren Temperaturen durchgeführt (Extensionstemp. 2), bei der diese Dimere nicht mehr stabil sind. Die Fluoreszenzmessung erfolgte an diesem Punkt.

cDNA	Konzentration MgCl ₂ (mM)	Konzentration DMSO (% v/v)	Annealing-Temperatur	Extensionszeit (72°C)	Extensions-temp. 2
<i>ZmHD-Zip1</i>	2	3	63°C	25 s	87°C
<i>ZmHD-Zip2</i>	4	3	58°C	20 s	83°C
<i>Bx1</i>	1	6	65°C	27 s	-
<i>Bx2</i>	2	5	66°C	25 s	84°C
<i>GAPDH</i>	1	6	65°C	27 s	-

Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt, in denen etwa 5 ng poly A⁺-mRNA enthalten waren. 1/20 davon, also 250 pg, wurden für jede Lightcycler-Reaktion eingesetzt. In den Experimenten konnte 1 fg der jeweiligen cDNA nachgewiesen werden, was einem Anteil von 4 ppm an der eingesetzten cDNA entspricht. Im Durchschnitt waren die Transkripte von *GAPDH* mit 1 pg cDNA vertreten und das Gen damit sehr stark exprimiert.

2.2.6 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977) und wurden mit einem Kapillarsequenzierer ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Sequenzreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Big-Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Die in die Reaktion eingesetzte DNA wurde vorher einer PEG-Fällung (Sambrook and Russell, 2001) unterzogen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Lasergene von DNASTAR Inc. (USA).

2.2.7 Klonierungen

2.2.7.1 Reporterplasmide für den Yeast-One-Hybrid-Screen

Drei Wiederholungen des Bindemotivs Bx2.box und der mutierten Version Bx2.mut im Kontext des *Bx2*-Promotors wurden als 100 bp-Oligonukleotide (Tab. 2.9) mit dem jeweils komplementären Gegenstrang bestellt. Durch Aufkochen und langsames Abkühlen der beiden Oligonukleotide wurde das 100 bp-Doppelstrang-Fragment gewonnen. Dieses Fragment war bereits mit überhängenden Enden der Restriktionsenzyme *EcoRI* am 5'-Ende und *XbaI* am 3'-Ende versehen. Neben der *XbaI*-Schnittstelle war am 5'-Ende außerdem eine *Sall*-Restriktionsstelle vorhanden. Die DNA-Fragmente wurden nun über *EcoRI/XbaI* in den Vektor pHISi-1 beziehungsweise über *EcoRI/Sall* in pLacZi eingefügt.

2.2.7.2 Köderplasmide für den Yeast-Two-Hybrid-Screen

Köderkonstrukte von *ZmHD-Zip1* und -2 wurden im Vektor pBD-GAL4 Cam hergestellt. Dazu wurde durch PCR im Bereich des Startcodons eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt. Am 3'-Ende der PCR-Produkte wurden durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glatte Enden erzeugt. Das DNA-Fragment wurde über *EcoRI/SmaI* in den Vektor eingefügt.

2.2.7.3 Konstrukte für heterologe Proteinexpression in *E. coli*

In der cDNA-Sequenz von *ZmHD-Zip1* wurde durch PCR mit mismatch-Oligonukleotiden (HD-Zip1.pET3a.for und HD-Zip1.pET3a.rev; Tab. 2.6) das Startcodon in eine *NdeI*-Restriktionsstelle umgewandelt und das Stopcodon durch eine *BamHI*-Schnittstelle ersetzt. Die so modifizierte cDNA wurde über *NdeI/BamHI* in den Vektor pET-3a His eingefügt.

Bei *ZmHD-Zip2* wurde ebenfalls durch PCR auf der cDNA im Bereich des Startcodons eine *EcoRI*- und im Bereich des natürlichen Stopcodons eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt (HD-Zip2.pGEX.for und HD-Zip2.pGEX.rev; Tab. 2.6). Das modifizierte cDNA-Fragment wurde dann über *EcoRI/XbaI* in den Vektor pGEX-2T eingefügt. Das in der *XbaI*-Erkennungsstelle enthaltene Codon TAG diente als neues Stopcodon im Expressionskonstrukt.

2.2.7.4 Effektorstrukture für die Protoplastentransfektion

Für Effektorstrukture wurden die cDNAs von *ZmHD-Zip1* und -2 unter die Kontrolle eines Actin-Promotors gestellt. Dies geschah durch Klonierung in den Vektor pACT1.cas. Dabei wurde darauf geachtet, dass in der cDNA-Sequenz vor dem Startcodon kein weiteres ATG im falschen Leserahmen vorhanden war. Das cDNA-Fragment von *ZmHD-Zip1* wurde über *KpnI/XbaI* in pACT1.cas eingefügt. *ZmHD-Zip2* wurde mit *NheI/XbaI* verdaut und in die *XbaI*-Schnittstelle von pACT1.cas ligiert.

2.2.8 Herstellung einer Phagenbank

Die Herstellung einer Phagenbank aus zwei Tage alten Maiskeimlingen der Linie CI31A erfolgte mit dem HybriZAP[®]-2.1 XR Library Construction Kit von Stratagene nach Anweisungen des Herstellers. Abweichungen von diesem Protokoll seien im Folgenden kurz erwähnt: Zur Erststrangsynthese wurden 4 µg poly A⁺-mRNA eingesetzt. Die Zweitstrangsynthese erfolgte zur Kontrolle unter radioaktiver Markierung mit 1,85·10⁵ Bq (5 µCi) α-³²P dATP. Die gewonnene cDNA wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und der Bereich von 500 bis 2000 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittene cDNA wurde im Dialyseschlauch durch Elektrophorese aus der Agarose entfernt (10 min, 100 V). Anschließend folgte eine weitere Reinigung der DNA-Lösung über eine NUCLEOBOND[®] AX5-Säule. Zur Ligation in den HybriZAP-2.1 Vektor wurden 100 ng cDNA eingesetzt.

Die Amplifizierung der cDNA-Bank nach Massenexcision erfolgte auf 100 dYT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin. Dazu wurden auf jede Platte 10⁵ Phagemide und 2,5·10⁷ *E. coli*

XLOLR-Zellen gebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden mit 3 ml 10 mM MgSO₄ pro Platte abgeschwemmt und vereinigt. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse.

2.2.9 PCR-gestützte Bindestellen-Selektion

Zur Bindestellen-Selektion wurde ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit einer Länge von 49 bp eingesetzt, das eine zentrale Zufallssequenz von 11 bp beinhaltet. Zur Herstellung dieses Fragments wurde ein 49 bp langes Einzelstrangoligonukleotid (BSS.Bx2.N11) mit einem zur Randsequenz komplementären 19 bp Einzelstrangoligonukleotid (BSS.Bx2.rev; Tab. 2.10) durch Aufkochen und anschließendes langsames Abkühlen zum Doppelstrang ergänzt. Der verbleibende einzelsträngige Bereich wurde mit Hilfe der Klenow-Reaktion aufgefüllt. Diese Reaktion wurde jeweils mit 5 µg des DNA-Fragments und 5 Einheiten Klenow Enzym für 15 min bei 25°C durchgeführt und durch Zugabe von 10 mM EDTA sowie durch zehnmütige Inkubation bei 75°C beendet. Anschließend erfolgte die Reinigung des DNA-Fragments über ein natives, 12%iges Polyacrylamidgel. Gelelektrophorese erfolgte bei 10 mA in 0,5-fachem TBE, bis die Bromphenolblaubande des Ladepuffers (0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol, 4 % Saccharose) den unteren Gelrand erreicht hatte. Die anschließende Isolierung der DNA korrekter Größe aus dem Gel erfolgte mit Hilfe der Crush-and-Soak-Methode (Sambrook and Russell, 2001) in 0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat-Tetrahydrat, 1 mM EDTA, pH 8 bei 37°C für mindestens drei Stunden.

6 µg rekombinantes, mit C-terminalem His-tag versehenes rZmHD-Zip1-Protein wurde mit 20 µl magnetischer Nickel-Agarose-Suspension (5 % v/v; Qiagen) in einem Gesamtansatz von 200 µl (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,005 % Tween 20) inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Magnetkügelchen mit Hilfe eines Magnetständers für Eppendorf-Gefäße am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt und der Überstand abgenommen. Es folgte ein Waschschriff mit 200 µl Inkubationspuffer (25 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 75 mM KCl, 10 % Glycerol, 5 mM MgCl₂, 0,005 % Tween 20, 20 mM Imidazol). Anschließend wurden 3 µg des DNA-Fragments in 200 µl Inkubationspuffer zu den Magnetkügelchen gegeben. Die DNA-Proteinbindung wurde für 30 min bei RT durchgeführt. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 200 µl Inkubationspuffer. Schließlich wurde das gebundene DNA-Fragment mit 25 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 1 M KCl, 10 % Glycerol, 5 mM MgCl₂, 0,005 % Tween 20, 20 mM Imidazol in einem Gesamtvolumen von 50 µl eluiert und über MicroSpinTM G-25 Säulchen (Amersham Pharmacia

Biotech) entsalzt. Die eluierte DNA wurde mit für die Randsequenzen spezifischen Primern (BSS.Bx2.for und BSS.Bx2.rev) über 25 PCR-Zyklen (Schritt 1: 94°C, 1 min; Schritt 2: 62°C, 30 s; Schritt 3: 72°C, 15 s) in Ammoniumsulfat-Puffer (0,67 M Tris, pH 8,8, 0,167 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M β-Mercaptoethanol, 0,067 M MgCl₂) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über ein natives, 12%iges Polyacrylamidgel gereinigt. Es wurden insgesamt sieben Selektionsrunden durchgeführt. Nach der letzten Runde wurde das eluierte DNA-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I verdaut und unidirektional in den Vektor pKS⁺ (Stratagene) eingefügt. Plasmide mit Insert wurden durch blau-weiß-Selektion identifiziert und sequenziert.

2.2.10 Gelretardationsexperimente

Gelretardationsexperimente erfolgten modifiziert nach Marzábal *et al.* (1998). Als Sonden wurden doppelsträngige DNA-Fragmente von 25 bp verwendet, die durch Phosphorylierung mit Polynukleotidkinase radioaktiv markiert wurden (Sambrook and Russell, 2001). 10 µg Kernprotein oder etwa 100 ng rekombinantes, gereinigtes Protein aus *E. coli* wurden mit 1 bis 2 ng radioaktiv markierter DNA-Sonde (³²P, 15000 cpm/ng) für 20 min bei RT inkubiert. Die Bindereaktion fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl in 25 mM Hepes-KOH, pH 7,8, 75 mM KCl, 10 % Glycerol, 0,5 mM EDTA, pH 8, 5 mM MgCl₂, 0,45 mM DTT mit 2,5 µg BSA und 800 ng poly dI-dC statt. Bei kompetitiven Retardationsexperimenten erfolgte vor der Inkubation mit radioaktiv markierter Sonde eine Präinkubation mit unmarkierter DNA. Diese Kompetitor-DNA wurde in 10-, 100- und 500-fachem Überschuss zur radioaktiv markierten Sonde eingesetzt. Die Inkubationsansätze wurden mit 2 µl Ladepuffer (0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol, 4 % Saccharose) versetzt und auf ein natives Polyacrylamidgel (6%ig oder 8%ig in 0,5-fachem TBE, 1 % Glycerol) geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 10 mA. Anschließend wurden die Gele mit einem Geltrockner (Bachofer) unter Vakuum für drei Stunden bei 80°C getrocknet. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines STORM[®] 860 Phosphoimagers (Amersham Pharmacia Biotech) und dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics) ausgewertet.

2.2.11 Transiente Genexpressionsstudien in Maisprotoplasten

2.2.11.1 Gewinnung von Protoplasten aus Mesophyllzellen von Mais

Die Gewinnung von Maisprotoplasten erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll von Sheen (2002). Dazu wurden Maiskeimlinge für zehn bis elf Tage im Dunkeln auf Vermiculit angezogen. Zur Protoplastierung wurden die zweiten Blätter (15 bis 20 cm Länge) von zehn etiolierten Pflanzen mit einer scharfen Rasierklinge in ca. 3 bis 5 mm breite Längsstreifen geschnitten. Anschließend wurden diese Streifen nochmals in 2 bis 3 cm breite Querstücke geteilt und die Blattspitze entfernt. Bei diesem Schritt wurde besonders darauf geachtet, dass das Blattmaterial nicht gequetscht wurde. Die Blattstreifen wurden in ein 100 ml-Becherglas überführt, mit 15 ml Enzym-Lösung (1,5 % Cellulase *Onozuka* RS (Serva), 0,3 % Macerozym (Serva), 0,6 M Mannitol, 10 mM MES, pH 5,7, 1 mM CaCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 % BSA) überschichtet und im Exsikkator für 5 min Vakuum-infiltriert. Anschließend wurde der Ansatz unter leichtem Schwenken bei 28°C für drei bis vier Stunden weiter inkubiert. Danach wurde die Protoplasten-Lösung durch ein 35 µm-Nylonfilter filtriert und 3 min bei 130·g abzentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden durch vorsichtiges Schwenken in 10 ml Elektroporationspuffer (0,6 M Mannitol, 4 mM MES, pH 5,7, 20 mM KCl) resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Protoplasten in 3 bis 5 ml Elektroporationspuffer aufgenommen. Zum Test auf Lebensfähigkeit wurden die Zellen mit Fluoresceindiacetat (FDA) angefärbt. Dazu wurden 50 µl Protoplasten mit 1 µl einer 0,1%igen FDA-Lösung versetzt. Mittels einer Zählkammer (Thoma) wurde die Anzahl fluoreszierender Protoplasten an einem Axioskop mit speziellem Filtersatz (Zeiss) ermittelt. Zur Transformation wurde die Protoplastenkonzentration auf $0,5 \cdot 10^6$ vitale Protoplasten/ml eingestellt.

2.2.11.2 Elektroporation von Maisprotoplasten

Zur Protoplastentransfektion wurde für Reporterplasmide jeweils 30 bis 60 µg, für Effektorplasmide je 10 µg und für Standard-35S-Luciferase-Plasmide je 3 µg DNA in Kotransfektionsversuchen eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten Plasmide betrug jeweils 2 µg/µl DNA in H₂O dest. Die DNA wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 150 µl Protoplastenlösung gemischt und in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (Kondensatorplattenabstand: 2 mm, Biozym) überführt. Die Elektroporation wurde mit $U = 155$ V und $t = 5$ ms bei einem Puls in einem Elektroporator (Electro Square Porator T820, BTX) durch-

geführt. Die Protoplasten wurden anschließend in der Küvette für 3 bis 5 min auf Eis gelagert. Danach wurden 400 µl 0,6 M Mannitol, 4 mM MES, pH 5,7, 4 mM KCl zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 18 Stunden unter leichtem Schwenken bei 28 °C. Die Protoplastensuspension wurde für 2 min bei 80·g abzentrifugiert, die Hälfte des Überstands verworfen und die Protoplasten vorsichtig in der übrigen Flüssigkeit resuspendiert.

2.2.11.3 Luciferase-Test

Für den Luciferase-Test wurden 50 µl transformierte Protoplasten mit 100 µl Luciferase-Reagenz (20 mM Tricine-NaOH, pH 7,8, 2,7 mM MgSO₄, 0,5 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 0,53 mM ATP, 0,1 % Triton X-100, 0,052 % (w/v) (MgCO₃)₄Mg(OH)₂, 0,02 % (w/v) Coenzym A, 0,015 % (w/v) Luciferin) versetzt und die Lichtemission (560 nm) im Luminometer (flash `n glow, Berthold) bestimmt.

2.2.11.4 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG)-Test

Für den MUG-Test wurden 50 µl transformierte Protoplasten mit 100 µl MUG-Reagenz (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 1 mM DTT, 0,2 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid) versetzt. Die Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid zu 4-Methylumbelliferon und Glucuronsäure wurde in einem Bioassay Reader HTS 7000 Plus (Perkin Elmer) bestimmt.

2.2.12 Methoden zur Durchführung von Yeast-Hybrid-Screens

Alle Methoden, die zur Durchführung von Yeast-One- sowie -Two-Hybrid-Screens benötigt wurden, erfolgten mit leichten Abwandlungen nach den Protokollen aus dem Yeast Protocols Handbook (Clontech; # PT3024-1).

2.2.12.1 Hefemedien

Als Vollmedium zur Aufzucht der Wildtypstämme diente YPDA (20 g/l Bacto Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 0,003 % Adenin-HCl, 2 % Glucose, 20 g/l Agar-Agar). Als Selektionsmedium wurde SD-Medium (6,7 g/l DifcoTM Yeast Nitrogen Base without amino acids, 2 % Glucose, 20 g/l Agar-Agar) verwendet, dem je nach Selektionsanforderungen bestimmte Aminosäurezusammensetzungen (Dropout Supplement: -His, -Uracil, -Leu/-His, -Leu/-Trp/-His von Clontech) beigemischt wurden.

2.2.12.2 Hefetransformation im großen Maßstab

Zur Durchführung von Yeast-One- sowie -Two-Hybrid-Screens war es notwendig, die verwendeten Hefereporterstämme im großen Maßstab zu transformieren, um eine möglichst hohe Transformationsrate zu erzielen. Mit dem verwendeten Protokoll war es möglich 10^5 bis 10^6 unabhängige Klone einer cDNA-Bank zu testen.

Am Vorabend der Transformation wurden fünf bis zehn große (Durchmesser: 2 bis 3 mm), maximal drei Wochen alte Kolonien in 50 ml des entsprechenden Selektionsmediums (auf $OD_{600} = 0,3$) angeimpft. Von Platte angeimpfte Kolonien wurden vor Überführung in Flüssigmedium für etwa 1 min unter Vortexen in 1 ml H_2O resuspendiert, um eine vollständige Trennung einzelner Hefezellen zu gewährleisten. Anschließend wurde die Hefesuspension für 16 bis 18 Stunden bei $30^\circ C$ und 260 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen sollte die Hefekultur mindestens $OD_{600} = 1,5$ erreicht haben. Die Hefen wurden in 300 ml Selektionsmedium überführt ($OD_{600} = 0,2$ bis $0,3$) und für 3 Stunden weiter geschüttelt ($30^\circ C$, 240 rpm). In dieser Zeit sollte $OD_{600} = 0,4$ bis $0,6$ erreicht werden. Die Hefekultur wurde in Falcon-Gefäße überführt und 5 min bei $1000 \cdot g$ abzentrifugiert. Die Pellets wurden in insgesamt 50 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und vereinigt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und die Resuspension des Pellets in 1,5 ml 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5.

Zur Hitzeschock-Transformation wurden 250 μg Plasmid-DNA mit 3 mg Träger-DNA (Sigma, D-9156), 1 ml kompetenten Hefezellen und 6 ml 32 % (w/v) PEG 4000 in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5 in einem Falcon-Gefäß gut gemischt und 30 min im Schüttler bei 200 rpm und $30^\circ C$ inkubiert. Anschließend wurden 700 μl DMSO zugegeben. Zum Hitzeschock wurde der Ansatz für 15 min im $42^\circ C$ -Wasserbad inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 50 ml Selektionsmedium wurden die transformierten Hefezellen für 30 min bei $30^\circ C$ und 200 rpm in einem Erlenmeyer-Kolben geschüttelt, abzentrifugiert ($1000 \cdot g$, 5 min) und in 7 ml TE-Puffer aufgenommen. Der Transformationsansatz wurde in 500 μl -Aliquots auf Selektionsplatten ausgebracht, die mit Parafilm umschlossen wurden. Es folgte eine Inkubation bei $30^\circ C$ für fünf bis sieben Tage.

2.2.12.3 Hefetransformation im kleinen Maßstab

Zur Herstellung von Reporterstämmen für den Yeast-One-Hybrid-Screen sowie Köderstämmen für den Yeast-Two-Hybrid-Screen war es ausreichend, eine Transformation im kleineren Maßstab durchzuführen. Dazu erfolgte die Gewinnung kompetenter Hefezellen exakt wie unter 2.2.12.2 beschrieben.

Zur Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA, 0,1 mg Träger-DNA und 100 µl kompetente Hefezellen eingesetzt. Die zur Herstellung von Reporterstämmen für den Yeast-One-Hybrid-Screen eingesetzte Plasmid-DNA wurde vor der Transformation durch Verdau mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 2.2.12.2, jedoch jeweils nur mit 1/10 der dort angegebenen Volumina durchgeführt. Nach dem Hitzeschock wurden die Hefezellen abzentrifugiert (1000-g, 5 min), in 500 µl TE resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

2.2.12.4 β-Galactosidase-Test

Zur Durchführung von β-Galactosidase-Testversuchen wurde eine Hefekolonie (2 bis 3 mm Durchmesser) in 500 µl H₂O dest. überführt und unter Vortexen resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl punktförmig auf eine Platte mit geeignetem Selektionsmedium gebracht und zwei bis vier Tage bei 30°C inkubiert.

Auf die Platte wurde ein kreisrundes Filterpapier mit 8 mm Durchmesser (Blottingpapier GB002, Schleicher & Schuell) gelegt, mit einer Pinzette leicht angestrichen und anschließend wieder abgezogen. Der Filter mit den anhaftenden Hefekolonien wurde für etwa 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht und bei RT wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zwei- bis dreimal wiederholt. Danach wurde der Filter in einer Petrischale auf ein weiteres Filterpapier gelegt, das bereits mit 3 ml Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 46 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄), 8 µl β-Mercaptoethanol und 50 µl einer 100 mM X-GAL Lösung überschichtet war. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für bis zu acht Stunden.

2.2.12.5 3-Aminotriazol-Wachstumstest

In den Yeast-One- sowie -Two-Hybrid-Versuchen wurde das *HIS3*-Gen als Reporter gen benutzt. 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) wirkt als kompetitiver Hemmstoff des *HIS3*-Genprodukts und kann daher zur Unterdrückung einer Hintergrundexpression des Reportergens eingesetzt werden (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993). Zur Durchführung von 3-AT-Wachstumstests wurde eine Hefekolonie (2 bis 3 mm Durchmesser) in 500 µl H₂O dest. überführt und unter Vortexen resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl auf geeigneten Selektionsplatten mit 5 mM, 15 mM, 30 mM, 45 mM und 60 mM 3-AT ausgestrichen und zwei bis vier Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.12.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde leicht modifiziert nach Hoffman und Winston (1987) durchgeführt. Dazu wurde eine große Hefekolonie in 2 ml des geeigneten Selektionsmediums angeimpft und in einem Reagenzglas für vier Tage bei 30°C und 220 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 % SDS und 2 % Triton X-100 aufgenommen. Zu der Suspension wurden 300 mg Glaskügelchen (Sigma, #G 8772) gegeben und die Mischung für 2 min gevortext. Anschließend wurde mit 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt. Es wurde erneut für 2 min gevortext und danach 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. 3 M NaAc, pH 5,2 aus der wässrigen Phase gefällt und in 50 µl RNase (20 µg/ml in TE) aufgenommen. Der RNase-Verdau wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Zur PCR oder Hitzeschock-Transformation von *E. coli* wurden je 5 µl DNA eingesetzt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Kernproteinextrakte aus Maiskeimlingen

Die Präparation von Kernprotein erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Marzábal *et al.* (1998) und wurde mit etiolierten, vier Tage alten Keimlingen (LG-22) durchgeführt. 50 g Maissprosse wurden in flüssigem Stickstoff zu einem groben Pulver gemörsert und in 100 ml Extraktionspuffer (10 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 250 mM Saccharose, 0,5 % Triton X-100, Protease Inhibitoren (CompleteTM EDTA-free, Roche)) aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min bei 2000-g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml Waschpuffer (10 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 250 mM Saccharose) aufgenommen und erneut wie oben abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Waschpuffer aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 200-300 µl Elutionspuffer (25 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 25 % Glycerol, Protease Inhibitoren (CompleteTM EDTA-free)) resuspendiert. Durch Zugabe von 2 M KCl wurde die Endkonzentration auf 450 mM KCl eingestellt. Elution erfolgte für 30 min unter leichtem

Schütteln bei 4°C. Anschließend wurde der Elutionsansatz für 20 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand für zwei Stunden gegen 1 l 20 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 10 % Glycerol dialysiert. Kernproteinextrakte wurden bei -70°C gelagert.

2.3.2 Gewinnung und Aufreinigung von rekombinantem Protein aus *E. coli*

Zur heterologen Proteinexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) mit dem entsprechenden Konstrukt in den Plasmiden pET-3a His oder pGEX-2T transformiert. Eine transformierte Kolonie wurde in TB (Terrific Broth) mit 100 µg/ml Ampicillin bis OD₆₀₀ = 0,3 bei 37°C angezogen. Zur Proteinexpression im größeren Maßstab wurde zunächst eine Vorkultur angezogen. Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Danach wurde die Bakterienkultur bei 28°C für zwei bis vier Stunden weiter inkubiert. Proteinaufreinigung erfolgte nativ als Affinitätsreinigung über Ni-NTA Agarose (Qiagen) oder Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) nach Vorschriften der Hersteller.

2.3.3 Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) mit 12,5%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel verwendet. Zur Elektrophorese wurden Mighty-Small Apparaturen (Hoefler) eingesetzt. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau (Sigma) gefärbt.

2.4 Naturstoffanalysen

2.4.1 Isolierung von DIMBOA aus Maiskeimlingen

DIMBOA wurde nach Bailey und Larson (1991) und Glawischnig (1997) isoliert. Dazu wurden Blätter ergrüner, neun Tage alter Keimlinge verwendet (100 bis 200 mg Frischgewicht). Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und in 4 Vol. H₂O dest. aufgenommen. Die Suspension wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend mit 3 M HCl auf pH 2 angesäuert. Es folgte eine Inkubation bei 65°C für 5 min. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Extrakt wurde anschließend dreimal mit je 400 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Die drei Fraktionen wurden vereinigt und unter Vakuum bis zur völligen Trockenheit eingedampft. Anschließend wurde das Pellet in 60 µl Methanol aufgenommen und bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

2.4.2 HPLC-Analyse von DIMBOA

Für die HPLC-Analyse wurde das System Gold Nouveau (Beckmann) mit der Bedienungssoftware System Gold V 810 verwendet. Für reversed-phase-Trennungen wurde eine LiChro-CART RP-18-Säule (Merck) verwendet. Die Substanzdetektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Für DIMBOA aus Keimlingsextrakten wurde zunächst 5 min isokratisch mit 10%iger wässriger Essigsäure getrennt. Dann folgte ein kontinuierlicher Gradient über 8 min auf Methanol/10%ige Essigsäure (40/60) und ein weiterer Gradient über 2 min auf 100 % Methanol. Der DIMBOA-Gehalt in den Keimlingsextrakten wurde mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt. Dazu wurde synthetisches DIMBOA eingewogen, das von Dr. D. Sicker (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Bx-Gen-Promotoren

3.1.1 Vergleichende Analyse der Bx-Promotoren

Die DIMBOA-Biosynthesegene werden im Keimling exprimiert und zeigen ein ähnliches Expressionsmuster (Frey *et al.*, 1995; von Rad *et al.*, 2001; Schmäzlin, 2003). Als Arbeitshypothese wurde daher angenommen, dass gemeinsame Transkriptionsfaktoren an der Regulation der DIMBOA-Biosynthese beteiligt sind. Um konservierte *cis*-Elemente in den Bx-

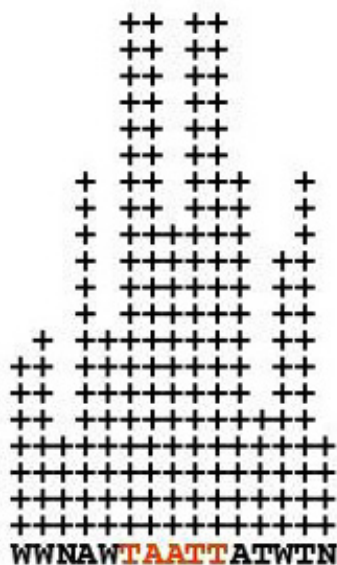


Abb. 3.1: Gewichtungsmatrix des Bx-Bindemotivs. Der rot unterlegte Sequenzbereich stellt den Kern des Bindemotivs dar.

Promotoren zu identifizieren, wurde zunächst eine vergleichende *in-silico*-Promotoranalyse für die zu diesem Zeitpunkt bekannten Gene *Bx1* bis *-5* und *Bx8/9* durchgeführt (Genomatix Software GmbH, München). Für diese Analyse wurden die genannten Promotoren durch ein Fenster von *-300 bp* bis *+20 bp* relativ zur Transkriptionsstartstelle betrachtet. Bei *-300 bp* befindet sich in der Promotorsequenz von *Bx4* eine Transposoninsertion. Es wurde daher angenommen, dass der proximale Promotorbereich dieses Gens auf *300 bp* oberhalb des Transkriptionsstarts beschränkt ist. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden alle anderen Promotorsequenzen im selben Bereich untersucht. Zur vergleichenden Promotoranalyse wurde das Programm CoreSearch (Wolfertstetter *et al.*, 1996)

verwendet. Dieses Programm ist in der Lage, gemeinsame Muster innerhalb eines Datensets in Form von Gewichtungsmatrizen zu definieren.

Für die *Bx*-Promotoren konnte eine Gewichtungsmatrix definiert werden, deren Kern das Motiv TAATT darstellt (Abb. 3.1). Dieses Kernmotiv kommt in allen *Bx*-Promotoren im untersuchten Bereich mindestens einmal vor (Tab. 3.1) und wird im Folgenden *Bx*-Motiv genannt. Für *Bx1* konnten mehrere Motive dieses Typs definiert werden, die zum Teil sehr nahe beieinander liegen oder ineinander übergreifen. In die Analyse wurden auch Motive einbezogen, deren Kernbereiche nicht völlig dem der definierten Matrix entsprechen: Die Matrixähnlichkeit für die identifizierten Motive in den einzelnen Promotoren liegt zwischen 0,835 (*Bx9*) und 0,992 (*Bx1*). Der Maximalwert für diesen Parameter liegt bei 1.

Tab. 3.1: Übersicht über Bindemotive in den *Bx*-Promotoren, die zur definierten *Bx*-Gewichtungsmatrix passen. Die Bindemotive befinden sich im Bereich von 300 bp 5'-wärts der Transkriptionsstartstelle. Da die Suche nach konservierten Motiven nicht mit maximaler Matrixähnlichkeit durchgeführt wurde, sind in dieser Aufstellung auch schlechter konservierte Bindemotive aufgeführt.

Promotor	Position relativ zum Transkriptionsstart	Orientierung (+) oder (-)	Matrix-ähnlichkeit	Sequenz
<i>Bx1</i>	-180 bis -165	(-)	0,840	tataaTATTTtttttaa
	-171 bis -156	(-)	0,879	aacaaTAATTataata
	-95 bis -80	(-)	0,863	attaaTATTTttttttt
	-85 bis -70	(+)	0,930	attaaTATTtagatta
	-61 bis -46	(+)	0,992	ttaatTAATTatattc
<i>Bx2</i>	-219 bis -204	(+)	0,880	cacatTAATTattgga
	-219 bis -204	(-)		tccaaTAATTaattgtg
<i>Bx3</i>	-244 bis -229	(+)	0,852	tctttTATTTatttgt
<i>Bx4</i>	-79 bis -64	(+)	0,950	atgaaTAATTacatct
<i>Bx5</i>	-138 bis -123	(+)	0,969	aaaatTAATTaaatta
<i>Bx8</i>	-139 bis -124	(-)	0,903	aaaatTACTTaaattc
<i>Bx9</i>	-107 bis -92	(-)	0,835	gttagTAATTtattag

3.1.2 Charakterisierung des *Bx*-Bindemotivs

Um Informationen über spezifische Bindeeigenschaften des *Bx*-Motivs zu erhalten, wurden Gelretardationsexperimente mit Proteinextrakten aus Zellkernen von vier Tage alten Maisprossen (LG22) durchgeführt (Abb. 3.2.A). Das *Bx*-Motiv innerhalb des *Bx2*-Promotors wurde als 26 bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment (*Bx2.box*) verwendet (Abb. 3.2.B). Als nicht markierte Kompetitor-DNA wurde neben *Bx2.box* auch das *Bx*-Motiv, wie

es innerhalb des *Bx4*-Promotors (*Bx4*.box) auftritt, eingesetzt. Weiterhin wurde eine mutierte Version von *Bx2*.box verwendet, bei der das Kernelement TAATT in TTTTTT umgewandelt wurde (*Bx2*.mut; Abb. 3.2.B). Im Gelretardationsexperiment zeigen sich neben anderen

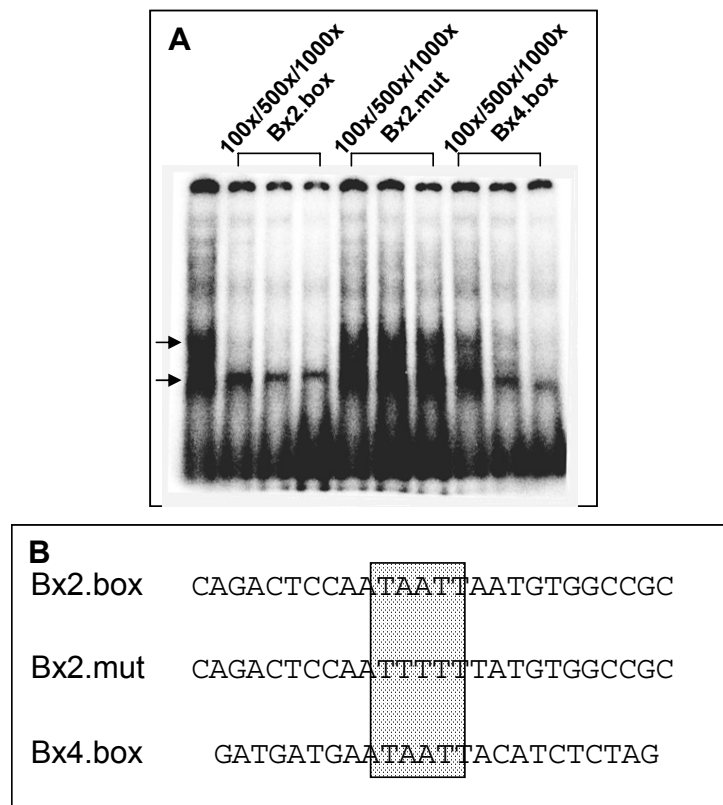


Abb. 3.2: Gelretardationsexperimente mit Proteinkernextrakten aus vier Tage alten Maiskeimlingen. (A): 10 µg Kernprotein wurden mit 1 ng ³²P-markierter Sonde *Bx2*.box für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Komplexe auf einem 8%igen nativen Polyacrylamidgel bei 10 mA. Für Kompetitionen wurde der Kernproteinextrakt 10 min mit Kompetitor-DNA vorinkubiert. Von links nach rechts: Spur 1: ohne Kompetitor; Spuren 2-4: Präinkubation mit 100-, 500- und 1000-fachem Überschuss an *Bx2*.box; Spuren 5-7: Präinkubation mit 100-, 500- und 1000-fachem Überschuss an *Bx2*.mut; Spuren 8-10: Präinkubation mit 100-, 500- und 1000-fachem Überschuss an *Bx4*.box. (B): Darstellung der verwendeten DNA-Motive *Bx2*.box, *Bx2*.mut und *Bx4*.box. Der grau unterlegte Bereich entspricht dem Kern des *Bx*-Bindemotivs, das bei *Bx2*.mut verändert ist. Die umgebenden Bereiche stammen bei *Bx2*.box und *Bx2*.mut aus dem *Bx2*-Promotor, bei *Bx4*.box aus dem *Bx4*-Promotor.

schwächeren Banden zwei starke Protein-DNA-Komplexe bei Inkubation mit *Bx2*.box (Abb. 3.2.A). Konkurrenz mit steigenden Konzentrationen an unmarkierter *Bx2*.box-DNA führt zum gänzlichen Verschwinden des größeren Komplexes. Auch Konkurrenz mit *Bx4*.box führt zum Verlust dieses Komplexes. Im Gegensatz dazu bleibt bei Konkurrenz mit *Bx2*.mut der bestehende *Bx2*.box-Protein-Komplex auch bei 1000-fachem Überschuss des Kompetitors nahezu vollständig erhalten. Dieses Ergebnis zeigt, dass das *Bx*-Bindemotiv von einem Kernprotein spezifisch gebunden wird. Wird beim Kompetitor das Kernelement TAATT durch

TTTTT ersetzt, kompetitiert dieses Motiv nicht mehr um die Komplexbildung. Änderungen in der Umgebung des Kernmotivs (Bx4.box) beim Kompetitor interferieren dagegen nicht mit dessen Bindung an das Kernprotein.

Der untere Protein-DNA-Komplex reagiert dagegen nicht spezifisch auf die Kompetitor-Interaktionen. Dieses Verhalten wäre beispielsweise bei Proteinen zu erwarten, die generell und unspezifisch an AT-reiche Sequenzen binden.

3.2 Isolierung von *ZmHD-Zip1*

3.2.1 Durchführung eines Yeast-One-Hybrid-Screens

Für die Identifizierung von Proteinen, die spezifisch mit dem *Bx*-Bindemotiv interagieren,

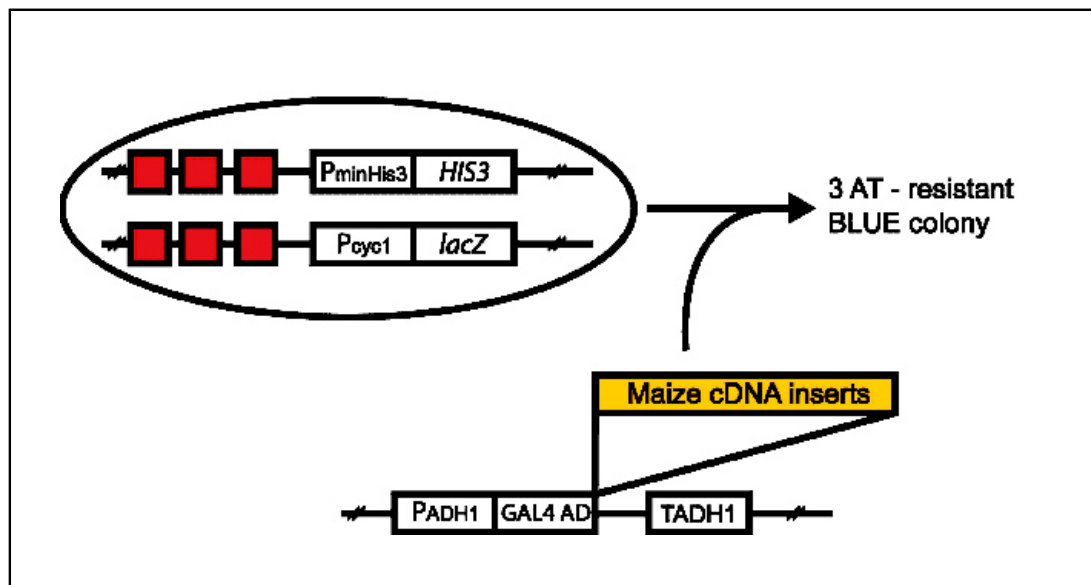


Abb. 3.3: Strategie des Yeast-One-Hybrid-Screens. Eine cDNA-Bank aus zwei Tage alten Maiskeimlingen im Vektor pAD-GAL4-2.1 wurde in den dualen Hefereporterstamm Bx2.box transformiert. cDNA-Inserts werden als Fusionsproteine zur GAL4-Transaktivierungsdomäne (GAL4 AD) exprimiert. P_{ADH1} steht für den Promotor der Alkohol Dehydrogenase1 (*ADH1*), T_{ADH1} steht für den Terminator dieses Gens. Der Reporterstamm Bx2.box trägt die zwei Reportergene *lacZ* und *HIS3*, die jeweils unter der Kontrolle eines Minimalpromotors ($P_{minHis3}$ beziehungsweise P_{cyo1}) stehen. Vor den Minimalpromotor wurden jeweils drei Wiederholungen des Bx2.box-Motivs (rote Kästchen) fusioniert. GAL4 AD-Fusionsproteine, die an Bx2.box binden, wirken als Transkriptionsaktivatoren der Reportergene. Die Zellen können dadurch auf Medium ohne Histidin in der Anwesenheit von 3-AT (einem kompetitiven Hemmstoff des *HIS3*-Genprodukts) wachsen und werden im β -Galactosidase-Test blau.

wurde als Methode der Yeast-One-Hybrid-Screen ausgewählt. Diese Methode wurde erstmals von Wang und Reed (1993) beschrieben und ermöglicht im Hefesystem die Isolierung von Genen aus einer cDNA-Bank, deren Genprodukte an ein bekanntes DNA-Motiv binden.

Zur Herstellung eines dualen Hefereporterstamms wurden zunächst drei Wiederholungen des Bx2.box-Bindemotivs in die Vektoren pHISi-1 und pLacZi eingefügt. Auf die Dreifachwiederholung des Bindemotivs folgt in beiden Konstrukten jeweils ein Minimalpromotor und als Reporter gen das Gen *HIS3* beziehungsweise *lacZ* (Abb. 3.3). Beide Konstrukte wurden in das Genom des Hefestamms YM4271 integriert. Der erhaltene Reporterstamm wurde mit einer cDNA-Bank aus zwei Tage alten Maiskeimlingen (CI31A) im Vektor pAD-GAL4-2.1 transformiert. In der Hefezelle werden die einzelnen cDNAs als Fusionsproteine mit der GAL4-Transaktivierungsdomäne exprimiert (Abb. 3.3).

Von 250 000 Transformanten zeigte eine Hefekolonie eine sehr gute Wachstumsfähigkeit auf Selektionsmedium sowie deutliche Blaufärbung im β -Galactosidase-Test und damit eine signifikante Aktivierung beider Reportergene. Die Isolierung und Charakterisierung des enthaltenen Plasmids zeigte, dass diese Aktivierung durch eine Mais cDNA mit Homologie zu dem bereits bekannten Gen *Oshox6* (AF145730; Meijer *et al.*, 2000) aus *Oryza sativa* vermittelt wird. Dieses Gen gehört zur Klasse I der Homeodomain Leucine-Zipper (HD-Zip)-Transkriptionsfaktoren. Da bislang keine anderen Gene dieser Klasse aus Mais in der Literatur beschrieben worden sind, wurde das neu identifizierte Gen *ZmHD-Zip1* genannt.

3.2.2 Die Bindespezifität von ZmHD-Zip1

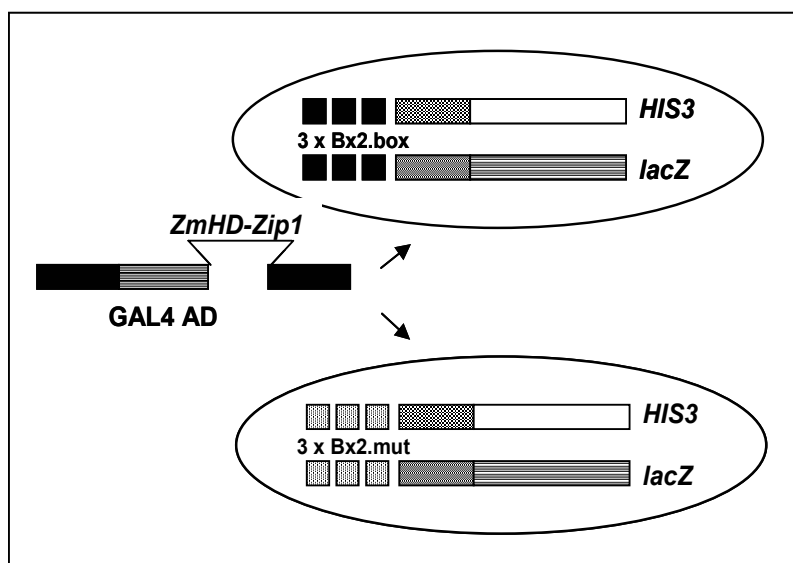


Abb. 3.4: Schema Reformationsexperiment. Die cDNA von *ZmHD-Zip1* als Fusion zur GAL4 – Transaktivierungsdomäne (GAL4 AD) wurde in die dualen Hefereporterstämme Bx2.box und Bx2.mut transformiert. Diese besitzen als Reportergene *HIS3* und *lacZ*, die jeweils unter der Kontrolle eines Minimalpromotors (grauer Balken) stehen. Der Minimalpromotor ist wiederum an drei Wiederholungen der Bindemotive Bx2.box (schwarze Kästchen) beziehungsweise Bx2.mut (grau gepunktete Kästchen) fusioniert.

Um zu verifizieren, dass ZmHD-Zip1 spezifisch an das Bx2.box-Motiv bindet, wurde der Hefereporterstamm Bx2.box erneut mit der cDNA von *ZmHD-Zip1* im Vektor pAD-GAL4-2.1 (pAD-*ZmHD-Zip1*) transformiert. Zur Kontrolle wurde parallel ein Reporterstamm transformiert, der drei Wiederholungen des mutierten Bindemotivs (Bx2.mut) trägt (Abb. 3.4).

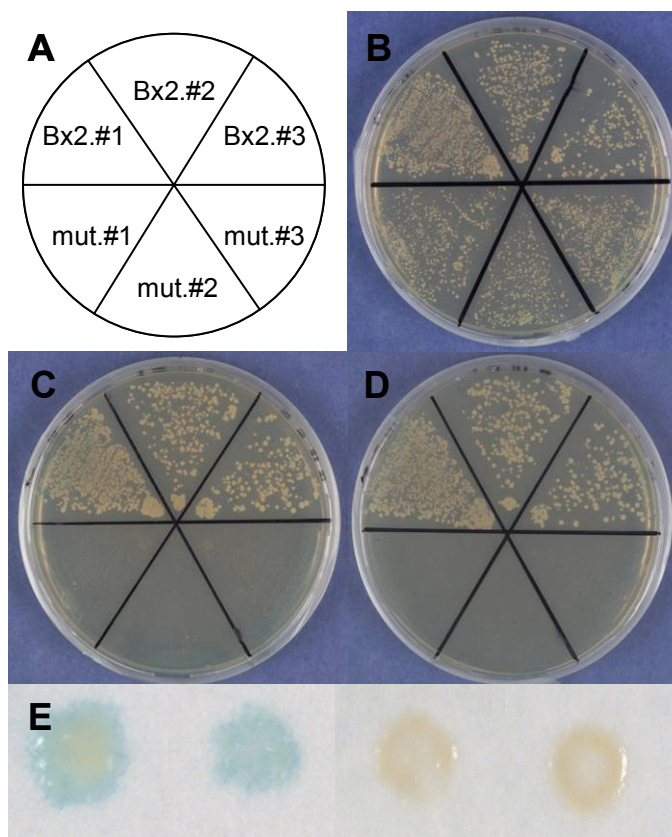


Abb. 3.5: Retransformationsexperiment. Drei unabhängige Transformanden von pAD-*ZmHD-Zip1* in die Reporterstämme Bx2.box und Bx2.mut wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und im β -Galactosidase-Test untersucht. (A): Plattierungsschema. Bx2.#1 bis #3 sind drei unabhängige Transformanden des Hefestamms Bx2.box mit pAD-*ZmHD-Zip1*. Bei mut.#1 bis #3 handelt es sich um drei Transformanden des Hefestamms Bx2.mut mit pAD-*ZmHD-Zip1*. (B): Wachstum der transformierten Hefezellen auf Vollmedium. (C): Wachstum der transformierten Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Histidin und mit 15 mM 3-AT. (D): Wachstum der transformierten Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Histidin und mit 45 mM 3-AT. (E): Ergebnis des β -Galactosidase-Tests. Links: Zwei unabhängige Transformanden von pAD-*ZmHD-Zip1* in den Reporterstamm Bx2.box. Rechts: Zwei unabhängige Transformanden von pAD-*ZmHD-Zip1* in den Reporterstamm Bx2.mut.

Drei unabhängige Transformanden der Reporterstämme Bx2.box und Bx2.mut mit pAD-*ZmHD-Zip1* wurden analysiert (Abb. 3.5): Auf Vollmedium (Abb. 3.5.B) zeigen alle Transformanden gleich gute Wachstumsfähigkeit. Unter Selektionsbedingungen (Abb. 3.5.C und D) wachsen die Transformanden des Bx2.box-Reporters unverändert gut auf Medium ohne Histidin und mit bis zu 45 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT). Der transformierte Reporterstamm mit mutiertem Bindemotiv ist unter diesen Bedingungen nicht mehr wachstumsfähig. Auch im β -Galactosidase-Test (Abb. 3.5.E) zeigen die Transformanden des Bx2.box-Stamms eine deutliche Aktivierung des Reportergens *lacZ*, die bei der mutierten Kontrolle nicht erfolgt. ZmHD-Zip1 bindet damit im Hefesystem spezifisch an das Bindemotiv Bx2.box, nicht aber an dessen mutierte Form.

3.2.3 Isolierung des genomischen und cDNA-Klons von *ZmHD-Zip1*

Da die cDNA von *ZmHD-Zip1* im Yeast-One-Hybrid-Screen nicht in voller Länge gewonnen werden konnte, wurde zusätzlich ein cDNA-Phagenscreen durchgeführt. Dazu wurde eine LambdaZAP cDNA-Bank aus zwei und vier Tage alten Maiskeimlingen (CI31A) verwendet. Zur Gewinnung des genomischen Klons von *ZmHD-Zip1* wurde eine genomische Phagenbank (λ EMBL3A) aus derselben Maislinie eingesetzt. Als Sonde diente in beiden Fällen ein 1100 bp großes PCR-Produkt von pAD-*ZmHD-Zip1*, das mit spezifischen Vektorprimern amplifiziert wurde. Positive Phagen wurden durch Southern-Analyse verifiziert. Der cDNA-Klon wurde durch *in-vivo*-Excision eines Einzelphagen gewonnen. Vom genomischen λ -Phagen-Klon wurde ein *Xba*I-Fragment (6 kb) in den Vektor pBlueskript KS⁺ kloniert. cDNA- und genomische Sequenz (3,7 kb) wurden doppelsträngig sequenziert. Die codierende Sequenz von *ZmHD-Zip1* ist 714 bp lang. Die genomische Sequenz zeigt, dass *ZmHD-Zip1* ein Intron besitzt (Abb. 3.6).

```

CGGCTAGGCTACATCCCTACATGCGTGTGGAGCAAATTA CTATACGGCATGGCGGGCCAATCGGGGAGGGAAAAGTGGG      80
GGTGGAAACGGAAGGATGGAGCGGGGCCAGGAGGGCGCGGGACAGCGCCAGCGGAGGCCAAATCCCTGCACTGTTGACG      160
CCGACAGGTGACGGGACCGGGGTGCGTGTAGTACGTGGTATGCGCCGTTGGCGCTCGTTCCTCCTCGCTCGATCGAGAA      240
TTCGAGATCGAGAAGAGAGGGGCCAGGGCCATGCGCCCATGCGGAGGCGCTGTACGTACGTGCTGCTGGCCGGCCGATG      320
CCTCGACCTCTCGTTCGCTGGCCGGCCATGCCTCGCGTGATATCACCAGCACCACGCGGCCAGCCAGCCGATGCCGGTC      400
GTCGATCGGCTCGTGTTCGATGTCAGGAGGGGCCCATGCCGTGCGGGCCATTCATGTCGGGTGTAGTAGTTTTTTTTTC      480
TATCGGCCCCGCGCCCTCGTCGAGTTTTGGCTGTTTTGCTTCGCTTGCCTTGCCCGACGAAAAGCGATGCGATAAGGCGATAAG      560
TGTGGACGACCTCGTTTTGATCGAATCAGCAGCGCTAGCGCCGGGCTAGGGCTACGGTGCATGCCCTGTGCGAACTTAAT      640
TCGTCTCTACACAATTAAGGCCAAGTTCAAACGTACGTAGATCGTATAAACGACTACTCCGTACATACGTTGGATAAATC      720
CTAGCCTGCCTGATAAAAAACGACAACGTGCCTGCGTACGTAGCGCACTGCACACCCGCCAGTCCGCACCTGAAACGTAATT      800
TTCTACGCATCCAGTCTCTCTGCAAAACTGCACGAAAGGCGAGCGAGCGGCCGCGCCAGCCGGCCTTTATCCGTGCTGCC      880
TTGTCAGGCCGATCAGTCAACGATAGGTAACGTAACGAGACACGAAAAACCCCGCCGAAAGGCAATCGACGGCACGAGT      960
TGATAAGATAGTAACCGGGAAGGATCCAGCGAGGGCCGTAGTAGTAGTTACGGCGGGTTCGGGGTTCAGTGGGCTCGGAAC      1040
GGCCAGGTGTGTGTCGTCGGACTTTTCGATCACACCGTCCAGACAAAAGTCGCCAGCGGCACCGCCGGCGCGGGAAAAG      1120
GGGGCGGACACCTGGATGACATGTGCAGGAGACTCATAACACCGCTGGCTGCCCGGGCTCTCCCGATCCAATTCACCCGC      1200
GCCATCTGCCTGCCTGCCTGCTATCCTTGTTTTGGGTATACAGGCGGGCTCAGGATCACCGGAGATGATACCTGGACAC      1280
TTTCGTGTCTATATGTAGGTGCCGCCAACGCAGCGTCCGACAGTACGAAAGTTCGCGACAGTTCGGCGACCGCGGCGTCT      1360
GCCAGTAAGTACGTACGTACTCTCTTTGAGCAGCCTGAAACAGCAGGTATAGCGCACGCGGAATCGAAGCAACCT      1440
GGTGGTGGTGACTGACACCCCGCGGTTACGCCCGCGGCCCGGACAAATTCAGCTCAACGGCCAACGCGCAGCCC      1520
GCCCCGCGCCCGCGCCGACGACCAGATGACGACGGAGCCCGCGGGCTCGCCAGGTGCTAGCCCTAGCGTAGCCT      1600
GGCGCGGGGACGCGCAGCCACTGCCCGCAGCACGTCCTTCCACCGGAGCCCTCTCCATCTTCCCAACCAACCAAC      1680
CAGCCAGCCCCGCGCACGAGAACACGACGCCACGCGGGCACTTTTTTTTAACTTATCCCGCCTCCGCGCGCCACC      1760
AACCGGGTCCGGGTTCGGCGCTGCCAAGGTGGCAGTGGCCCGACCCGACCGCGCGCGCGCCGTAATAACAAACAAGCAC      1840

```

<u>ACCACTTGCTCGCACGACGCACCGCGGCACGGCACCGGTAAAAATCACTGCGCCGGCGCCGATATATACGTGCACGCCTA</u>	1920
<u>CGCCCAACGGCGTACTGTTGCTCCCGCTTTGGCCGGAGAGAATAGAGGAGCGCCGGGAGAGCTGCGAGCAGAGACGGGG</u>	2000
<u>CGAAGGATAGGGATCGCGAGCGAATTCCCGGCCTCTCTGCCCCGCGCAGCAGCGACCGGGCGGGGCCGCGCGCACAGCG</u>	2080
<u>CTCGCTACCTATAGAGACCCCGGGGGCAGACTGGAGAGGGACAGGCCGCGTGCACGCCACCGCGCTTCATTGGCCAC</u>	2160
<u>GCCGTTGCCATCACGCCGATTAAGTAGCCGATCGATCGCCAGCTCGCTGCCTGTGATCGACCGGGTGCCTGCCTCCG</u>	2240
<u>ATCCTCTTGCTGCCAGCACCTGGCTACTTCAGCCAGCTAGCCAGGTTGAGACCGACTAGCTCGATCTAGCTGCTGAGG</u>	2320
<u>CGTGGCCATGGAGGGCGAGGACGACGGCCCGGAGTGGATGATGGAGTGGGCGGCGGGCGCCACAGGGAAGGAAAAG</u>	2400
M E G E D D G P E W M M E V G G A G A T G K G K	
<u>GCGGCGCGCTGGACAAGAACAAGAAGCGCTTCAGCGAGGAGCAGATCAAGTCCCTCGAGTCCATGTTCCGCACGCAGACC</u>	2480
G G A L D K N K K R F S E E Q I K S L E S M F A T Q T	
<u>AAGCTGGAGCCGCGCCAGAAGCTGCAGCTGGCGCGGGAGCTCGGCCTGCAGCCGCGCCAGGTCCCATCTGGTTCCAGAA</u>	2560
K L E P R Q K L Q L A R E L G L Q P R Q V A I W F Q N	
<u>CAAGCGCGCGCTGGAAGTCCAAGCAGCTGGAGCGCGAGTACTCCGCGCTCCGCGACGACTACGACGCGCTCCTCTGCA</u>	2640
K R A R W K S K Q L E R E Y S A L R D D Y D A L L C	
<u>GCTACGAGTCCCTCAAGAAGGAGAAGCACACGCTCCTCAAGCAGGTCAAGTCCAGGCTCGTCATACCCCTCCATCTCCCGTT</u>	2720
S Y E S L K K E K H T L L K Q	
<u>CGTTCGTTGATGATCCGTTCCACCGCTCTCACTCAGATGATCATCACGCCCTATATATGTCCAGTTCATCTTTTCCCCC</u>	2800
<u>CTAACGATATGATCGACCGATTCTTGACAGCTGGAGAAGCTAGCCGAGATGCTGCACGAGCCGCGGGGCAAGTACAGCGGC</u>	2880
L E K L A E M L H E P R G K Y S G	
<u>AATGCGGACGCCCGCGGGGACGACGCTGCGCTCGGGCGTCCGGCGGCATGAAGGACGAGTTTGACAGACGCCGGGC</u>	2960
N A D A A G A G D D V R S G V G G M K D E F A D A G A	
<u>CGCGCCCTACTCGTCCGAGGGCGGTGGCAAGTTCGCGCACTTCACGGACGACGACGTTGGAGCCCTCTCCGCGCTCGT</u>	3040
A P Y S S E G G G K F A H F T D D D V G A L F R P S	
<u>CTCCGACGCCGAGCGCCGCTGGCTTCACTCGTGGGGCCCGGAGCACCAGCCGTTCCAGTTCCTCCGCTGCTGG</u>	3120
S P Q P S A A G F T S S G P P E H Q P F Q F H S G C W	
<u>CCATCGTCGACGGAGCAGACCTGCAGCAGCTCGCAGTGGTGGAGTTCGAGTCCCTCAGTGAGTGAGTGTCTGAGTGATC</u>	3200
P S S T E Q T C S S S Q W W E F E S L S E .	
<u>GATCGCCAGACCATGCGACGGCGGTTCACTCGGTTCCAAGTTCACACACACACACACGTAAGCAGCAATACGA</u>	3280
<u>GTGGTAGCGGTCATCAGCCCCGAGCGCACGGTGTACATAGCTTTTCACTAGATCGAATTCAGGCATGTCCATCAACAAG</u>	3360
<u>CAGTTTCTTCTGTCATCGATCATCATGCATGCAAAAGAAAATTTTCTCTCCCCCATGTGCTCGCCGCTACCAGATCA</u>	3440
TGTAATCCAGGAACATGTAGAGAAAGATCAAACGAGCTTATAGAGAAGGGAGGTCACATGTTGATCGATCAATGGCTGC	3520
TTTCGTTGTTCTTCTTTTCTCCAAAGACAGTAGAAGAACAGCTAGCTATTAATTAGAGTTTAGAGAGAACATGGAAG	3600
TACAGATTGCAAGAAAAGATGCCGACGAGGATGGAGATTCTTTATAATCGGGACAGGAGCGGAAGGGAATCGAACAGC	3680
AAGGCTCAGTACAGTACGGGGAGGGTACAAGGGAC	3716

Abb. 3.6: Sequenz des genomischen Klon von *ZmHD-Zip1*. Unter der codierenden Sequenz ist die Proteinsequenz angegeben. Die der cDNA entsprechende Sequenz ist unterstrichen.

3.3 Isolierung von ZmHD-Zip2

Es ist bekannt, dass HD-Zip-Proteine als Dimere an DNA binden. Dabei können Homodimere und Heterodimere gebildet werden (Sessa *et al.*, 1993; Meijer *et al.*, 1997; Johannesson *et al.*, 2001). Für die Suche nach Dimerisierungspartnern von ZmHD-Zip1, die im gleichen Gewebe exprimiert werden, wurde als Methode der Yeast-Two-Hybrid-Screen gewählt.

3.3.1 Durchführung eines Yeast-Two-Hybrid-Screens

Der Yeast-Two-Hybrid-Screen wurde erstmals von Fields und Song (1989) beschrieben. Es handelt sich dabei um eine Methode, mit deren Hilfe *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen studiert und Interaktionspartner eines bereits bekannten Proteins identifiziert werden können.

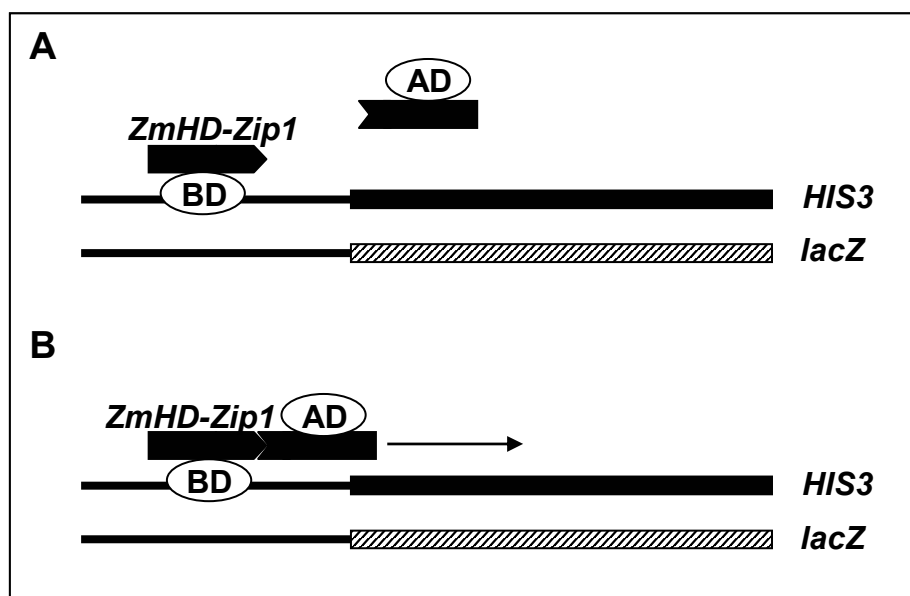


Abb. 3.7: Strategie des Yeast-Two-Hybrid-Screens. (A): Das Fusionsprotein GAL4 BD-ZmHD-Zip1 bindet über die GAL4 Bindedomäne (BD) an deren Zielsequenz im Promotorbereich, der den Reporter-genen *HIS3* und *lacZ* vorgeschaltet ist. (B): Ein Fusionsprotein zur GAL4 Transaktivierungsdomäne (AD) bindet spezifisch an GAL4 BD-ZmHD-Zip1. Dadurch werden GAL4 AD und GAL4 BD in direkte Nähe zueinander gebracht und wirken als funktionelle Einheit, die die Expression der Reporter-gene initiiert.

Zur Herstellung eines Hefeköderstammes wurde die cDNA von *ZmHD-Zip1* im Vektor pBD-GAL4 Cam an die GAL4 DNA-Bindedomäne (GAL4 BD) fusioniert und damit der He-

feststamm YRG-2 transformiert (pBD-ZmHD-Zip1). YRG-2 trägt drei Wiederholungen des GAL4-Bindemotivs, das an die Reportergene *HIS3* beziehungsweise *lacZ* gekoppelt ist. GAL4 BD bindet spezifisch an das entsprechende DNA-Motiv, ist jedoch nicht in der Lage, die Reportergene zu aktivieren (Abb. 3.7.A). Für den Yeast-Two-Hybrid-Screen wurde der Köderstamm mit der gleichen GAL4 AD cDNA-Bank aus zwei Tage alten Maiskeimlingen (CI31A) transformiert, die bereits im Yeast-One-Hybrid-Screen verwendet worden war. Zu einer Aktivierung der Reportergene kann es nur dann kommen, wenn das pBD-Köderprotein mit einem pAD-Fusionsprotein interagiert. GAL4 BD und GAL4 AD wirken dann als funktionelle Einheit und initiieren gemeinsam mit den gebundenen Transkriptionsfaktoren die Transkription der Reportergene (Abb. 3.7.B).

3.3.2 Herstellung des *ZmHD-Zip1*-Köderplasmids

Zur Herstellung eines Köderplasmids wurde zunächst die gesamte cDNA von *ZmHD-Zip1* in den Vektor pBD-GAL4 Cam eingefügt. Im β -Galactosidase-Test zeigte der entsprechende Köderstamm bereits ohne Transformation mit der GAL4 AD cDNA-Bank eine deutliche Blaufärbung und damit Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Um diese Autoaktivierung zu unterbinden, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von pBD-*ZmHD-Zip1* angefertigt (Abb. 3.8).

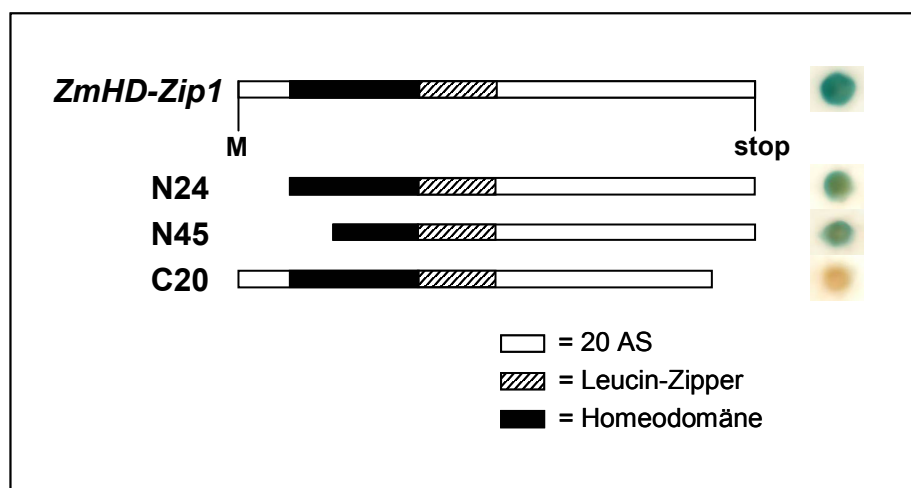


Abb. 3.8: Übersicht über Deletionskonstrukte für pBD-*ZmHD-Zip1*. Rechts neben den einzelnen Konstrukten ist jeweils die Färbung der entsprechenden Hefekolonie im β -Galactosidase-Test dargestellt. Die Homeodomäne ist als schwarzer Balken dargestellt, der Leucin-Zipper als diagonal gestreifter Balken. Konstrukt N24 verfügt über eine Deletion von 24 AS am N-Terminus. Bei Konstrukt N45 betrifft die N-terminale Deletion zusätzlich die erste Helix der Homeodomäne. Konstrukt C20 hat eine Deletion von 20 AS am C-Terminus.

Bei den Konstrukten N24 und N45 handelt es sich um N-terminale Deletionen: Bei N24 wurde ein Bereich von 24 Aminosäuren vor der Homeodomäne deletiert. Bei N45 wurden 45 Aminosäuren am N-Terminus und damit auch die erste Helix der Homeodomäne entfernt. Beide Köderstämme zeigten eine unveränderte Blaufärbung im β -Galactosidase-Test. Für Konstrukt C20 wurde ein Bereich von 20 Aminosäuren am C-Terminus von ZmHD-Zip1 entfernt. Diese Deletion führte zum Verlust der Fähigkeit zur Autoaktivierung des *lacZ*-Reportergens durch das Köderprotein. Konstrukt C20 wurde als Köderplasmid im Yeast-Two-Hybrid-Screen eingesetzt. Der entsprechende Köderstamm wird im Folgenden pBD-ZmHD-Zip1 genannt.

3.3.3 Isolierung der cDNA von *ZmHD-Zip2*

Im Yeast-Two-Hybrid-Screen zeigten von 10^6 Transformanten elf Hefekolonien eine sehr gute Wachstumsfähigkeit auf Selektionsmedium sowie eine deutliche Blaufärbung im β -Galactosidase-Test und damit eine signifikante Aktivierung beider Reportergene. Unter diesen Klonen waren drei cDNAs mit starken Homologien zu unbekanntem Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* und *Homo sapiens*. Bei zwei weiteren Klonen handelte es sich um Homologe zu einem generellen Transkriptionsfaktor aus *Oryza sativa* und einem Symbiose-Protein aus *Arabidopsis*. Außerdem konnte die cDNA des Maisgens *Brittle-1* und ein Gen, das für ein 60S ribosomales Protein L39 codiert, identifiziert werden. Eine cDNA zeigte starke Ähnlichkeit zu einem RAD23-Protein aus *Lycopersicon esculentum*.

Bei dreien der identifizierten Klone handelte es sich um verschieden lange Versionen einer cDNA, die eine starke Homologie zu dem bereits charakterisierten Gen *Oshox5* (AF145729; Meijer *et al.*, 2000) aus Reis aufweist. Das isolierte Gen gehört ebenfalls zu den *HD-Zip*-Genen und wurde *ZmHD-Zip2* genannt. Die cDNA-Sequenz von *ZmHD-Zip2* (Abb. 3.9) hat eine Länge von 1147 bp; 819 bp entsprechen der codierenden Sequenz. Das Gen *ZmHD-Zip2* wurde im Folgenden näher charakterisiert.

Um das Ergebnis des Yeast-Two-Hybrid-Screens für *ZmHD-Zip2* zu verifizieren, wurde dessen cDNA als Fusion zur GAL4 AD (pAD-*ZmHD-Zip2*) in den Köderstamm retransformiert. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pAD-WT (Stratagene), welches das Fragment C des Lambda cI Repressors als Fusion zu GAL4 AD exprimiert. Je zwei unabhängige Transformanten des Köderstamms pBD-ZmHD-Zip1 mit pAD-*ZmHD-Zip2* und dem Kon-

trollplasmid pAD-WT wurden analysiert (Abb. 3.10). Auf Medium ohne Selektion zeigen alle Transformanden gute Wachstumsfähigkeit (Abb. 3.10.B).

```

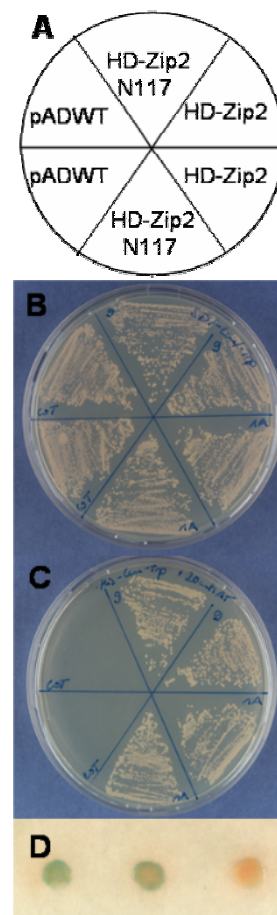
AGAATCAGCATGGATCCGAGCGCGGTCACTTCGACTCTGGCGGCGCGCGGGGGCGGCGCGCAGATGCTGCTCTT      80
      M D P S A V S F D S G G A R R G G G A Q M L L F
CGGCGGCGGAGGCAGCGCCAACAGCAACGGCTTCTTCGAGGTGTTCCGATGGCGGTCTCTGGGCATGGACGACGCGACGC      160
      G G G G S A N S N G F F R G V P M A V L G M D D A T
GCGTGGGCAAGCGGCCCTTCTTCACGACACACGAGGAGCTCCTAGAGGAGGAGTACTACGACGAGCAGGCGCCGGAGAAG      240
      R V G K R P F F T T H E E L L E E E Y Y D E Q A P E K
AAGCGCCGACTGACGGCGGAGCAGGTGCAGCTGCTAGAGCGGAGCTTCAAGAAGAGAACAAGCTGGAGCCGGAGCGCAA      320
      K R R L T A E Q V Q L L E R S F E E E N K L E P E R K
GACCGAGCTGGCTCGCCGCTGGGGATGGCGCCCCGCCAGGTAGCTGTTTGGTTCCAGAACCGCCGCGCGCTGGAAGA      400
      T E L A R R L G M A P R Q V A V W F Q N R R A R W K
CCAAGCAACTCGAGACCGACTATGACCGCCTTAAGGCTGCTTACGACGCACTCGCCGCCGACCACCAGGGCTCCTGGCC      480
      T K Q L E T D Y D R L K A A Y D A L A A D H Q G L L A
GACAACGATAACCTCCGGGCACAGGTGATCTCCCTGACGAGAAGCTGCAAGGCAAGGAGACATCCCCGTGAGCAACCAC      560
      D N D N L R A Q V I S L T E K L Q G K E T S P S A T T
TGCTGCCCAAGAGGTGACCCAGCCAGACGAACACACCGCTGTGTGAGGCACGGAAGAAGTCTGGCGCAGCAGCTCAAGG      640
      A A Q E V D Q P D E H T A V S G T E E L L A Q Q L K
ACAACCTCCACAGCAGCGGCGACTGCACTGGCCATGGCACCCCTCTCTTCGGAAGAAGACGACGGTGGCGTGGTCAGTGAC      720
      D N L H S S G D C T G H G T L S S E E D D G G V V S D
GAGGGCTCGAGCTTCGCTCTCCCGATGCCATGTTGCTGCGGGTTACCCACCATGGCGCGAGGAGGTGCAGCTGGC      800
      E G C S F A L P D A M F A A G F T H H G A E E V Q L A
CAACTGGACATCCATGTTCTGGAAGTATGATCAGCGGATGGATGCATCCAAGTGCAAAGATCGGATCTCTCTCGTCTCAA      880
      N W T S M F W N .
CCCTTTTCTGCAGCATATAAATTACCGTGTAAATTATGTGCCGTCCGATGTTTTTAAGTGCTCATGTTTTAAGTTTGTGT      960
TTTTTTGAAGTTTTTGTATGTTTCATATATAATAATGTGCTTCGAACATGACACTCGAAAAGTTGAATAATTGGACATG      1040
TCGACCTGCTGTGCACTAGCAGCTGGCATGTTTTGTTAGGGCTGTTTTGGGAAGTTCATTTTTCAAAGAATTCAAAAAA      1120
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1147

```

Abb. 3.9: cDNA-Sequenz von *ZmHD-Zip2*. Unter der codierenden Sequenz ist die Proteinsequenz angegeben.

Unter Selektionsbedingungen ohne Histidin mit 15 mM 3-AT (Abb. 3.10.C) sind Hefen, die mit dem Kontrollplasmid pAD-WT transformiert wurden, nicht mehr in der Lage zu wachsen. Hefen, die mit pAD-*ZmHD-Zip2* transformiert worden sind, zeigen dagegen weiterhin gute Wachstumsfähigkeit. Dieses Ergebnis wird durch den β -Galactosidase-Test (Abb. 3.10.D) bestätigt: Hefen, die mit pAD-*ZmHD-Zip2* transformiert worden sind, zeigen eine deutliche Blaufärbung, die bei der Kontrolle nicht zu beobachten ist. Das gleiche Ergebnis konnte mit einer verkürzten Version der cDNA von *ZmHD-Zip2* erzielt werden, die ebenfalls im Yeast-Two-Hybrid-Screen identifiziert wurde und im N-terminalen Bereich eine Deletion von 360 bp aufweist (pAD-*ZmHD-Zip2*.N117). Dies entspricht in der Proteinsequenz einem Verlust von 117 Aminosäuren. Damit ist ein Großteil der Homeodomäne (44 Aminosäuren) deletiert, der Leucin-Zipper aber vollständig erhalten. Es handelt sich bei *ZmHD-Zip2* also um ein Protein, das in der Lage ist, mit *ZmHD-Zip1* Dimere zu bilden.

Abb. 3.10: Retransformationsexperiment. Je zwei unabhängige Transformanden des Köderstammes pBD-*ZmHD-Zip1* mit den Plasmiden pAD-*ZmHD-Zip2*, pAD-*ZmHD-Zip2*.N117 und pAD-WT wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und im β -Galactosidase-Test untersucht. (A): Plattierungsschema. pADWT: Transformanden des Stammes pBD-*ZmHD-Zip1* mit dem Kontrollplasmid pAD-WT. HD-*Zip2* N117: Transformanden des Stammes pBD-*ZmHD-Zip1* mit Plasmid pAD-*ZmHD-Zip2*.N117. In diesem Plasmid ist die cDNA von *ZmHD-Zip2* am N-Terminus um 360 bp verkürzt, was in der Proteinsequenz zu einem Verlust von 117 AS führt. HD-*Zip2*: Transformanden des Stammes pBD-*ZmHD-Zip1* mit Plasmid pAD-*ZmHD-Zip2*. (B): Wachstum der transformierten Hefezellen auf Vollmedium. (C): Wachstum der transformierten Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Histidin und mit 15 mM 3-AT. (D): Ergebnis des β -Galactosidase-Tests. Von links nach rechts: Köderstamm pBD-*ZmHD-Zip1* transformiert mit pAD-*ZmHD-Zip2*, pAD-*ZmHD-Zip2*.N117 und pAD-WT.



3.4 Vergleichende Charakterisierung von ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2

3.4.1 Sequenzvergleich

HD-Zip-Proteine konnten bereits in verschiedenen Gattungen der Angiospermen (Schna and Davis, 1992; Meijer *et al.*, 1997; Ingram *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2002; Ohashi-Ito *et al.*, 2002), aber auch in Moosen (Sakakibara *et al.*, 2001) und Farnen (Aso *et al.*, 1999) charakterisiert werden. Aufgrund von Sequenzkriterien können *HD-Zip*-Gene in vier verschiedene Klassen, HD-Zip I bis IV (Sessa *et al.*, 1994) unterteilt werden.

ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2 wurden als Homologe zu Oshox6 und Oshox5 aus Reis identifiziert und können wie diese der Klasse I der HD-Zip-Proteine zugeordnet werden. In *A. thaliana* besteht für ZmHD-Zip1 die stärkste Homologie zu ATHB-7 (32,8 % Identität), für ZmHD-Zip2 zu ATHB-1 (37,5 % Identität). Bislang sind bei Reis sieben HD-Zip-Proteine charakterisiert worden (Meijer *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 2000). Oshox1, -2, -3 und -7 gehören zur Klasse II, während Oshox4, -5 und -6 der Klasse I der HD-Zip-Proteine zugeordnet werden. Abb. 3.11.A zeigt einen Vergleich der Proteinsequenzen aller Oshox-Proteine mit ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2 im Bereich der Homeodomäne und des Leucin-Zippers. Innerhalb der Homeodomäne weisen Klasse-I- und Klasse-II-HD-Zip-Proteine charakteristische Unterschiede auf. So besitzen Proteine der Klasse I auf Position 46 der Homeodomäne einen Alanin- und auf Position 56 einen Tryptophanrest. Die gleichen Positionen werden bei Klasse-II-HD-Zip-Proteinen von einem Glutamat- beziehungsweise einem Threoninrest besetzt. Weiterhin schließt bei Oshox4 bis -6 und ZmHD-Zip1 und -2 der Leucin-Zipper mit dem ersten Leucin-Rest unmittelbar an die Homeodomäne an, während bei den Klasse-II-HD-Zip-Proteinen (Oshox1 bis -3 und -7) der Leucin-Zipper erst sieben Aminosäurereste später beginnt. Besonders auffallend ist die starke Ähnlichkeit zwischen ZmHD-Zip1 und Oshox6 beziehungsweise ZmHD-Zip2 und Oshox5 (Abb. 3.11.B). Die Proteinsequenzen von ZmHD-Zip1 und Oshox6 weisen eine Identität von 70,8 % auf, diese liegt für ZmHD-Zip2 und Oshox5 bei 61,1 % (Tab. 3.2). Die Identität der Oshox-Proteine untereinander ist dagegen mit Werten zwischen 17,1 % (Oshox1/Oshox5) und 40,2 % (Oshox3/Oshox7) deutlich geringer. Dies zeigt, dass die Proteine außerhalb der stark konservierten Homeodomäne sehr unterschiedlich sind. Die Identität der Proteinsequenzen von ZmHD-Zip1 und -2 liegt bei 27,7 %.

A

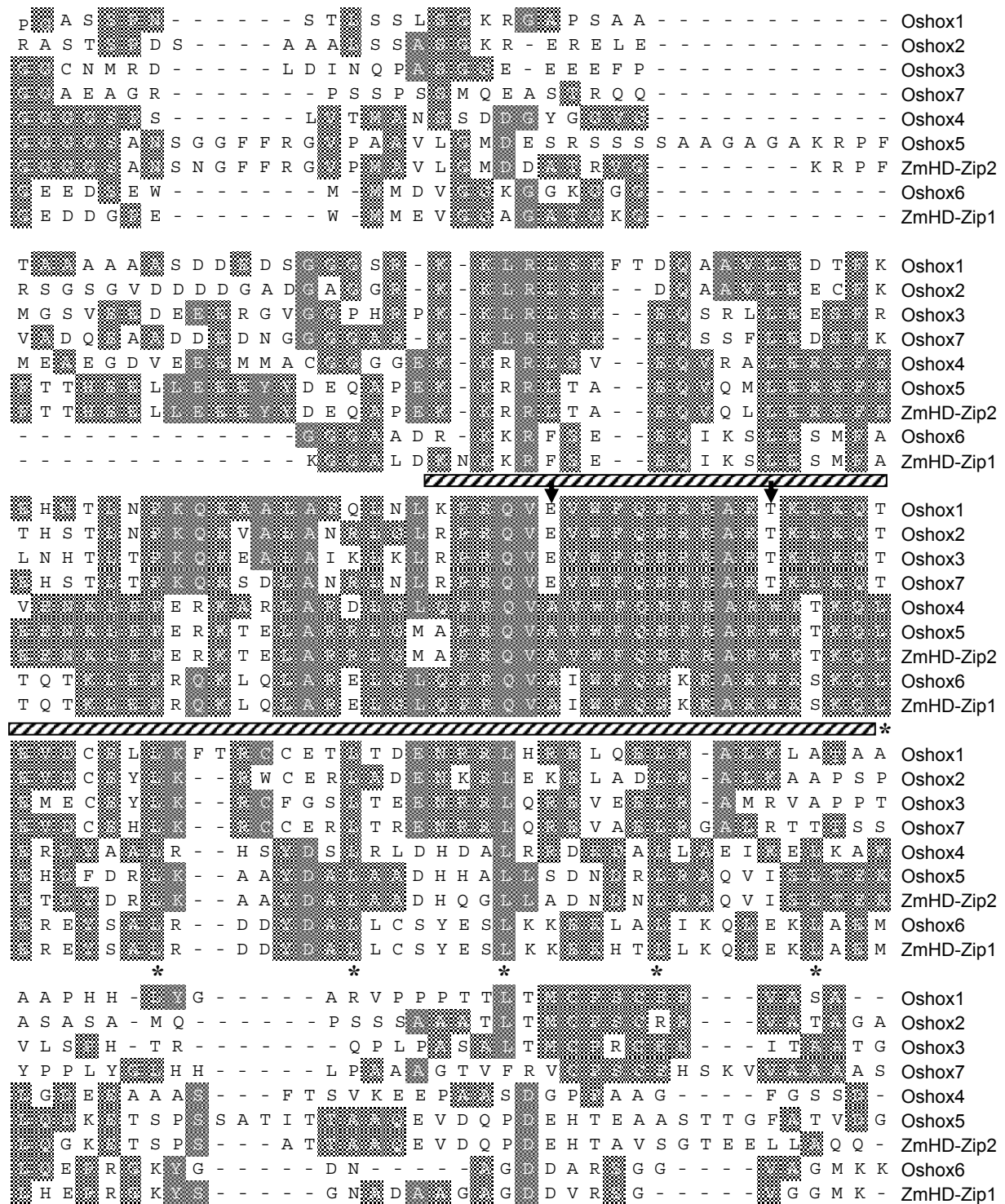


Abb. 3.11: (A): Vergleich der Proteinsequenzen von Oshox1 bis -7 mit ZmHD-Zip1 und -2. Oshox1, -2, -3 und -7 gehören zur Klasse II der HD-Zip-Proteine (oben). Oshox4 bis -6 und ZmHD-Zip1 und -2 gehören zur Klasse I der HD-Zip-Proteine (unten). Diagonal gestreifte Balken unter der Sequenz kennzeichnen die Homeodomäne; Sternchen unter der Sequenz kennzeichnen Leucin-Reste des Leucin-Zippers. Die Aminosäurepositionen 46 und 56 der Homeodomäne sind durch Pfeile gekennzeichnet. Identische AS sind grau unterlegt.

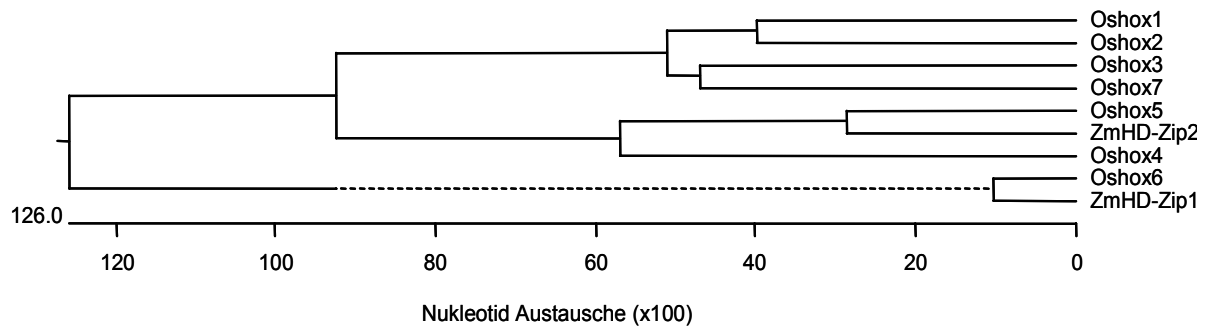
B

Abb. 3.11: (B): Phylogenetischer Stammbaum für Oshox1 bis -7 und ZmHD-Zip1 und -2. Der Stammbaum wurde aufgrund eines Vergleichs der Proteinsequenzen mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt.

Tab. 3.2: Darstellung der Identität der Proteinsequenzen von Oshox1 bis -7 und ZmHD-Zip1 und -2. Die Identitäten wurden mit Hilfe des Programms ClustalW berechnet und sind in % angegeben.

Oshox							ZmHD-Zip		
1	2	3	4	5	6	7	1	2	
100	35,2	38,9	23,1	17,1	21,7	38,7	18,5	12,5	Oshox1
	100	36,2	23,8	20,9	19,3	35,3	19,7	20,9	Oshox2
		100	28,8	24,9	24,1	40,2	23,6	24,5	Oshox3
			100	35,7	34,0	28,9	32,4	33,2	Oshox4
				100	31,1	25,9	28,2	61,1	Oshox5
					100	27,4	70,8	31,6	Oshox6
						100	20,2	23,7	Oshox7
							100	27,7	ZmHD-Zip1
								100	ZmHD-Zip2

3.4.2 Dimerisierungseigenschaften von ZmHD-Zip1 und ZmHD-Zip2

Es konnte im Yeast-Two-Hybrid-System bereits gezeigt werden, dass ZmHD-Zip2 mit ZmHD-Zip1 Heterodimere ausbildet, wenn letzteres als Köder angeboten wird (Abb. 3.10). Im Folgenden sollte geklärt werden, ob diese Interaktion auch stattfindet, wenn ZmHD-Zip2 als Köder angeboten wird. Weiterhin wurde untersucht, ob beide Proteine in diesem System auch Homodimere ausbilden können. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein geeignetes

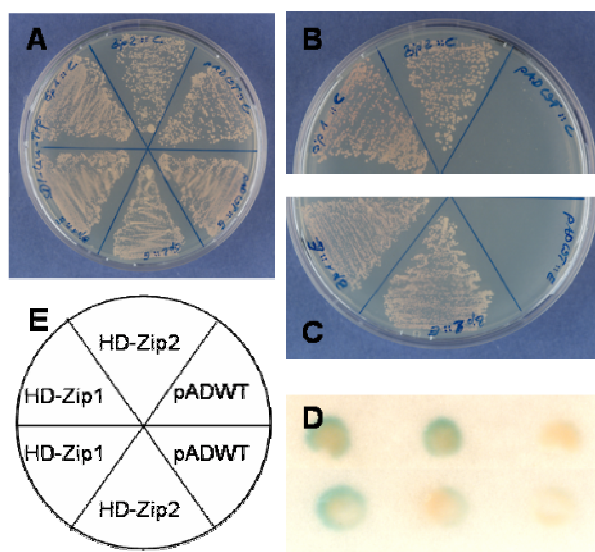


Abb. 3.12: Dimerisierungseigenschaften von ZmHD-Zip1 und -2. Die Hefeköderstämme pBD-ZmHD-Zip1 und -2 wurden jeweils mit den Plasmiden pAD-ZmHD-Zip1, -2 und pAD-WT (Kontrolle) transformiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. (A): Wachstum auf Vollmedium. (B): Wachstum auf Selektionsmedium ohne Histidin und mit 15 mM 3-AT. (C) Wachstum auf Selektionsmedium ohne Histidin und mit 5 mM 3-AT. (D): Ergebnis des β -Galactosidase-Tests. Obere Reihe: Transformanden des Köderstammes pBD-ZmHD-Zip1. Untere Reihe: Transformanden des Köderstammes pBD-ZmHD-Zip2. Transformierte Plasmide (von links nach rechts): pAD-ZmHD-Zip1, pAD-ZmHD-Zip2, pAD-WT. (E): Plattierungsschema. Obere Plattenhälfte: Trans-

formanden des Köderstammes pBD-ZmHD-Zip1. Untere Plattenhälfte: Transformanden des Köderstammes pBD-ZmHD-Zip2. HD-Zip1: Transformiert mit pAD-ZmHD-Zip1, HD-Zip2: Transformiert mit pAD-ZmHD-Zip2, pADWT: Transformiert mit pAD-WT.

ZmHD-Zip2-Köderplasmid (pBD-ZmHD-Zip2) hergestellt, das nicht in der Lage ist, die verwendeten Reporterengenkonstrukte selbständig zu aktivieren. Wie bei ZmHD-Zip1, führte auch bei ZmHD-Zip2 eine C-terminale Deletion von 40 Aminosäuren zum Verlust der Aktivierungsdomäne. Die Köderstämme pBD-ZmHD-Zip1 und -2 wurden jeweils in verschiedenen Ansätzen mit den Plasmiden pAD-ZmHD-Zip1 und -2 transformiert. Zusätzlich wurden beide Stämme mit dem Kontrollplasmid pAD-WT (siehe Kapitel 3.3.3) transformiert. Auch in diesem Versuch wurde die Ausbildung Histidin-autotropher, *lacZ*-positiver Hefekolonien als Indikation für die Dimerisierung der jeweiligen BD- und AD-Fusionsproteine gewertet (vgl. Abb. 3.7). Mit ZmHD-Zip1 als Köderprotein ist dies sowohl bei AD-ZmHD-Zip1 als auch bei AD-ZmHD-Zip2 der Fall (Abb. 3.12): Die Transformanden zeigen unter selektiven Bedingungen ohne Histidin mit 15 mM 3-AT gute Wachstumsfähigkeit und deutliche Blaufärbung im β -Galactosidase-Test (Abb. 3.12.B und D). Das Gleiche gilt auch bei Verwendung von

ZmHD-Zip2 als Köder (Abb. 3.12.C): Auch dieses Protein bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit ZmHD-Zip1 aus. Die entsprechenden Transformanten sind auf Selektionsmedium ohne Histidin mit 5 mM 3-AT wachstumsfähig und zeigen Blaufärbung im β -Galactosidase-Test (Abb. 3.12.D). Transformanten beider Köderstämme mit dem Kontrollplasmid pAD-WT zeigten unter Selektionsbedingungen kein Wachstum und keine Blaufärbung im β -Galactosidase-Test.

3.4.3 DNA-Bindeigenschaften im Hefesystem

ZmHD-Zip1 wurde als Protein identifiziert, das im Hefesystem spezifisch an das Motiv

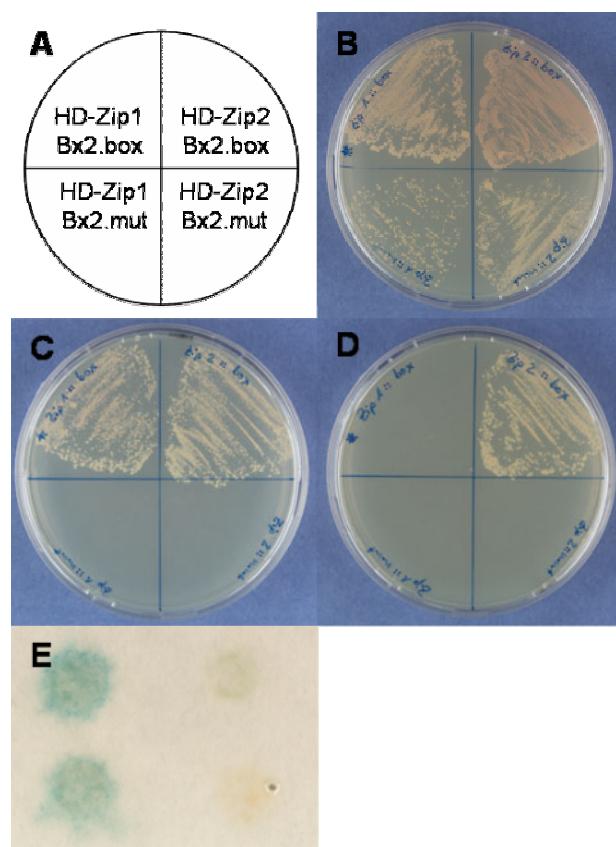


Abb. 3.13: Vergleich der DNA-Bindeigenschaften von ZmHD-Zip1 und -2 im Yeast-One-Hybrid-System. Die Plasmide pAD-ZmHD-Zip1 und pAD-ZmHD-Zip2 wurden in die Hefereporterstämme Bx2.box und Bx2.mut transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. (A): Plattierungsschema. HD-Zip1 Bx2.box und HD-Zip2 Bx2.box (oben): Transformanten des Bx2.box-Reporterstamms mit pAD-ZmHD-Zip1 beziehungsweise pAD-ZmHD-Zip2. HD-Zip1 Bx2.mut/HD-Zip2 Bx2.mut (unten): Transformanten des Bx2.mut-Reporterstamms mit pAD-ZmHD-Zip1 beziehungsweise pAD-ZmHD-Zip2. (B): Wachstum auf Medium ohne Selektion. (C): Wachstum auf Medium ohne Histidin und mit 30 mM 3-AT. (D): Wachstum auf Medium ohne Histidin und mit 60 mM 3-AT. (E): Ergebnis des β -Galactosidase-Tests. Links oben: Bx2.box-Stamm transformiert mit pAD-ZmHD-Zip1. Links unten: Bx2.box-Stamm transformiert mit pAD-ZmHD-Zip2. Rechts oben: Bx2.mut-Stamm transformiert mit pAD-ZmHD-Zip1. Rechts unten: Bx2.mut-Stamm transformiert mit pAD-ZmHD-Zip2.

Bx2.box bindet. ZmHD-Zip2 wurde dagegen im Yeast-Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von ZmHD-Zip1 gefunden. Da HD-Zip-Klasse-I-Proteine über ähnliche DNA-Bindepräferenzen (Johannesson *et al.*, 2001) verfügen, sollte im Folgenden getestet werden, ob ZmHD-Zip2 ebenfalls spezifisch an Bx2.box bindet. Zu diesem Zweck wurden pAD-ZmHD-Zip1 und pAD-ZmHD-Zip2 in die Hefereporterstämme Bx2.box und Bx2.mut transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Unter nicht selektiven Bedingungen sind al-

le Transformanden wachstumsfähig (Abb. 3.13.B). Unter Selektionsbedingungen ohne Histi-
din und mit 30 mM 3-AT (Abb. 3.13.C) wachsen Hefen des Reporterstammes Bx2.box, die
mit pAD-*ZmHD-Zip1* oder pAD-*ZmHD-Zip2* transformiert worden sind, gleich gut. Wird der
Selektionsdruck weiter auf 60 mM 3-AT erhöht (Abb. 3.13.D), zeigen nur noch Transforman-
den von Bx2.box mit pAD-*ZmHD-Zip2* Wachstumsfähigkeit. Dies lässt auf eine sehr starke
Aktivierung des Reportergens *HIS3* durch *ZmHD-Zip2* schließen. Transformanden des
Bx2.mut-Reporters zeigen unter selektiven Bedingungen kein Wachstum. Im β -
Galactosidase-Test (Abb. 3.13.E) zeigen beide Transformanden des Bx2.box-Reporters eine
deutliche Blaufärbung, die bei den Transformanden des Bx2.mut-Hefestammes ausbleibt.
Sowohl *ZmHD-Zip1* als auch *ZmHD-Zip2* sind im Hefesystem in der Lage, spezifisch an das
Bx2.box-Motiv zu binden. Diese Bindung findet nicht statt, wenn eine Mutation im Bindemo-
tiv vorliegt.

3.4.4 DNA-Bindeigenschaften *in vitro*

3.4.4.1 Gewinnung von rekombinantem *ZmHD-Zip1*- und -2-Protein

Zur Gewinnung von rekombinantem *ZmHD-Zip1* (r*ZmHD-Zip1*) aus *E. coli* wurde die cDNA

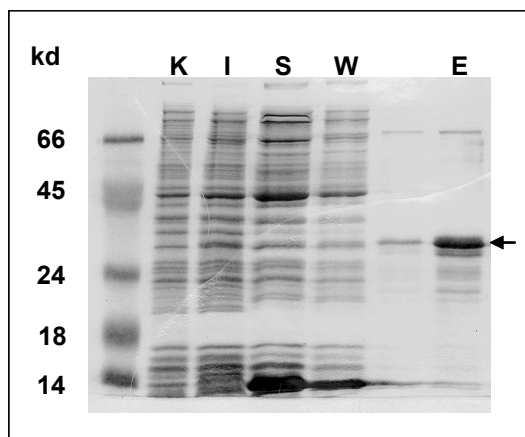


Abb. 3.14: Reinigung von r*ZmHD-Zip1* aus *E. coli* BL21 (DE3). K: nicht induzierte Kontrolle; I: Induktion mit 1 mM IPTG; S: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA Agarose; W: Waschschrift; E: Elution mit 100 mM Imidazol. Der Pfeil kennzeichnet die Bande von r*ZmHD-Zip1* mit einem berechneten Molekulargewicht von 27 kd.

von *ZmHD-Zip1* in den Vektor pET-3a His kloniert (siehe Kapitel 2.2.7.3). Das rekombinante Protein r*ZmHD-Zip1* besitzt am C-Terminus einen 6x His-tag und konnte daher über eine Nickel (Ni)-Affinitätssäule aufgereinigt werden. r*ZmHD-Zip1* hat ein Molekulargewicht von 27 kd und konnte mit 100 mM Imidazol von der Ni-NTA-Agarose-Säule eluiert werden (Abb. 3.14).

rZmHD-Zip2 wurde als Fusion zu einer N-terminalen GST-Domäne im Vektor pGEX-2T (siehe ebenfalls Kapitel 2.2.7.3) in *E. coli* exprimiert und über Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt. Das Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von 56 kd und wurde mit 100 mM Glutathion eluiert (Abb. 3.15).

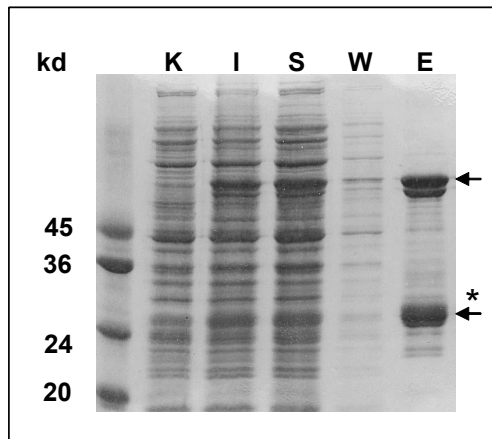


Abb. 3.15: Reinigung von rZmHD-Zip2 aus *E. coli* BL21 (DE3). K: nicht induzierte Kontrolle; I: Induktion mit 1 mM IPTG; S: Überstand nach Inkubation mit Glutathion Sepharose 4B; W: Waschschrift; E: Elution mit 100 mM Glutathion. Der obere Pfeil kennzeichnet die Bande von rZmHD-Zip2 mit einem berechneten Molekulargewicht von 56 kd. Der Pfeil mit Sternchen kennzeichnet ein Protein, das ebenfalls spezifisch eluiert wird und mit einem Molekulargewicht von 26 kd der Größe von reinem Glutathion entspricht.

3.4.4.2 Ermittlung des bevorzugten Bindemotivs für rZmHD-Zip1

Um die Sequenz des bevorzugten Bindemotivs für rZmHD-Zip1 zu bestimmen, wurde eine PCR-gestützte Bindestellen-Selektion durchgeführt. Dazu wurde das DNA-Fragment BSS.Bx2.N11 mit einer Länge von 49 bp eingesetzt, das eine zentrale Zufallssequenz von 11 bp beinhaltet (Abb. 3.16.A). Die Randsequenzen entsprechen der Umgebung des Bx2.box-Motivs innerhalb des *Bx2*-Promotors. rZmHD-Zip1 wurde über den 6x His-tag an

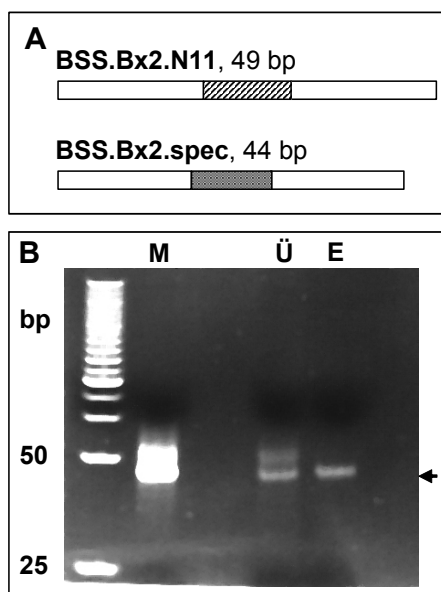


Abb. 3.16: Vorexperiment zur Bindestellen-Selektion von rZmHD-Zip1. (A): Verwendete DNA-Fragmente. BSS.Bx2.N11 besitzt eine zentrale Zufallssequenz von 11 bp (diagonal gestreift). BSS.Bx2.spec besitzt eine Kernsequenz (grau), die der von Bx2.box entspricht. Die Randbereiche (weiß) der beiden DNA-Fragmente sind gleich. (B): Eine Mischung aus den DNA-Fragmenten BSS.Bx2.N11 und BSS.Bx2.spec. (je 750 ng) wurde mit 3 µg rZmHD-Zip1 inkubiert und das spezifisch gebundene Fragment eluiert. M: Mischung von BSS.Bx2.N11 und BSS.Bx2.spec vor Inkubation mit rZmHD-Zip1 (je 250 ng); Ü: 10 µl des Überstands (1/20 Vol.) nach Inkubation; E: Elution der DNA mit 1 M KCl. Es wurden 10 µl des Eluats aufgetragen (1/20 Vol.). Die eluierte Bande ist mit einem Pfeil markiert.

magnetische Nickel-Kügelchen gebunden und konnte so gezielt dem Ansatz zugefügt oder entzogen werden. Um zu testen, ob rZmHD-Zip1 in der Lage ist, zwischen einem spezifi-

schen Bindemotiv und einer zufälligen Sequenz zu unterscheiden, wurde das rekombinante Protein zunächst mit einer Mischung aus BSS.Bx2.N11 und einem zweiten Fragment, BSS.Bx2.spec., inkubiert (Abb. 3.16.A). Dieses zweite DNA-Fragment besitzt die gleichen Randsequenzen wie BSS.Bx2.N11, der Kernbereich entspricht jedoch dem des Bx2.box-Motivs. In ihrer Größe unterscheiden sich die Fragmente um 5 bp. Die Mischung beider DNA-Fragmente wurde mit rZmHD-Zip1, das an magnetische Nickel-Kügelchen gebunden war, inkubiert (Abb. 3.16.B). Nach einer Inkubation von 30 min sind beide Fragmente im Überstand

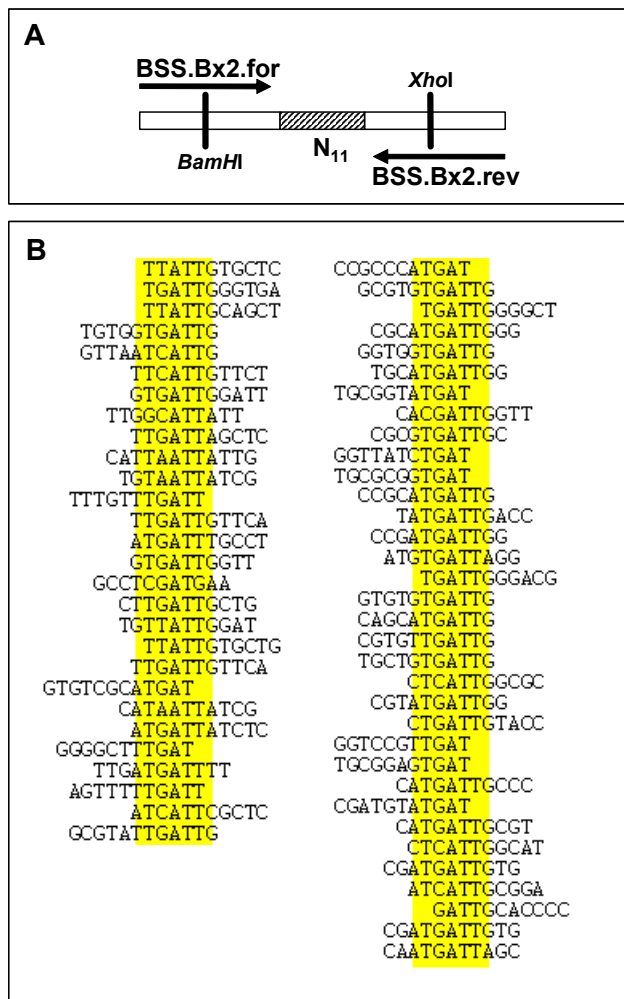


Abb. 3.17: Bindestellen-Selektion für rZmHD-Zip1. (A): Dargestellt ist das DNA-Fragment BSS.Bx2.N11, das zur Bindestellen-Selektion eingesetzt wurde. Die Primer BSS.Bx2.for und BSS.Bx2.rev sind spezifisch zu den Randsequenzen von BSS.Bx2.N11. Diese enthalten außerdem spezifische Restriktionsstellen für die Enzyme *Bam*HI und *Xho*I. (B): Sequenzvergleich der selektierten Bindestellen für rZmHD-Zip1 in zwei unabhängigen Experimenten (Links: Experiment 1; Rechts: Experiment 2). Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt. Der konservierte Bereich ist unterlegt.

vorhanden. Bei der DNA, die von den Protein-bemantelten magnetischen Kügelchen eluiert wurde, handelt es sich um BSS.Bx2.spec. Damit konnte gezeigt werden, dass rZmHD-Zip1 innerhalb des Versuchssystems spezifisch an dieses Bindemotiv bindet.

Für die Bindestellen-Selektion (siehe Kapitel 2.2.9) wurde rZmHD-Zip1 mit BSS.Bx2.N11 inkubiert. Nach zwei Waschschrritten wurde die gebundene DNA eluiert und entsalzt. Die eluierte DNA wurde in einer PCR-Reaktion mit den spezifischen Primern BSS.Bx2.for und BSS.Bx2.rev (Abb. 3.17.A; Tab. 2.10) amplifiziert und aufgereinigt. Der gesamte Vorgang wurde siebenmal wiederholt. Nach der letzten Runde wurde die eluierte DNA mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut und in den Vektor pKS⁺ kloniert. Positive Klone wurden mit einem Vektorprimer sequenziert und die klonierten Sequenzen miteinander verglichen. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Aus beiden Experimenten ergibt sich als Consensus die Sequenz ATGATTG (Abb. 3.17.B; Tab. 3.3). In der Literatur werden für HD-Zip-

Tab. 3.3: Definition der konservierten Bindestelle für rZmHD-Zip1. Im Alignment der selektierten Sequenzen wurde für jede Position des konservierten Bereichs die Zahl der Einzelbasen A, T, G oder C im Verhältnis zur Gesamtanzahl n bestimmt und tabellarisch dargestellt. Die Spalten stellen die Einzelpositionen im konservierten Sequenzbereich dar. In der untersten Zeile ist die bestimmte Consensus Sequenz dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7
n	53	61	62	62	62	53	51
G	12	1	48	-	-	1	39
A	24	-	3	62	-	-	9
T	13	58	4	-	62	52	2
C	4	2	7	-	-	-	1
consensus	A	T	G	A	T	T	G

Proteine der Klasse I pseudopalindrome Bindestellen von 9 bp Länge beschrieben, an die die Proteine als Dimere binden. Für ATHB-5 (Johannesson *et al.*, 2001) lautet diese beispielsweise CAATNATTG. Der für rZmHD-Zip1 bestimmten Sequenz fehlen demnach die Basen C und A im 5'-Bereich. Möglicherweise ist daher das Mais-Bindemotiv mit der Sequenz ATGATTG kürzer als die in der Literatur beschriebenen HD-Zip-Klasse-I-Bindemotive aus *Arabidopsis thaliana*, die ebenfalls durch eine Bindestellen-Selektion ermittelt wurden. Die Bindemotive für Klasse-I-HD-Zip-Proteine aus *Oryza sativa* wurden dagegen bisher nicht durch Bindestellen-Selektion exakt bestimmt, sondern basieren lediglich auf *in-vitro*-Versuchen und Hefeexperimenten mit bereits charakterisierten Motiven aus *Arabidopsis*.

In Gelretardationsexperimenten, bei denen die Bindung von rZmHD-Zip1 an Bindemotive mit den Kernsequenzen CAATGATTG und TTATGATTG verglichen wurde, bildete das Protein mit beiden Motiven gleich stabile Komplexe derselben Größe (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die beiden Positionen C und A für die spezifische DNA-Bindung von rZmHD-Zip1 keine Bedeutung haben.

3.4.4.3 Gelretardationsexperimente

Zur Charakterisierung der spezifischen Bindepräferenzen von rZmHD-Zip1 und rZmHD-Zip2 wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Neben den bereits bekannten Motiven Bx2.box und Bx2.mut wurde das Motiv HD-Zip1.box eingesetzt, welches das für die HD-Zip-Klasse I diskutierte klassische Consensus-Motiv CAAT(A/T)ATTG trägt. Dieses Motiv unterscheidet sich lediglich durch einen Basenaustausch (A→G) von Bx2.box. Bei BSS.box handelt es sich um das für rZmHD-Zip1 in der Bindestellen-Selektion ermittelte Motiv, das zum vollständigen Pseudopalindrom CAAT(G/C)ATTG ergänzt wurde (Abb. 3.18.A).

rZmHD-Zip1 und -2 sind in der Lage, mit den DNA-Fragmenten Bx2.box, HD-Zip1.box und BSS.box Komplexe zu bilden. Dabei bildet rZmHD-Zip2 als GST-Fusionsprotein deutlich höhermolekulare Komplexe aus als rZmHD-Zip1 mit His-tag (Abb. 3.18.B). Außerdem bildet rZmHD-Zip2 mit den DNA-Fragmenten zwei sehr nah zusammen liegende Komplexe

aus. Der untere Komplex könnte die Bindung einer verkürzten Version des Proteins darstellen. Diese ist bereits bei der Aufreinigung von rZmHD-Zip2 zu beobachten (Abb. 3.15) und verfügt möglicherweise ebenso über spezifische DNA-Bindeeigenschaften. Bx2.mut wird von beiden Proteinen nicht gebunden.

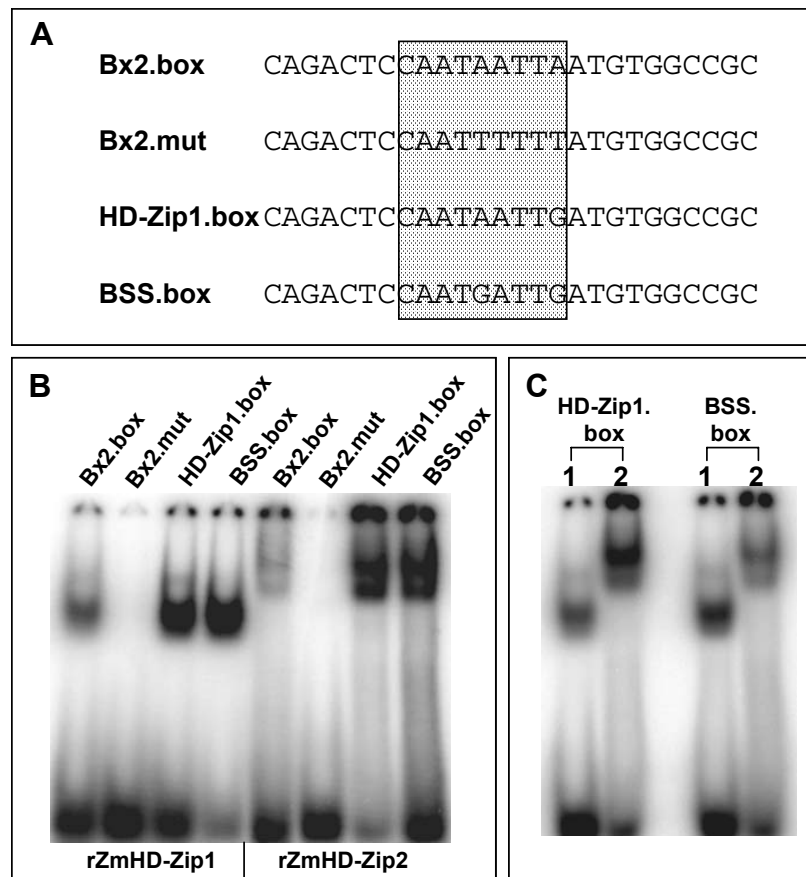


Abb. 3.18: Gelretardationsexperimente mit rZmHD-Zip1 und -2. (A): Übersicht über die im Experiment verwendeten 32 P-markierten DNA-Sonden mit einer Länge von 26 bp. Die Kernsequenz der DNA-Motive ist grau unterlegt. (B): Gelretardationsexperiment. 80 ng des rekombinanten Proteins wurden mit 2 ng 32 P-markierter DNA für 20 min bei RT inkubiert und die gebildeten Komplexe auf einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel bei 10 mA aufgetrennt. Spuren 1 bis 4: rZmHD-Zip1; Spuren 5 bis 8: rZmHD-Zip2. Die Namen der jeweils als Sonden verwendeten DNA-Motive stehen über der entsprechenden Spur. (C): Gelretardationsexperiment. Vergleich der Bindung von rZmHD-Zip1 und -2 an die Bindemotive HD-Zip1.box und BSS.box. Spuren 1: rZmHD-Zip1; Spuren 2: rZmHD-Zip2. Der Name der verwendeten DNA-Sonde steht jeweils über der entsprechenden Spur.

rZmHD-Zip2 zeigt in der DNA-Bindung eine klare Präferenz für HD-Zip1.box, während rZmHD-Zip1 das Motiv BSS.box leicht bevorzugt (Abb. 3.18.C), jedoch mit beiden Motiven sehr starke Komplexe ausbildet. Kompetitive Gelretardationsexperimente zeigen, dass beide Proteine spezifisch an diese Motive binden (Abb. 3.19.A und B). Auffällig ist, dass Bx2.box *in vitro* von beiden Proteinen wesentlich schlechter gebunden wird als die Motive HD-Zip1.box und BSS.box (Abb. 3.18.B). Die gebildeten Komplexe sind jedoch spezifisch, was

sich in kompetitiven Gelretardationsexperimenten (Abb. 3.19.C) mit Bx2.box und Bx2.mut zeigt.

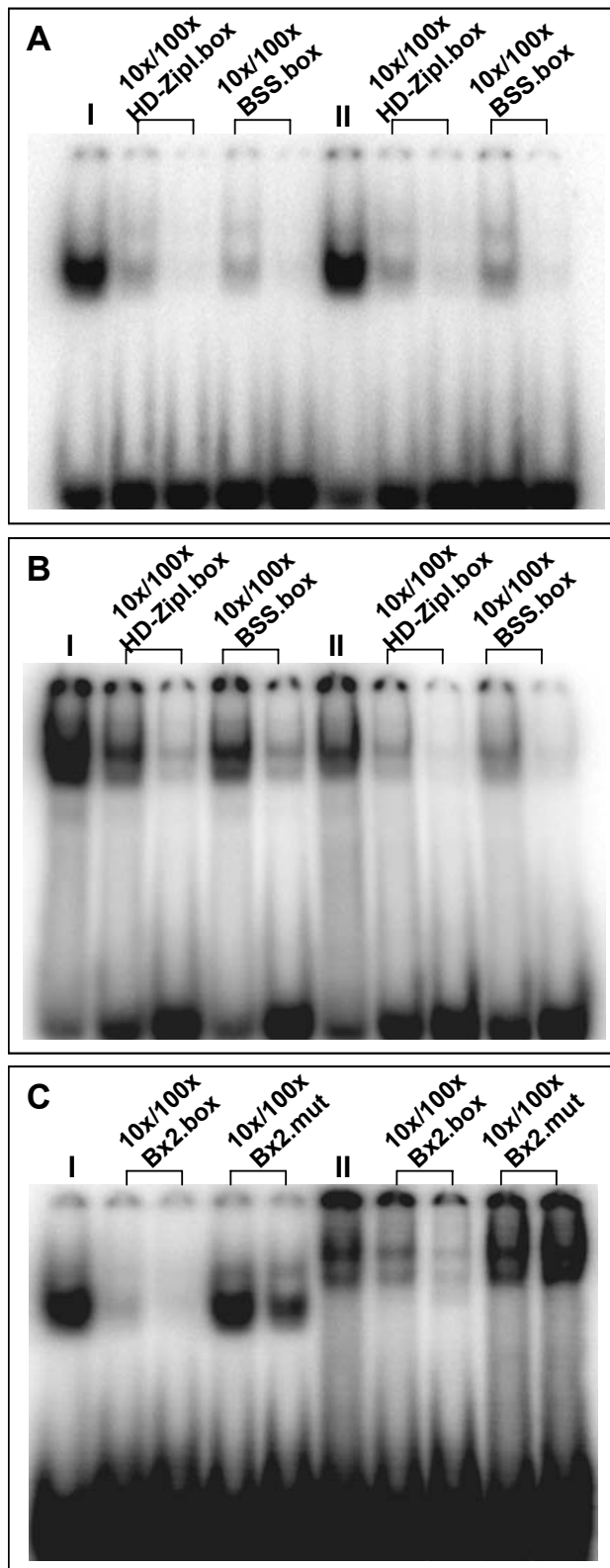


Abb. 3.19: Kompetitive Gelretardation mit rZmHD-Zip1 und rZmHD-Zip2. 80 ng des rekombinanten Proteins wurden jeweils mit 2 ng ^{32}P -markierter Bx2.box-DNA für 20 min bei RT inkubiert und die gebildeten Komplexe auf einem 6%igen nativen Polyacrylamidgel bei 10 mA aufgetrennt. Zur Kompetition wurde jeweils eine Vorinkubation von 10 min mit der Kompetitor-DNA durchgeführt. (A): Bindung von rZmHD-Zip1 an HD-Zip1.box und BSS.box. Spur I: Inkubation mit ^{32}P -HD-Zip1.box. In den folgenden 4 Spuren wurde mit 10-fachem und 100-fachem Überschuss an unmarkiertem HD-Zip1.box beziehungsweise BSS.box kompetitiert. Spur II: Inkubation mit ^{32}P -BSS.box. In den folgenden vier Spuren wurde mit 10-fachem und 100-fachem Überschuss an unmarkiertem HD-Zip1.box beziehungsweise BSS.box kompetitiert. (B): Kompetitive Gelretardation mit rZmHD-Zip2. Spur I: Inkubation mit ^{32}P -HD-Zip1.box. In den folgenden vier Spuren wurde mit 10-fachem und 100-fachem Überschuss an unmarkiertem HD-Zip1.box beziehungsweise BSS.box kompetitiert. Spur II: Inkubation mit ^{32}P -BSS.box. In den folgenden vier Spuren wurde jeweils mit 10-fachem und 100-fachem Überschuss an unmarkierter Bx2.box- beziehungsweise Bx2.mut-DNA kompetitiert.

3.5 Funktionelle Charakterisierung von ZmHD-Zip1 und -2

3.5.1 Charakterisierung von ZmHD-Zip1 und -2 im Protoplastensystem

3.5.1.1 Aktivierungseigenschaften von ZmHD-Zip1 und -2

Transfektionsexperimente mit Reis-Zellkulturen haben gezeigt, dass Oshox4 und -5 in diesem System als Aktivatoren der Transkription wirken. Oshox1 und -3 führten dagegen zu einer Repression der Reportergene (Meijer *et al.*, 2000). Im Folgenden sollte daher getestet werden, ob es sich bei ZmHD-Zip1 und -2 um Aktivatoren oder Repressoren der Transkription handelt. Zu diesem Zweck wurde als transientes Expressionssystem die Transfektion von Protoplasten gewählt, die aus Blättern von elf Tage alten, etiolierten Maiskeimlingen gewonnen wurden. Abb. 3.20 zeigt eine mikroskopische Aufnahme von Maisprotoplasten unter UV-Licht nach Färbung mit Fluoresceindiacetat. Durch diese Färbung werden lebende Zellen nachgewiesen.

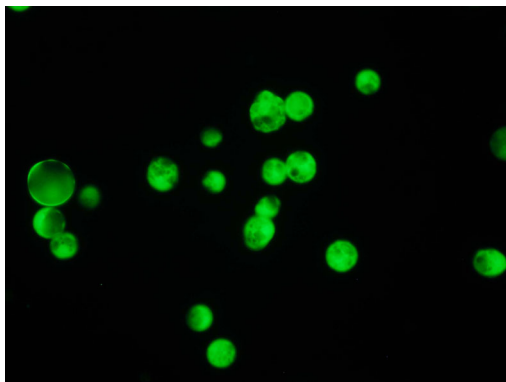


Abb. 3.20: Isolierte Protoplasten aus elf Tage alten Maiskeimlingen. Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation der Zellen mit Fluoresceindiacetat (FDA). Lebende Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

Die Transfektionsexperimente wurden als Kotransfektion von jeweils einem Reporter- mit einem Effektorplasmid durchgeführt. Als Reporterplasmide wurden Dreifachwiederholungen von Bx2.box beziehungsweise Bx2.mut, die vor einen 35S-Minimalpromotor fusioniert wurden, eingesetzt. Als Reportergen wurde das *GUS*-Gen (β -Glucuronidase) verwendet (Abb. 3.21.A und B). Außerdem wurden zwei Konstrukte verwendet, die aus den originalen *Bx2*- und *Bx4*-Promotoren amplifiziert wurden: Bei einem handelt es sich um ein 1000 bp-Fragment des *Bx2*-Promotors, das neben der Consensus TATA-Box auch das Bx2.box-Bindemotiv enthält (Abb. 3.21.C). Das Startcodon von *Bx2* wurde in diesem Konstrukt durch das Startcodon des *GUS*-Gens ersetzt. Bei dem anderen Konstrukt wurden 160 bp des *Bx4*-Promotors 5'-wärts des Startcodons an das *GUS*-Gen fusioniert (Abb. 3.21.D). In diesem Fall

blieb das originale Startcodon des *Bx4*-Gens erhalten. Dieses Konstrukt enthält neben der Consensus TATA-Box das Bx4.box-Bindemotiv aus dem *Bx4*-Promotor (Ohnhäuser, 2000). Als Terminator wurde ein 650 bp langes Fragment des *Bx4*-Terminators verwendet. Für Effektorstrukturen wurden die cDNAs von *ZmHD-Zip1* und -2 mit einem pflanzlichen Actin-Promotor fusioniert (pACT-*ZmHD-Zip1* und -2). Als GUS-Kontrolle wurde ein 35S-*GUS*-Fusionsplasmid eingesetzt. Als interner Standard wurde ein 35S-Luciferase (LUC)-Kontrollplasmid (Dr. Axel Himmelbach) verwendet und die gemessene GUS-Aktivität jeweils auf die entsprechende LUC-Aktivität standardisiert. GUS- und LUC-Aktivität (siehe Kapitel 2.2.11.3 und 4) wurden 18 Stunden nach Transfektion bestimmt. Zur Protoplastentransfektion, die als Elektroporation durchgeführt wurde, wurden von den Reporterplasmiden jeweils 30 µg, von den Effektorplasmiden je 10 µg DNA eingesetzt. Die geeigneten Mengen an Plasmid-DNA wurden in einem Vorversuch experimentell bestimmt.

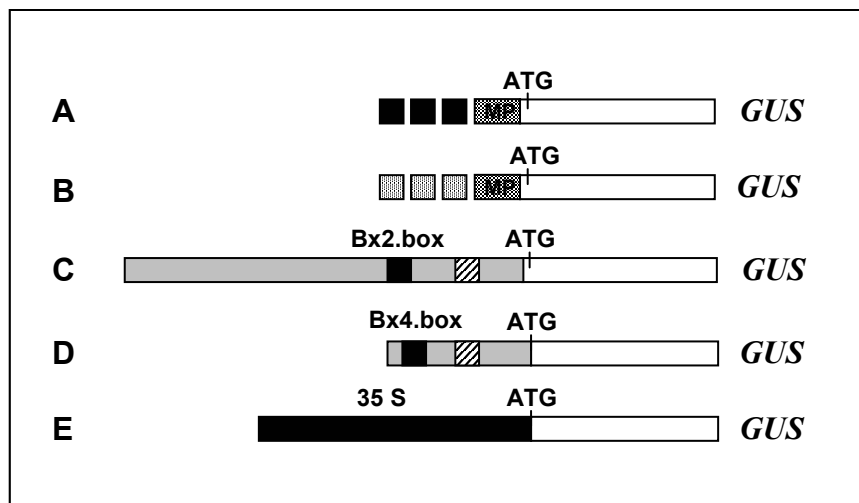


Abb. 3.21: Reporter-genkonstrukte für die Protoplastentransfektion. (A): Bx2.box.GUS: Drei Wiederholungen des Bx2.box-Bindemotivs (schwarzes Kästchen) wurden am 3'-Ende mit einem 35S-Minimalpromotor (MP) fusioniert, der dem *GUS*-Gen (weißer Balken) vorgeschaltet ist. Es wurde der 35S-Terminator eingesetzt. (B): Bx2.mut.GUS: Drei Wiederholungen des Bx2.mut-Bindemotivs (graues Kästchen) wurden am 3'-Ende mit einem 35S-Minimalpromotor (MP) fusioniert, der dem *GUS*-Gen (weißer Balken) vorgeschaltet ist. Es wurde der 35S-Terminator eingesetzt. (C): Bx2.1000 bp: Ein 1000 bp großer Promotorbereich des *Bx2*-Gens, der 5'-wärts des Startcodons liegt (grauer Balken), wurde an das *GUS*-Gen (weißer Balken) fusioniert. Dabei wurde das originale Startcodon durch das Startcodon des *GUS*-Gens ersetzt. Das Promotorfragment beinhaltet die Consensus TATA-Box (diagonal gestreiftes Kästchen), sowie das Bx2.box-Motiv (schwarzes Kästchen). Es wurde der 35S-Terminator eingesetzt (D): Bx4.160 bp: Ein 160 bp großer Promotorbereich des *Bx4*-Gens (grauer Balken), der 5'-wärts des Startcodons liegt wurde an das *GUS*-Gen (weißer Balken) fusioniert. Dabei wurde das originale Startcodon des *Bx4*-Gens erhalten. Das Promotorfragment beinhaltet die Consensus TATA-Box (diagonal gestreiftes Kästchen), sowie das Bx4.box-Bindemotiv (schwarzes Kästchen). Als Terminator wurde ein 650 bp-Fragment des Terminators aus dem *Bx4*-Gen eingesetzt. (E): 35S-*GUS*-Kontrolle: Der 35S-Promotor (650 bp) wurde an das *GUS*-Gen fusioniert. Die Konstrukte A bis C enthalten jeweils das gleiche *GUS*-Gen. Bei den Konstrukten D und E wurde ein anderes *GUS*-Fragment eingesetzt.

Die Reporterkonstrukte Bx2.box.GUS und Bx2.mut.GUS zeigen eine deutliche Grundaktivität der β -Glucuronidase, die für beide im gleichen Größenbereich liegt (Abb. 3.22). Zur Vereinfachung der Quantifizierung wurden diese Werte gleich eins gesetzt und alle anderen entsprechend darauf bezogen. Bei Kotransfektion mit pACT-ZmHD-Zip1 und Bx2.box.GUS kommt es im Mittel zu einer etwa vierfachen Steigerung der GUS-Aktivität. Kotransfektion mit pACT-ZmHD-Zip2 führt zu einer etwa fünffachen Aktivitätssteigerung. Wurden Protoplasten gleichzeitig mit dem Bx2.mut-Reporter und pACT-ZmHD-Zip1 oder -2 transfiziert, war keinerlei Steigerung der GUS-Aktivität zu beobachten. ZmHD-Zip1 und -2

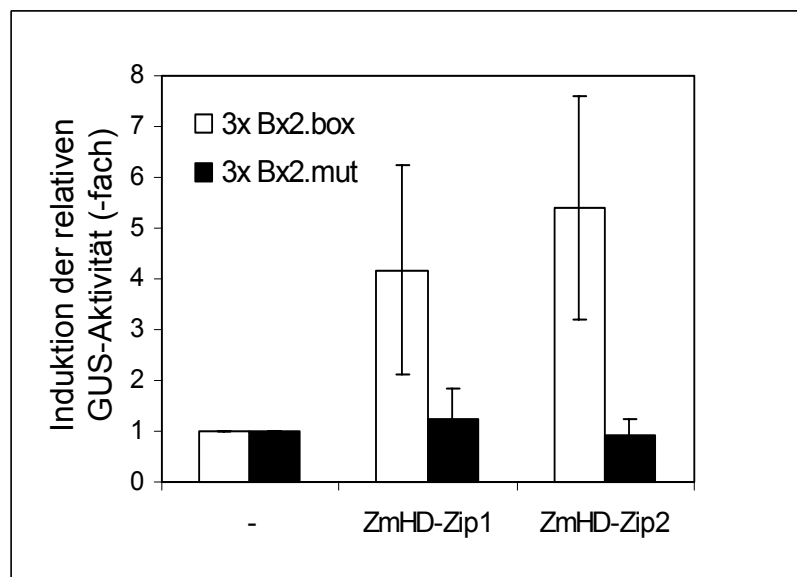


Abb. 3.22: Protoplastenkotransfektion mit den Reporterkonstrukten Bx2.box.GUS und Bx2.mut.GUS und den Effektorplasmiden pACT-ZmHD-Zip1 und -2. Protoplasten aus elf Tage alten Maiskeimlingen wurden mit den Reporterplasmiden und den Effektorplasmiden pACT-ZmHD-Zip1 oder -2 kotransfiziert. Zur Transfektion, die als Elektroporation durchgeführt wurde, wurden von den Reporterplasmiden jeweils 30 μ g, von den Effektorplasmiden je 10 μ g und 10^5 Protoplasten eingesetzt. Als Standard wurde ein 35S-Luciferase (LUC)-Plasmid eingesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Protoplasten für 18 h weiter inkubiert. Anschließend wurden GUS- und LUC-Aktivitäten der transfizierten Zellen bestimmt. Alle gemessenen GUS-Werte wurden auf die entsprechenden LUC-Werte standardisiert. Weiße Balken kennzeichnen die Transfektion mit dem Bx2.box-Reporter, schwarze Balken die mit dem Bx2.mut-Reporter. Auf der y-Achse wird die Induktion der GUS-Aktivität bei Kotransfektion mit den Effektorplasmiden angegeben. Dabei wurde die GUS-Aktivität, die allein bei Transfektion mit den Reporterkonstrukten gemessen werden kann, gleich eins gesetzt und alle anderen Werte entsprechend darauf bezogen. Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens vier parallelen Versuchsansätzen.

sind damit in der Lage, spezifisch an das Bx2.box-Motiv zu binden. Bx2.mut wird dagegen nicht gebunden. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate von Yeast-One-Hybrid-Experimenten (Abb. 3.13), die mit den gleichen Dreifachwiederholungen von Bx2.box und Bx2.mut durchgeführt wurden. Die Steigerung der GUS-Aktivität des Bx2.box-Reporters durch beide HD-

Zip-Proteine zeigt außerdem, dass es sich bei ZmHD-Zip1 und -2 um Aktivatoren der Transkription handelt.

In einem weiteren Transfektionsexperiment wurde die Reporterogenaktivität des Promotor-konstrukts Bx2.box.GUS (Abb. 3.21.A) mit Bx2.1000 bp (Abb. 3.21.C) und Bx4.160 bp (Abb. 3.21.D) verglichen. Als Positivkontrolle diente ein 35S-GUS-Reporterkonstrukt. Nach Transfektion der Protoplasten mit den Konstrukten Bx2.1000 bp und Bx4.160 bp war keinerlei GUS-Grundaktivität messbar, wie sie beim Reporterkonstrukt Bx2.box.GUS beobachtet werden kann (Tab. 3.4). Die Reporteraktivität für diese Konstrukte lag damit tatsächlich bei 0. Dies änderte sich auch nicht bei Kotransfektion mit pACT-ZmHD-Zip1 oder -2, bei der es mit Bx2.box.GUS zu einer deutlichen Aktivierung der Reporterogenaktivität kommt. Diese Induktion bleibt bei den Konstrukten Bx2.1000 bp und Bx4.160 bp aus.

Tab. 3.4: Parallele Protoplastentransfektion mit den Reporterkonstrukten Bx2.box.GUS, Bx2.1000 bp, Bx4.160 bp. Als Effektorplasmide wurden pACT-ZmHD-Zip1 und pACT-ZmHD-Zip2 eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein 35S-GUS-Konstrukt eingesetzt, dessen Aktivität einmalig bestimmt wurde. Alle anderen Werte wurden dreimal parallel wiederholt.

Reporter-konstrukt	Transfektion ohne Effektorplasmid	Kotransfektion mit pACT-ZmHD-Zip1	Kotransfektion mit pACT-ZmHD-Zip2
Bx2.box.GUS (A)	0,91 ± 0,27	2,56 ± 0,86	3,58 ± 0,38
Bx2.1000 bp (C)	0	0	0
Bx4.160 bp (D)	0	0	0
35S-GUS (E)	20,41	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt

3.5.1.2 Dimerisierungseigenschaften im Protoplastensystem

Eine spezifische Regulation von Genen wird häufig dadurch vermittelt, dass Transkriptionsfaktoren als Heterodimere an die DNA binden. ZmHD-Zip1 und -2 sind in der Lage, Heterodimere auszubilden (siehe Kapitel 3.4.2). Um zu testen, ob das Heterodimer aus ZmHD-Zip1 und -2 eine besondere Rolle im Hinblick auf die Regulation der Bx-Gene spielt, wurde erneut das Protoplastensystem als transientes Expressionssystem gewählt: Protoplasten aus elf Tage alten Maiskeimlingen wurden mit dem Bx2.box.GUS-Reporterkonstrukt (vgl. Abb. 3.21.A) und steigenden Mengen an pACT-ZmHD-Zip1, -2 oder einer Mischung zu gleichen Teilen kotransfiziert (Abb. 3.23). Um fehlerhafte Ergebnisse aufgrund von Verunreinigungen der DNA auszuschließen, wurden Parallelversuche mit verschiedenen Plasmid-Präparationen durchgeführt. In den Kotransfektionsexperimenten ist eine deutliche Dosis-Antwort-Beziehung zu erkennen: Je mehr Effektor-Plasmid eingesetzt wird, umso stärker ist die Akti-

vierung des GUS-Reporters. Bei etwa 1 μg Effektorplasmid wird die Sättigung erreicht (Abb. 3.23.A).

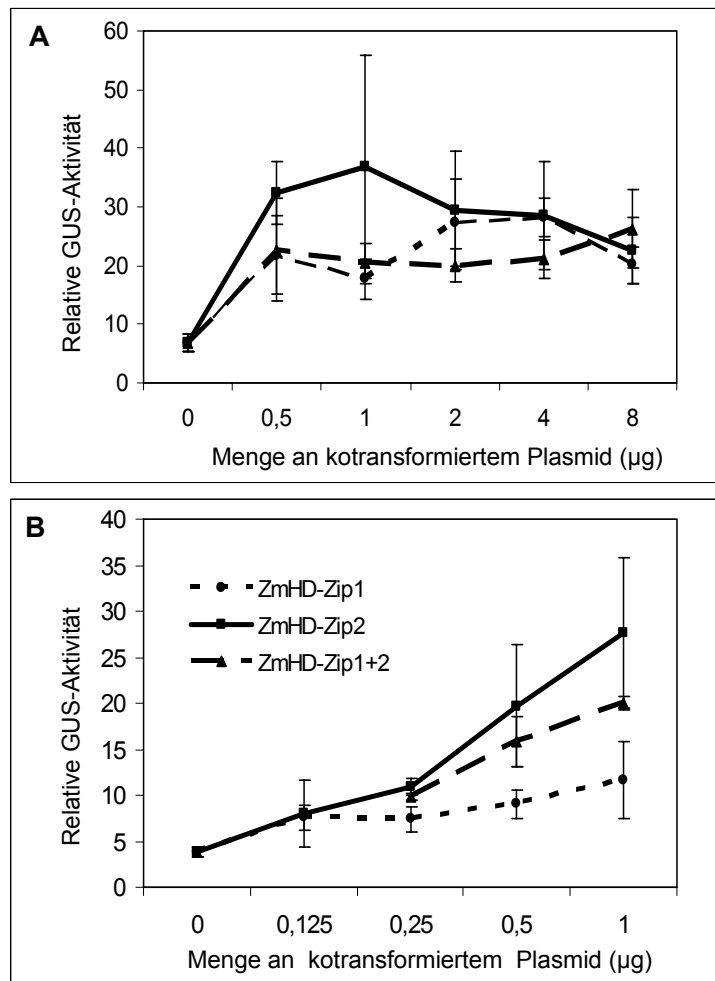


Abb. 3.23: Protoplastentransfektion. Protoplasten aus elf Tage alten Maiskeimlingen wurden mit dem Reporterplasmid Bx2.box.GUS und steigenden Mengen an pACT-*ZmHD-Zip1*, -2 oder einer Mischung aus beiden Plasmiden kotransfiziert. Als Standard wurde ein 35S-Luciferase-(LUC)-Plasmid eingesetzt. Alle gemessenen GUS-Werte wurden auf die entsprechenden LUC-Werte standardisiert. Auf der y-Achse sind daher relative Werte der GUS-Aktivität ohne Einheit angegeben. Auf der x-Achse sind die Mengen der eingesetzten Effektorplasmide angegeben. (A): Zur Transfektion wurden von den Reporterplasmiden jeweils 30 μg , von den Effektorplasmiden insgesamt 0,5 μg , 1 μg , 2 μg , 4 μg oder 8 μg eingesetzt. Die angegebenen Werte wurden jeweils aus drei Parallelversuchen ermittelt. (B): Zur Transfektion wurden von den Reporterplasmiden jeweils 30 μg , von den Effektorplasmiden insgesamt 0,125 μg , 0,25 μg , 0,5 μg oder 1 μg eingesetzt. Die angegebenen Werte wurden jeweils aus drei Parallelversuchen ermittelt.

Unterhalb der Sättigung (Abb. 3.23.B) führt Transfektion mit pACT-*ZmHD-Zip2* zu einer etwa zweimal stärkeren Aktivierung des Reportergens als mit pACT-*ZmHD-Zip1*. Eine Mischung aus beiden Effektorplasmiden führt zu einer Reporteragenaktivierung, die etwa das Mittel aus den beiden Einzelaktivierungen darstellt, diese jedoch weder übersteigt noch unterschreitet. Im Vergleich zu pACT-*ZmHD-Zip1* führt die Mischung der beiden Effektorplasmide zu einer Steigerung der GUS-Aktivität. Diese könnte jedoch auch durch das in der Mischung vorhandene pACT-*ZmHD-Zip2* allein bewirkt werden, das *ZmHD-Zip1* aufgrund seiner stärkeren Bindung an Bx2.box verdrängt (vgl. Abb. 3.13), oder additiv aus den Einzeleffekten der beiden Transkriptionsfaktoren entstehen.

Aus dem Ergebnis geht nicht hervor, ob es im gewählten Expressionssystem wirklich zu einer Heterodimerisierung von *ZmHD-Zip1* und -2 kommt, oder ob tatsächlich beide Effektoren unabhängig voneinander agieren. Sollte im Protoplastensystem tatsächlich eine Heterodi-

merisierung stattfinden, so führt das Heterodimer im Vergleich zum ZmHD-Zip2-Homodimer nicht zu einer Verstärkung der Reporteraktivität.

3.5.2 Charakterisierung von *ZmHD-Zip1* durch Transposon-Insertionsmutanten

ZmHD-Zip1 bindet spezifisch an das Bx2.box-Motiv im *Bx2*-Promotor (Kapitel 3.4.3, 3.4.4 und 3.5.1). Da dieses Motiv in ähnlichen Versionen auch in den anderen *Bx*-Promotoren vorkommt, handelt es sich bei ZmHD-Zip1 um einen möglichen Regulator der DIMBOA-Biosynthesegene. Diese mögliche Funktion von *ZmHD-Zip1* sollte durch die Analyse von *ZmHD-Zip1::Mu*-Insertionsmutanten näher untersucht werden.

Die TUSC-Population (Trait Utility System for Corn) von Pioneer Hi-Bred (Benson *et al.*, 1995) besteht aus Maislinien, die eine sättigende Mutagenese durch das Transposon *Mutator* (*Mu*) aufweisen. Diese Population wurde auf Insertionen von *Mu* in *ZmHD-Zip1* untersucht. Für die Familien PV03 115 D-09 und BT94 4 G-12, die als F2-Samen von Pioneer zur Verfügung gestellt wurden, konnte durch PCR eine Insertion des *Mu*-Elements festgestellt werden.

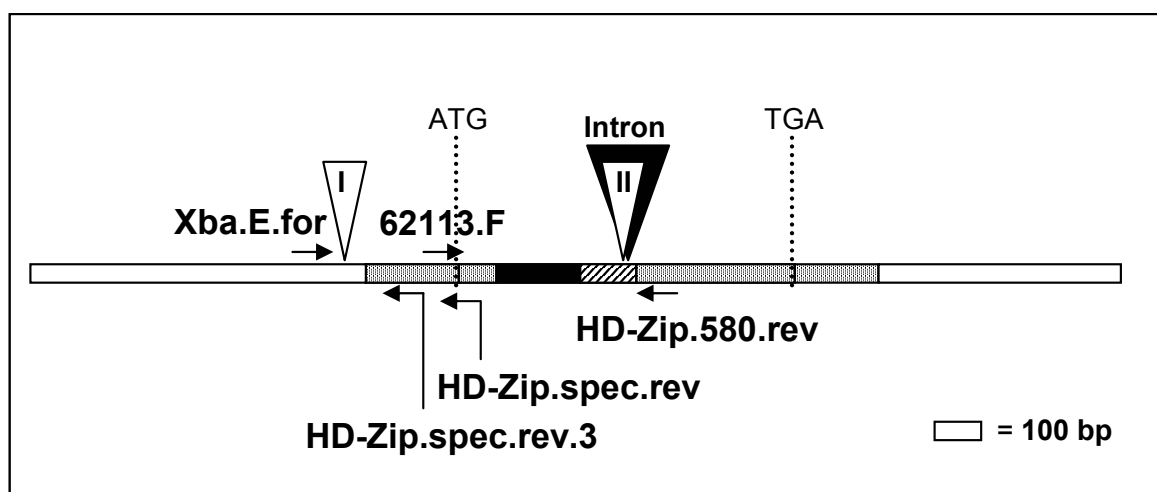


Abb. 3.24: Schematische Darstellung der *Mu*-Insertionen in der genomischen Sequenz von *ZmHD-Zip1* bei den Linien PV03 115 D-09 und BT94 4 G-12. In der genomischen Sequenz ist der Bereich der cDNA schwarz gepunktet. Der Bereich der Homeodomäne ist als schwarzer Balken dargestellt, der Leucin-Zipper als diagonal gestreifter Balken. Das Intron ist als schwarzer Keil dargestellt. *Mu*-Insertionsstellen sind als weiße Keile dargestellt. I: *Mu*-Insertion in der Linie PV03 D-09. II: *Mu*-Insertion in der Linie BT94 4 G-12. Dargestellt ist außerdem die ungefähre Lokalisation der Primer Xba.E.for (bei 2077 bp), HD-Zip.spec.rev. (bei 2380 bp), HD-Zip.spec.rev.3 (bei 2307 bp), HD-Zip.580.rev. (bei 2854 bp) und 62113.F (bei 2270 bp) auf der genomischen Sequenz von *ZmHD-Zip1* (siehe Abb. 3.6).

Die *Mu*-Insertion befindet sich bei PV03 115 D-09 im Promotorbereich, etwa 20 bp vor Beginn der cDNA-Sequenz (Abb. 3.24). Bei BT94 4 G-12 hat die Insertion im codierenden Bereich kurz vor dem Start des Introns stattgefunden.

3.5.2.1 Charakterisierung zweier *ZmHD-Zip1::Mu*-Insertionslinien

Von elf Keimlingen der Linie BT94 4 G-12 und zwölf Keimlingen der Linie PV03 115 D-09 wurde mit Hilfe von PCR der Genotyp bestimmt (Abb. 3.25). Parallel dazu wurde der Phänotyp dieser Pflanzen hinsichtlich des DIMBOA-Gehalts (Abb. 3.26) und den Transkriptmengen verschiedener *Bx*-Gene untersucht (Abb. 3.27).

Genotypisierung. Die Insertion des *Mu*-Elements in der Linie BT94 4 G-12 wurde in einer PCR mit dem spezifischen *Mu*-internen Primer Mu2 in Kombination mit dem genomischen Primer HD-Zip.580.rev (Abb. 3.24) als 250 bp großes Fragment nachgewiesen (Abb. 3.25.A). Mit den genomischen Primern 62113.F und HD-Zip.580.rev konnte ein Wildtyp PCR-Produkt von 580 bp amplifiziert werden, das in homozygoten *Mu*-Keimlingen nicht

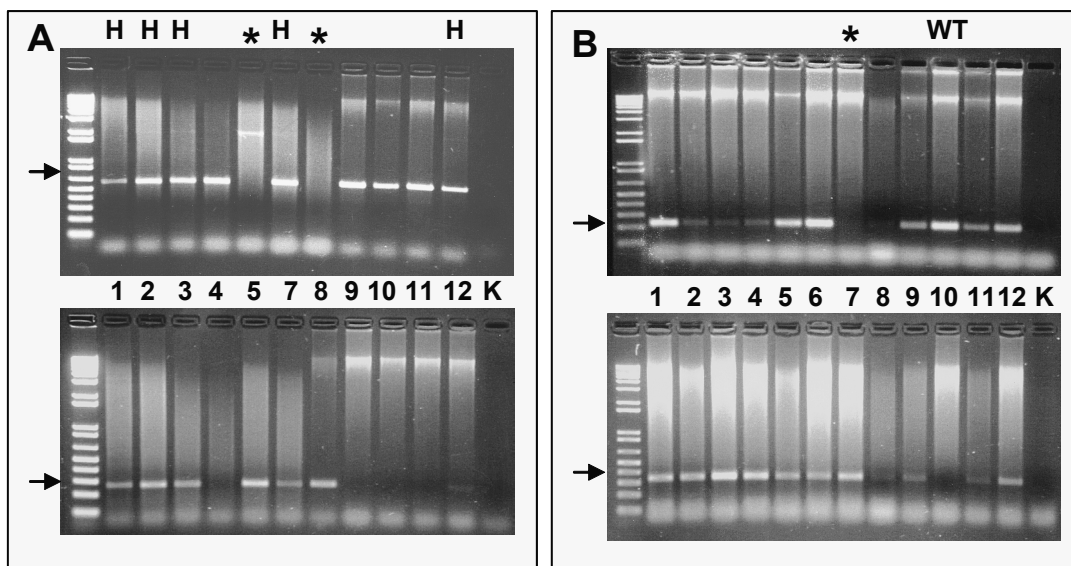


Abb. 3.25: Genotypisierung der *Mu*-Insertionslinien BT94 4 G-12 und PV03 115 D-09 mittels PCR. (A): BT94 4 G-12 : Es sind von links nach rechts die PCR-Produkte der Keimlinge #1 bis #5 und #7 bis #12 dargestellt. Sternchen markiert homozygote Mutanten; ‚H‘ markiert heterozygote Pflanzen. Es wurde eine Wasserkontrolle (K) durchgeführt. Oben: Wildtyp-spezifische PCR mit den Primern 62113.F und HD-Zip.580.rev. Die spezifische Bande (Pfeil) hat eine Größe von 580 bp. Unten: *Mu*-spezifische PCR mit den Primern Mu2 und HD-Zip.580.rev. Die spezifische Bande (Pfeil) hat eine Größe von 250 bp. (B): PV03 115 D-09: Es sind von links nach rechts die PCR-Produkte der Keimlinge #1 bis #12 dargestellt. Sternchen markiert homozygote Mutanten; ‚WT‘ markiert Wildtyp-Pflanzen. Es wurde eine Wasserkontrolle (K) durchgeführt. Oben: Wildtyp-spezifische PCR mit den Primern Xba.E.for und HD-Zip.spec.rev.3. Die spezifische Bande (Pfeil) hat eine Größe von 230 bp. Unten: *Mu*-spezifische PCR mit den Primern Mu2 und HD-Zip.spec.rev. Die spezifische Bande (Pfeil) hat eine Größe von 320 bp.

vorhanden war. Gemäß der Genotypisierung handelt es sich bei den Keimlingen #5 und #8 der Linie BT94 4 G-12 um homozygote *Mu*-Insertionsmutanten, bei #1 bis #3, #7 und #12 um Heterozygote und bei #4 und #9 bis #11 um Wildtypen.

Die Insertion des *Mu*-Elements in der Linie PV03 115 D-09 wurde ebenfalls mit dem spezifischen Primer Mu2 in Kombination mit dem genomischen Primer HD-Zip.spec.rev (Abb. 3.24) als 320 bp großes Fragment nachgewiesen (Abb. 3.25.B). Mit den genomischen Primern Xba.E.for und HD-Zip.spec.rev.3 konnte ein Wildtyp PCR-Produkt von 230 bp amplifiziert werden, das in homozygoten *Mu*-Keimlingen nicht vorhanden ist. Bei Keimling #7 handelt es sich um eine homozygote *Mu*-Pflanze, bei #10 um eine Wildtyp-Pflanze. Alle anderen Keimlinge sind bezüglich der *Mu*-Insertion heterozygot.

DIMBOA-Gehalt. DIMBOA wurde aus Blättern von neun Tage alten ergrüneten Keimlingen, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, isoliert. Der DIMBOA-Gehalt wurde mit Hilfe der HPLC ermittelt (Kapitel 2.4.2) und jeweils auf die eingesetzte Menge an Pflanzenmaterial bezogen.

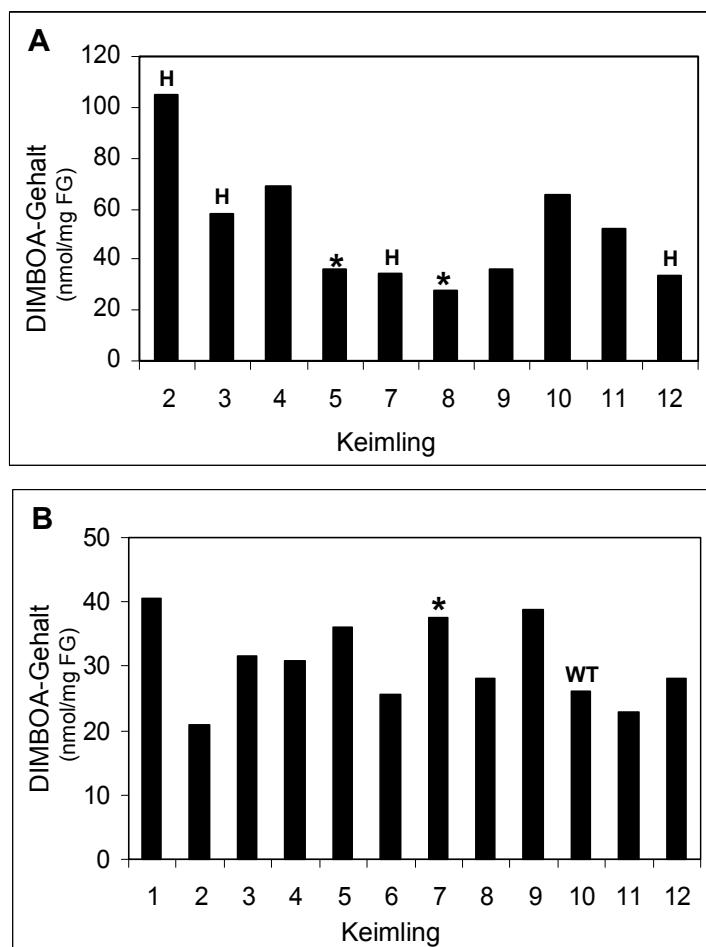


Abb. 3.26: Phänotypisierung der Linien BT94 4 G-12 und PV03 115 D-09 durch Bestimmung des DIMBOA-Gehalts in den Blättern von neun Tage alten ergrüneten Keimlingen. (A): BT94 4 G-12: Dargestellt ist der DIMBOA-Gehalt in den Keimlingen #2 bis #5 und #7 bis #12. Der DIMBOA-Gehalt ist angegeben in [nmol/mg Frischgewicht (FG)]. Sternchen markiert homozygote Mutanten; ‚H‘ markiert heterozygote Pflanzen. (B): PV03 115 D-09: Der DIMBOA-Gehalt in den Keimlingen #1 bis #12 ist angegeben in [nmol/mg Frischgewicht (FG)]. Sternchen markiert homozygote Mutanten; ‚WT‘ markiert Wildtyp-Pflanzen.

Dabei zeigten die beiden homozygoten *Mu*-Keimlinge #5 und #8 der Linie BT94 4 G-12 hinsichtlich des Gehalts an DIMBOA keine signifikante Abweichung von den heterozygoten und Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.26.A). Betrachtet man alle analysierten Keimlinge dieser Linie, so schwankt der DIMBOA-Gehalt unabhängig vom *ZmHD-Zip1*-Allel zwischen 30 und 100 nmol DIMBOA/mg Frischgewicht (FG). Eine solche Schwankung zwischen den betrachteten Keimlingen ist normal, da es sich nicht um genetisch identische Individuen handelt. Auch sonst konnte bei den Mutanten kein Phänotyp beobachtet werden, der mit dem Genotyp kosegregiert.

Die homozygote *Mu*-Insertionsmutante #7 der Linie PV03 115 D-09 zeigte bezüglich des DIMBOA-Gehalts ebenfalls keine signifikante Abweichung von den heterozygoten und Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.26.B). Unter allen analysierten Keimlingen dieser Linie schwankte der DIMBOA-Gehalt unabhängig vom *ZmHD-Zip1*-Allel zwischen 20 und 40 nmol DIMBOA/mg Frischgewicht (FG). Auch bei dieser Mutante konnte kein weiterer Phänotyp beobachtet werden.

Damit konnte bei beiden analysierten *Mu*-Insertionslinien kein Zusammenhang zwischen *ZmHD-Zip1* und der DIMBOA-Produktion in den Maispflanzen festgestellt werden.

Bestimmung der Transkriptmengen der Gene *ZmHD-Zip1*, *Bx1* bis *3* und *Bx8* in der Linie BT94 4 G-12. Die Expressionsanalyse der Linie BT94 4 G-12 wurde als quantitative PCR mit Hilfe des Lightcyclers durchgeführt. Dazu wurde aus Blattscheiden von neun Tage alten ergrünten Keimlingen RNA extrahiert und daraus cDNA synthetisiert. Quantitative PCR wurde mit spezifischen Primern für *ZmHD-Zip1* (Abb. 3.27.A), *Bx1* bis *-3* und *Bx8* (Abb. 3.27.B) durchgeführt. Die bestimmten cDNA-Mengen wurden zur Normierung auf die entsprechenden cDNA-Mengen des Gens Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) bezogen. Es wurde vorausgesetzt, dass dieses Gen als Gen des Grundstoffwechsels konstante Expressionsmengen aufweist (siehe Kapitel 2.2.5). Bei den homozygoten Mutanten #5 und #8 lagen die cDNA-Mengen für *ZmHD-Zip1* im Gegensatz zu den anderen untersuchten Keimlingen an der Nachweisgrenze (Abb. 3.27.A). Dieses Ergebnis zeigt, dass die in der Linie BT94 4 G-12 vorhandene Transposon-Insertion am Exon-Intron-Übergang tatsächlich zu einem Knock-out-Phänotyp bezüglich des *ZmHD-Zip1*-Gens führt. Dieser Effekt konnte auch bei der homozygoten Mutante der Linie PV03 115 D-09 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptmengen von *Bx1* bis *-3* und *Bx8* weisen zwischen den analysierten Pflanzen starke Schwankungen auf (Abb. 3.27.B). Für die einzelnen Pflanzen lassen sich jedoch ähnliche Muster für die Expression der verschiedenen Gene ableiten: Dabei finden sich durchweg die

höchsten cDNA-Mengen für *Bx8*, gefolgt von *Bx3*. Die Transkriptmengen von *Bx1* und -2 liegen deutlich unter diesen Werten, wobei meist *Bx1* stärker exprimiert ist als *Bx2*.

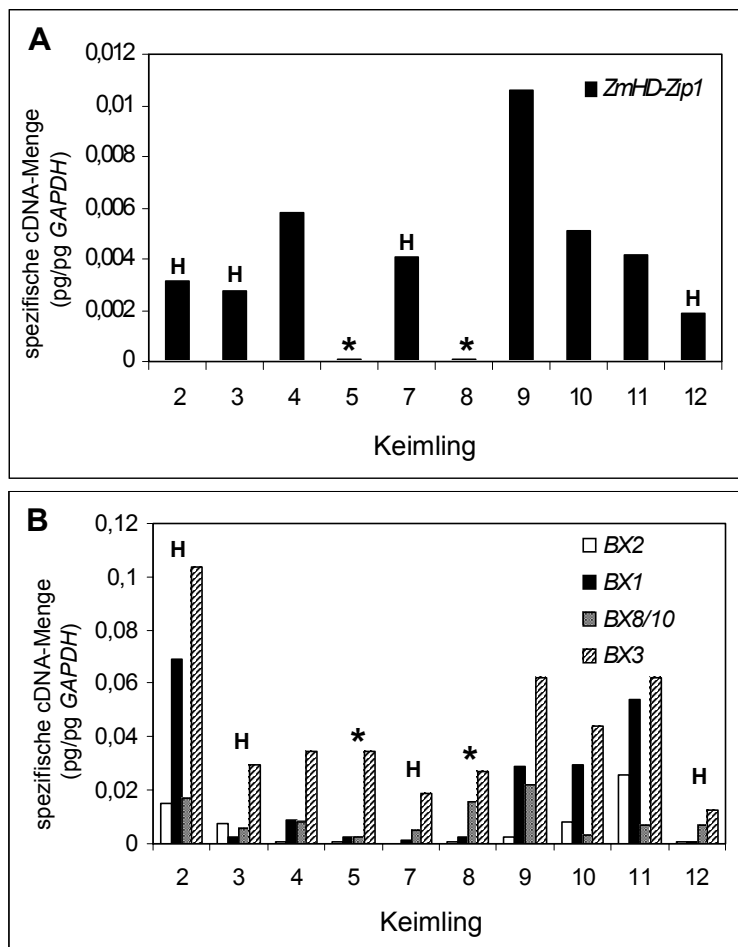


Abb. 3.27: Quantifizierung der Transkriptmengen der Gene *ZmHD-Zip1*, *Bx1* bis -3 und *Bx8* in neun Tage alten, ergrünenden Keimlingen der *Mu*-Insertionslinie BT94 4 G-12. RNA wurde extrahiert und daraus cDNA synthetisiert. Quantitative PCR wurde im Lightcycler mit spezifischen Primern in jeweils zwei Parallelansätzen durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen zwei Parallelversuchen. Die Standardabweichung wurde jeweils als $\leq 10\%$ bestimmt und ist im Diagramm nicht angegeben. Die gemessenen cDNA-Mengen wurden jeweils auf die entsprechenden cDNA-Mengen von *GAPDH* bezogen und sind in [pg/pg *GAPDH*] angegeben. Sternchen markiert homozygote Mutanten; ‚H‘ markiert heterozygote Pflanzen. (A): Transkriptmengen von *ZmHD-Zip1*. (B): Transkriptmengen von *Bx1*, -2, -3 und -8. In der Abbildung sind zur besseren Darstellung nur 1/10 der Transkriptmengen von *Bx8* gezeigt.

Bezüglich der Transkriptmengen der *Bx*-Gene zeigen die *Mu*-Insertionsmutanten keinen signifikanten Unterschied zu den heterozygoten Keimlingen und Wildtypen. Damit besteht kein direkter Zusammenhang zwischen *ZmHD-Zip1* und der Expression der *Bx*-Gene.

Um diesen Befund zu verifizieren, wurden bei weiteren sechzehn Keimlingen der Linie BT94 4 G-12 die Transkriptmengen von *ZmHD-Zip1*, -2 sowie *Bx1* und -2 untersucht. Auf eine Genotypisierung wurde in diesem Fall verzichtet, da bereits im letzten Experiment ein klarer Zusammenhang zwischen homozygotem *Mu*-Genotyp und der *ZmHD-Zip1*-Expression erkennbar war (Abb. 3.27.A). Bei den Keimlingen #2 und #13 ist keinerlei *ZmHD-Zip1*-Transkript messbar (Abb. 3.28.A). Es handelt sich damit wahrscheinlich bei beiden Pflanzen um homozygote Mutanten. Wie im vorausgegangenen Experiment lässt sich auch hier kein Zusammenhang zwischen der stark reduzierten *ZmHD-Zip1*-Expression in den Mutanten und der Expression von *Bx1* und *Bx2* erkennen (Abb. 3.28.B). Außerdem besteht kein Zusammenhang zwischen den Transkriptmengen von *ZmHD-Zip1* und *ZmHD-Zip2*. Dies zeigt sich deut-

lich an den Transkriptmengen von *ZmHD-Zip2* in den *ZmHD-Zip1*-Knockout-Mutanten, die sich nicht signifikant von denen der anderen Pflanzen unterscheiden.

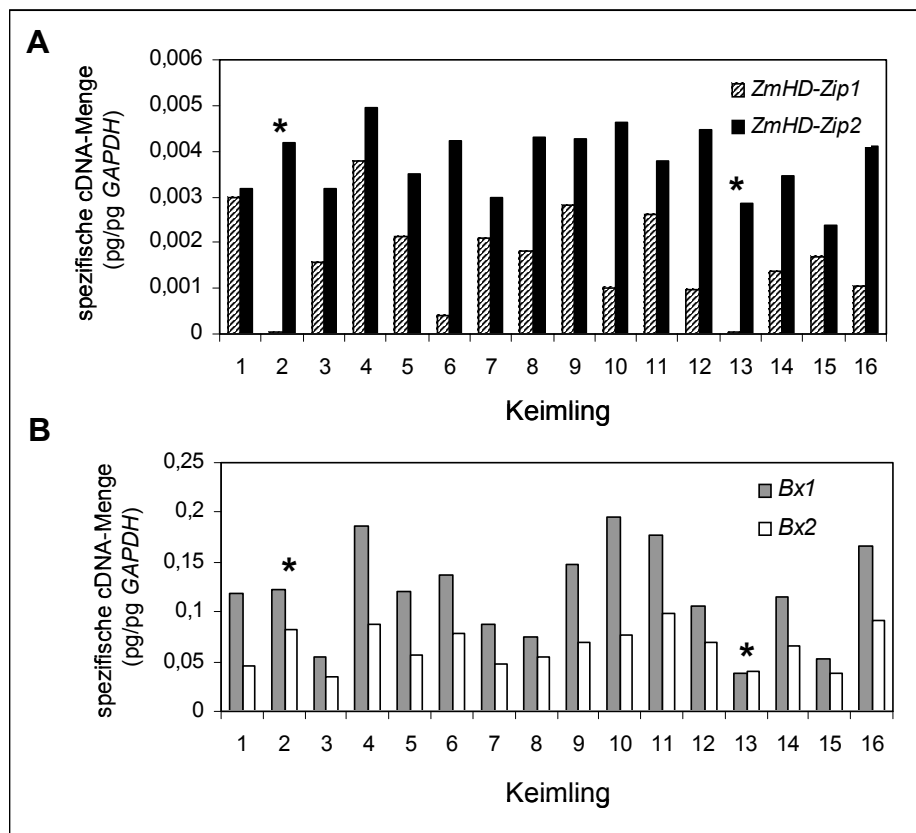


Abb. 3.28: Quantifizierung der Transkriptmengen der Gene *ZmHD-Zip1*, *ZmHD-Zip2*, *Bx1* und *Bx2* in neun Tage alten, ergrünten Keimlingen der *Mu*-Insertionslinie BT94 4 G-12. RNA wurde extrahiert und daraus cDNA synthetisiert. Quantitative PCR wurde im Lightcycler mit spezifischen Primern in jeweils zwei Parallelansätzen durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus diesen zwei Parallelversuchen. Die Standardabweichung wurde jeweils als $\leq 10\%$ bestimmt und ist im Diagramm nicht angegeben. Die gemessenen cDNA-Mengen wurden jeweils auf die entsprechenden cDNA-Mengen von *GAPDH* bezogen und sind in [pg/pg *GAPDH*] angegeben. Sternchen markiert homozygote Mutanten. (A): Transkriptmengen von *ZmHD-Zip1* und *ZmHD-Zip2*. (B): Transkriptmengen von *Bx1* und *Bx2*.

3.5.3 Die Expression von *ZmHD-Zip1* und *ZmHD-Zip2* in der Maispflanze

Um Informationen über die Expression von *ZmHD-Zip1* und *-2* in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Gewebespezifität zu erhalten, wurden die Transkriptmengen der beiden Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien und Organen der Maispflanze bestimmt und mit den jeweiligen Transkriptmengen von *Bx1* und *Bx2* verglichen. Die Expression dieser Gene wurde jeweils in den oberirdischen Teilen von etiolierten und im Licht gewachsenen Maiskeimlingen (CI31A) im Alter von zwei, drei, vier, sechs und acht Tagen untersucht. Außerdem wurden Wurzel und Spross von drei Wochen alten, ergrünten Pflanzen (B73) analysiert. Zusätz-

lich wurden in das Experiment Körner (*kernel*), Kolben (*cob*), Seide (*silk*), Halm (*stem*) und Hüllblätter des Kolbens (*husk*) von adulten Pflanzen (B73) im Alter von vier Monaten mit einbezogen. Die Quantifizierung der Transkriptmengen erfolgte mit Hilfe des Lightcyclers.

ZmHD-Zip1 wird in den untersuchten Entwicklungsstadien und Organen mit Mengen zwischen 0,004 und 0,04 pg/pg *GAPDH* relativ schwach exprimiert (Abb. 3.29). Das Transkript ist jedoch gleichmäßig in allen untersuchten Proben vorhanden. *ZmHD-Zip1* wird also im Keimling und in der adulten Pflanze etwa gleich stark exprimiert. Da sich die Transkriptmengen in etiolierten Keimlingen nicht signifikant von denen im Licht gewachsener Keimlinge unterscheiden, kann außerdem davon ausgegangen werden, dass die Expression von *ZmHD-Zip1* nicht lichtabhängig ist. *ZmHD-Zip2* wird im Gegensatz zu *ZmHD-Zip1* nur in Keimlingen, dort jedoch deutlich stärker (0,02 bis 0,1 pg/pg *GAPDH*) als ersteres exprimiert. In Organen adulter Maispflanzen war keinerlei *ZmHD-Zip2*-Transkript messbar.

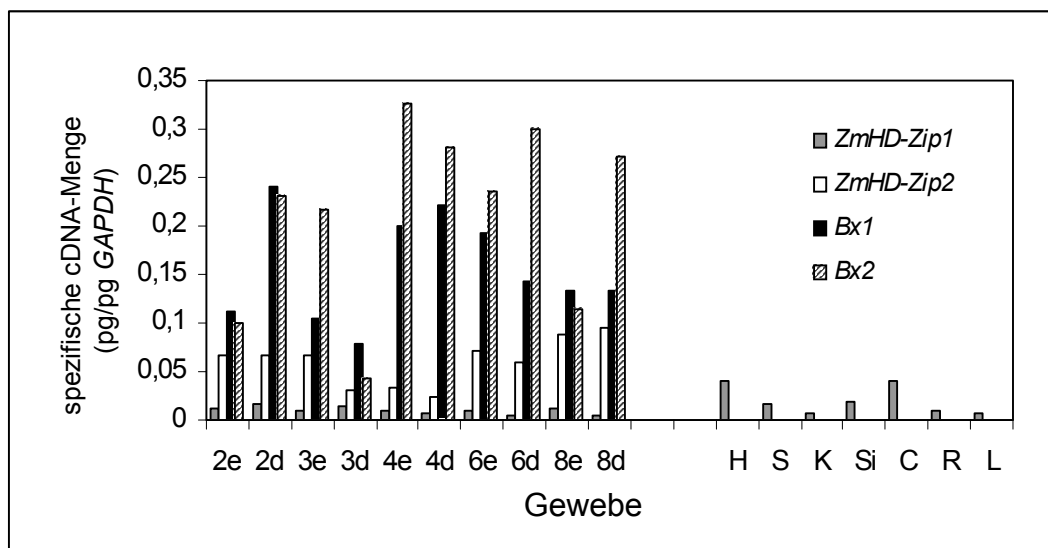


Abb. 3.29: Vergleich der Transkriptmengen von *ZmHD-Zip1*, *ZmHD-Zip2*, *Bx1* und *Bx2* in verschiedenen Keimlingsstadien und in verschiedenen Organen der adulten Maispflanze. Aus RNA wurde cDNA synthetisiert. Mit spezifischen Primern für jedes Gen wurden die entsprechenden Transkriptmengen quantifiziert. Alle Werte wurden auf die entsprechenden Transkriptmengen von *GAPDH* standardisiert. Die cDNA-Mengen sind daher als [pg/pg *GAPDH*] angegeben. 2e bis 8e: etiolierte Keimlinge (CI31A) im Alter von zwei, drei, vier, sechs und acht Tagen. 2d bis 8d: Im Licht gekeimte Pflanzen (CI31A) im Alter von zwei, drei, vier, sechs und acht Tagen. H: Hüllblätter des Kolbens; S: Halm; K: Korn; Si: Seide; C: Kolben; R: Wurzel; L: Blatt. Die Proben H, S, K, Si, C stammen von vier Monate alten Keimlingen der Linie B73. Die Proben R und L stammen aus drei Wochen alten Keimlingen der Linie B73.

Auch bei *ZmHD-Zip2* sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transkriptmengen etiolierter und im Licht gekeimter Keimlinge zu beobachten. Die Transkriptmengen von *Bx1* (0,08 bis 0,24 pg/pg *GAPDH*) und *Bx2* (0,04 bis 0,33 pg/pg *GAPDH*) sind deutlich

höher als die von *ZmHD-Zip1* und -2. Die Expression der beiden Gene ist jedoch wie bei *ZmHD-Zip2* auf das Keimlingsstadium begrenzt und dort nicht lichtabhängig.

4 Diskussion

4.1 *ZmHD-Zip1* und -2: Zwei HD-Zip-Proteine aus Mais

4.1.1 *ZmHD-Zip1* und -2 gehören zur Klasse I der HD-Zip-Proteine

Das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* enthält 42 HD-Zip-codierende Gene (Wang, 2001), von denen mehr als 20 näher charakterisiert sind. Aufgrund von Sequenzkriterien können *HD-Zip*-Gene in vier Klassen (HD-Zip I bis IV) eingeteilt werden (Sessa *et al.*, 1994). Proteine der Klassen I und II weisen eine sehr ähnliche Architektur der Homeodomäne auf. Im Gegensatz dazu sind bei den HD-Zip-III-Proteinen ATHB-8, -9 und -14 jeweils vier Aminosäuren zwischen die Helices II und III der Homeodomäne und zwischen Helix III und den Leucin-Zipper eingeschoben (Baima *et al.*, 1995; Sessa *et al.*, 1998). ATHB-10/GL2 gehört der HD-Zip-Klasse IV an. Es besitzt eine Homeodomäne, die mit denen von Klasse-I- und -II-HD-Zip-Proteinen identisch ist. Allerdings besteht der Leucin-Zipper dieses Proteins aus zwei Subdomänen, die durch eine Schleife von zehn Aminosäuren voneinander getrennt sind (Di Cristina *et al.*, 1996).

In jüngster Zeit sind *HD-Zip*-Gene verschiedener Klassen aus Reis (Meijer *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 2000), Mais (Ingram *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 2000), Tomate (Mayda *et al.*, 1999), Sonnenblume (Palena *et al.*, 1999), Sojabohne (Tang *et al.*, 2001), *Zinnia elegans* (Nishitani *et al.*, 2001; Ohashi-Ito *et al.*, 2002) und *Craterostigma plantagineum* (Deng *et al.*, 2002), aber auch aus Moosen (Sakakibara *et al.*, 2001) und Farnen (Aso *et al.*, 1999) beschrieben worden.

Die cDNAs von *ZmHD-Zip1* und -2 konnten im Rahmen von Yeast-One- und -Two-Hybrid-Screens isoliert werden (Kapitel 3.2.1 und 3.3.3). Anhand von Vergleichen der Proteinsequenzen (Abb. 3.11) mit bereits charakterisierten HD-Zip-Proteinen aus Reis, können beide Proteine der Klasse I der HD-Zip-Transkriptionsfaktorfamilie zugeordnet werden und stellen damit die ersten *HD-Zip*-Gene der Klasse I dar, die bei Mais identifiziert werden konnten.

Die Klasse I der HD-Zip-Proteine zeichnet sich durch die konservierten Aminosäurereste Ala46 und Trp56 in Helix III der Homeodomäne aus und unterscheidet sich dadurch von

Klasse II, deren Mitglieder an diesen Positionen einen Glutamat- beziehungsweise einen Threoninrest tragen (Sessa *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 1997). ZmHD-Zip1 besitzt auf Aminosäureebene eine Identität von 70,8 % mit Oshox6, dem homologen Protein aus Reis. ZmHD-Zip2 und sein Reis-Homologes Oshox5 sind zu 61,1 % identisch. Die Identitäten zwischen den HD-Zip-I-Proteinen aus Reis (Oshox4, -5 und -6) untereinander sind dagegen deutlich geringer (31,1 bis 35,7 %; Tab. 3.2; Abb. 3.11.B). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Diversifikation innerhalb der Klasse I der *HD-Zip*-Gene, die wahrscheinlich durch Genduplikation erfolgt ist (Skena and Davis, 1994), in den Gräsern vor der phylogenetischen Trennung der Gattungen *Zea* und *Oryza* stattgefunden hat. Schon viel früher, vor der Trennung der Angiospermen von den Farnen, die vor etwa 400 Millionen Jahren erfolgte, sind die vier HD-Zip-Unterfamilien I bis IV divergiert (Aso *et al.*, 1999; Sakakibara *et al.*, 2001).

4.1.2 ZmHD-Zip1 und -2 besitzen unterschiedliche DNA-Bindepräferenzen

In der Literatur werden für HD-Zip-Proteine charakteristische Bindemotive beschrieben: DNA-Bindestudien mit ATHB-1 (HD-Zip-Klasse I) und ATHB-2 (HD-Zip-Klasse II) haben beispielsweise gezeigt, dass diese als Homodimere an die 9 bp langen Motive CAAT(A/T)ATTG (ATHB-1) beziehungsweise CAAT(G/C)ATTG (ATHB-2) binden (Sessa *et al.*, 1993). Das HD-Zip-III-Protein ATHB-9 bindet dagegen das längere Pseudopalindrom GTAAT(G/C)ATTAC (Sessa *et al.*, 1998).

In Gelretardationsexperimenten mit rekombinantem Protein, in denen die Bindung der identifizierten Mais HD-Zip-Klasse-I-Proteine an die oben beschriebenen Bindemotive untersucht wurde, bildete rZmHD-Zip1 starke, spezifische Komplexe mit den pseudopalindromen DNA-Motiven CAAT(A/T)ATTG und CAAT(G/C)ATTG aus (Abb. 3.18 und Abb. 3.19.A). Dabei zeigte das Protein eine leichte Präferenz für ein G gegenüber einem A als zentrale Base des Pseudopalindroms. Das Ergebnis einer PCR-gestützten Bindestellen-Selektion, bei der als Consensus Bindemotiv für rZmHD-Zip1 die Sequenz ATGATTG ermittelt wurde (Abb. 3.17; Tab. 3.3), spricht allerdings dafür, dass die Positionen C und A im 5'-Bereich der HD-Zip-Motive für die spezifische DNA-Bindung von rZmHD-Zip1 keine Bedeutung haben. Diese Vermutung wird ebenfalls durch Gelretardationsexperimente gestützt, bei denen rZmHD-Zip1 mit den Bindemotiven CAATGATTG und TTATGATTG gleich stabile Komplexe der gleichen Größe ausbildete. rZmHD-Zip1 zeigt damit andere DNA-Bindepräferenzen als Klasse-I-HD-Zip-Proteine aus *Arabidopsis*, für die mit Hilfe einer Bindestellen-Selektion die oben ge-

nannten Bindemotive exakt ermittelt wurden (Sessa *et al.*, 1997; Johannesson *et al.*, 2001). Für Oshox6, das Reis-Homologe von ZmHD-Zip1, wurden die Bindeeigenschaften nicht exakt mit Hilfe einer Bindestellen-Selektion bestimmt, sondern gehen auf die Ergebnisse aus Gelretardationsexperimenten mit bereits bekannten Bindemotiven aus *Arabidopsis* zurück (Meijer *et al.*, 2000). Darin zeigte Oshox6 eine Bindung an das Motiv CAAT(A/T)ATTG.

Sessa *et al.* (1997) stellten ursprünglich die These auf, dass alle HD-Zip-Proteine der Klasse I aufgrund der bereits oben erwähnten Aminosäurereste Ala46 und Trp56 spezifisch und ausschließlich an DNA-Motive mit A/T in der zentralen Position binden (CAAT(A/T)ATTG), während Klasse-II-HD-Zip-Proteine mit dem Aminosäuremotiv Glu46 und Thr56 ein G als zentrale Base bevorzugen. Der Vergleich der DNA-Bindeeigenschaften von rZmHD-Zip1 und Oshox6 zeigt jedoch, dass HD-Zip-Proteine der Klasse I trotz der hochkonservierten Architektur der Homeodomäne sehr unterschiedliche DNA-Bindeeigenschaften besitzen können. Dies bestätigt auch eine Arbeit von Johannesson *et al.* (2001), in der unterschiedliche Bindepräferenzen für HD-Zip-I-Proteine aus *Arabidopsis* beschrieben wurden. Es wäre daher möglich, dass die spezifischen DNA-Bindepräferenzen der einzelnen HD-Zip-Proteine außer von der Homeodomäne auch von anderen Proteindomänen beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu rZmHD-Zip1, zeigte rZmHD-Zip2 in Gelretardationsexperimenten eine klare Präferenz für das Motiv CAAT(A/T)ATTG mit einem zentralen A im Pseudopalindrom. Das entsprechende Motiv mit einem G in zentraler Position wurde deutlich schwächer gebunden (Abb. 3.18.C und Abb. 3.19.B). rZmHD-Zip2 verhält sich damit ähnlich wie Oshox5 und ATHB-1, die nächst homologen Proteine aus Reis und *Arabidopsis* (Meijer *et al.*, 2000; Johannesson *et al.*, 2001).

4.1.3 ZmHD-Zip1 und -2 binden an das Bx2.box-Bindemotiv

Das Bx-Bindemotiv enthält als Kernelement die Sequenz TAATT, die in allen untersuchten Bx-Promotoren vorkommt (siehe Kapitel 3.1.1). Im Bx2-Promotor befindet es sich auf dem (-)-Strang bei -204 bp bis -219 bp relativ zum Transkriptionsstart (Bx2.box; Tab. 3.1). Das gleiche Motiv kommt außerdem im Bx1-Promotor auf dem (-)-Strang bei -171 bis -156 (Tab. 3.1) vor. Das Bx2.box-Motiv enthält die 9 bp lange Sequenz CAATAATTA, die sich nur an Position 9 von dem typischen HD-Zip-Bindemotiv CAAT(A/T)ATTG unterscheidet. In Yeast-One-Hybrid-Experimenten zeigten sowohl ZmHD-Zip1 als auch ZmHD-Zip2 eine spe-

zifische Bindung an Reportergenkonstrukte mit drei Wiederholungen des Bx2.box-Motivs (Abb. 3.5; Abb. 3.13). Eine entsprechende Aktivierung der Reporter gene erfolgte nicht, wenn eine mutierte Variante des Bx2.box-Bindemotivs als Köder eingesetzt wurde. ZmHD-Zip1 und -2 binden also spezifisch an ein Sequenzelement der DIMBOA-Biosynthesegene und könnten daher eine Funktion als Regulatoren dieses Sekundärstoffwechselwegs haben.

Auch *in vitro* zeigten die rekombinanten Proteine rZmHD-Zip1 und -2 eine spezifische Bindung an das Bx2.box-Bindemotiv (Abb. 3.19.C). Im Vergleich war diese jedoch deutlich schwächer als die Bindung der beiden Proteine an die klassischen HD-Zip-Motive CAAT(A/T)ATTG und CAAT(G/C)ATTG (Abb. 3.18.B). Da sich Bx2.box nur durch den Tausch der randständigen Base G → A von den genannten HD-Zip-Motiven unterscheidet, ist davon auszugehen, dass die schwächere Bindung mit diesem Basenaustausch zusammenhängt. Ein ähnliches DNA-Motiv kommt im Promotor des ABA-induzierbaren *HD-Zip*-Gens *ATHB-6* vor (Himmelbach *et al.*, 2002). Dieses Motiv (CAATTATTA) unterscheidet sich, ähnlich wie Bx2.box, von den bisher beschriebenen HD-Zip-Motiven. Es konnte gezeigt werden, dass *ATHB-6* an dieses Bindemotiv bindet und so möglicherweise autoregulativ seine eigene Expression beeinflusst. Es ist daher denkbar, dass auch DNA-Motive mit leichten Abwandlungen von den klassischen HD-Zip-Motiven, wie sie im *ATHB-6*-Promotor und den *Bx*-Promotoren vorkommen, spezifische Funktionen in der HD-Zip-vermittelten Genregulation von Pflanzen einnehmen.

Für die Interpretation der *in-vitro*-Daten muss außerdem berücksichtigt werden, dass die rekombinanten Proteine als Fusionsproteine zu fremden Proteinanteilen gewonnen wurden und diese möglicherweise auch die DNA-Bindung beeinflussen könnten. Dies ist insbesondere bei rZmHD-Zip2 möglich, das am N-Terminus eine GST-Domäne von 26 kd (Abb. 3.15), also etwa dem gleichen Molekulargewicht wie ZmHD-Zip2, trägt. Da sich im N-terminalen Bereich auch die Homeodomäne befindet, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist (Gehring *et al.*, 1994), könnte sich diese Proteinfusion auf die Bindeeigenschaften von rZmHD-Zip2 auswirken.

4.1.4 ZmHD-Zip1 und -2 bilden Homo- und Heterodimere

HD-Zip-Proteine binden als Dimere an die DNA. Als Dimerisierungsdomäne dient die Leucin-Zipper-Domäne, die vermutlich mit dem Leucin-Zipper des Dimerisierungspartners eine amphipathische α -Helix ausbildet (Lee and Chun, 1998).

In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten, in denen jeweils ZmHD-Zip1 oder ZmHD-Zip2 als Köder angeboten wurde, konnte gezeigt werden, dass beide Proteine in der Lage sind, Homodimere und Heterodimere mit dem anderen Protein auszubilden (Abb. 3.12). Eine verkürzte Version von ZmHD-Zip2 (Abb. 3.12; N117), der mit 117 N-terminalen Aminosäuren praktisch die gesamte Homeodomäne fehlt, ist noch zur Dimerisierung befähigt. Das zeigt, dass der Leucin-Zipper als Dimerisierungsdomäne wirkt.

Die Bildung von Heterodimeren innerhalb einer HD-Zip-Klasse wurde bereits bei anderen Pflanzen beobachtet: Ausführliche Dimerisierungsstudien wurden für ATHB-5 (HD-Zip-Klasse I) durchgeführt (Johannesson *et al.*, 2001). Dabei hat sich gezeigt, dass ATHB-5 nicht nur Homodimere ausbildet, sondern auch mit ATHB-6, -7 und -12, die ebenfalls zur Klasse I der HD-Zip-Proteine gehören, heterodimerisiert. In Yeast-Two-Hybrid- und Gelretardationsexperimenten konnte sowohl für die Oshox-Proteine aus Reis (Meijer *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 2000) als auch für die CPHB-Proteine aus *Craterostigma* (Deng *et al.*, 2002) gezeigt werden, dass Heterodimerisierung nur innerhalb der gleichen Klasse von HD-Zip-Proteinen möglich ist. Eine Heterodimerisierung zwischen Klasse-I- und -II-HD-Zip-Proteinen wurde in keiner dieser Studien beobachtet.

Mit der Bildung von Heterodimeren ergibt sich die Möglichkeit, innerhalb des zur Verfügung stehenden Repertoires an Transkriptionsfaktoren zusätzliche spezifische Regulationsmöglichkeiten zu schaffen. In Dimerisierungsexperimenten mit JUN/FOS- und ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren zeigten die gebildeten Heterodimere eine andere DNA-Bindesepezifität als die jeweiligen Homodimere (Hai and Curran, 1991). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Arbeit von Smith *et al.* (2002), die gezeigt hat, dass das HD-Protein KNOTTED1 (KN1), ebenso wie KIP (Knotted Interacting Protein) schwach, aber spezifisch an ein DNA-Motiv bindet. Erst das Heterodimer aus beiden Proteinen bildet einen starken Komplex mit diesem Motiv aus. Es wäre damit denkbar, dass auch ein ZmHD-Zip1/ZmHD-Zip2-Heterodimer über andere spezifische DNA-Bindeeigenschaften verfügt, als die *in vitro* untersuchten Homodimere. Das Bx2.box-Bindemotiv in den Bx-Promotoren könnte demnach mit seiner Abweichung vom klassischen HD-Zip-Motiv eine spezielle Anpassung an dieses Heterodimer darstellen. Unter den Bedingungen des Protoplastensystems (Kapitel 3.5.1.2) gibt es jedoch keine Hinweise auf gravierende Unterschiede in der Bindeeigenschaft von Homo- und Heterodimer.

4.2 *ZmHD-Zip1 und -2 als mögliche Regulatoren der Bx-Gene*

4.2.1 **ZmHD-Zip1 und -2 wirken als Aktivatoren der Transkription**

In transienten Expressionsstudien mit Maisprotoplasten (Abb. 3.22) führten *ZmHD-Zip1* und *-2* zu einer deutlichen Steigerung der GUS-Grundaktivität des *Bx2.box*-Reportergens, das drei Wiederholungen des *Bx2.box*-Bindemotivs trägt. Durch *ZmHD-Zip1* wurde diese Aktivität durchschnittlich vervierfacht, mit *ZmHD-Zip2* erfolgte eine rund fünffache Steigerung. Bei Verwendung eines Reporterkonstrukts, bei dem das *Bx2.box*-Motiv stark mutiert ist (*Bx2.mut*), erfolgte keine Aktivierung. Diese Ergebnisse bestätigen die spezifische Bindung beider Proteine an das *Bx2.box*-Motiv, die bereits *in vitro* (Kapitel 3.4.4) und in Yeast-One-Hybrid-Experimenten (Kapitel 3.4.3) gezeigt wurde. Die Steigerung der GUS-Grundaktivität des *Bx2.box*-Reporters durch beide HD-Zip-Proteine zeigt außerdem, dass es sich bei *ZmHD-Zip1* und *-2* um Aktivatoren der Transkription handelt. Sie verhalten sich damit wie *Oshox4* und *-5*, die ebenfalls der Klasse I der HD-Zip-Proteine angehören. Dieser Befund stützt die These von Meijer *et al.* (2000), die behaupten, dass es sich bei Klasse-I-HD-Zip-Proteinen generell um Aktivatoren handelt. Klasse-II-HD-Zip-Proteine haben dagegen Repressorfunktion.

Bx2- und *Bx4*-Promotorkonstrukte, die das jeweilige *Bx*-Motiv nur einmal tragen und damit den Verhältnissen in den originalen Promotoren entsprechen, konnten durch *ZmHD-Zip1* und *-2* im Protoplastensystem nicht aktiviert werden (Tab. 3.4). Es wäre daher denkbar, dass beide Proteine die *Bx2.box*-Targetsequenz nur in artifiziellen Konstrukten, in denen das Motiv als Dreifachwiederholung vorkommt, erkennen. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse von Gelretardationsexperimenten, in denen *rZmHD-Zip1* und *rZmHD-Zip2* eine spezifische Bindung an die einfache *Bx2.box*-Sequenz gezeigt haben (Kapitel 3.4.4.3). Prinzipiell binden *ZmHD-Zip1* und *-2* also an ein monomeres *Bx2.box*-Motiv, unter den experimentellen Bedingungen des Protoplastenversuchs ist diese Bindung für die Aktivierung der Reportergene jedoch nicht ausreichend.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis findet sich im transienten Verlauf der *Bx*-Gen-Expression: Die *Bx*-Gene werden in drei bis sieben Tage alten Maiskeimlingen maximal exprimiert, danach nimmt die Stärke der Expression schnell ab (Frey *et al.*, 1995; von Rad *et*

al., 2001). Aus technischen Gründen (Sheen, 2002) wurden die verwendeten Maisprotoplasten aus den Blättern von elf Tage alten Maiskeimlingen gewonnen. In diesem Gewebe sind die *Bx*-Gene nur noch schwach exprimiert. Es wäre daher möglich, dass andere Regulatoren, die für die Transkription der *Bx*-Gene ebenfalls essentiell sind, zu diesem Zeitpunkt nicht mehr exprimiert werden. Ein solches Zusammenwirken verschiedener Transkriptionsfaktoren in der spezifischen Genregulation ist aus vielen Bereichen der pflanzlichen Entwicklung bekannt. Beispiele sind die Regulation der Blütenentwicklung durch MADS-Box-Transkriptionsfaktoren (Egea-Cortines *et al.*, 1999), aber auch die Regulation der Anthocyanbiosynthese bei Mais, bei der R2R3-MYB-Proteine mit bHLH-Proteinen interagieren (Cone *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1987; Martin and Paz-Ares, 1997; Ludwig *et al.*, 1989) oder die Trichomentwicklung bei *Arabidopsis* (Larkin *et al.*, 1994), die durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren kontrolliert wird. Sollte bei der Regulation der DIMBOA-Biosynthese ein ähnlich komplexes regulatorisches Netzwerk vorliegen, so wäre im Protoplastensystem eine Transaktivierung der *Bx2*- und *Bx4*-Promotorkonstrukte durch ZmHD-Zip1 und -2 allein wahrscheinlich nicht möglich. Bei Verwendung des *Bx2.box*-Reportergens, das drei Wiederholungen des *Bx2.box*-Bindemotivs trägt, kommt es möglicherweise durch die gleichzeitige Bindung mehrerer ZmHD-Zip-Proteine an das Dreifachmotiv zu einer Verstärkung der Reportergenaktivierung, so dass in diesem Fall weitere Aktivatoren nicht notwendig sind.

Es muss bei der Interpretation der transienten Genexpressionsexperimente außerdem beachtet werden, dass es sich bei Protoplasten um verletzte Zellen handelt, die keine Zellwand mehr besitzen und sich daher höchstwahrscheinlich anders verhalten als intakte Zellen im Gewebeverband. Es wäre daher möglich, dass in den Protoplasten zum Zeitpunkt der Transfektionsversuche eher das Regulationsprogramm „Stress“ als das entwicklungspezifische Programm des Keimlings abläuft. Damit wäre ebenfalls zu erklären, dass mögliche „Mitspieler“ in der Regulation der DIMBOA-Biosynthesegene, die für eine HD-Zip-vermittelte Reportergenaktivierung notwendig sind, nicht im Zellkern vorhanden sind.

Aufgrund der oben erwähnten Annahmen kann folgende Hypothese aufgestellt werden: ZmHD-Zip1 und -2 binden spezifisch an ein Bindemotiv aus den *Bx*-Promotoren. Diese Bindung erfolgt *in vitro* und in zwei unabhängigen *in-vivo*-Versuchssystemen (Kapitel 3.4.3; 3.4.4; 3.5.1). Durch Bindung an das *Bx2.box*-Motiv wirken ZmHD-Zip1 und -2 als Aktivatoren der Transkription. Für die Aktivierung der DIMBOA-Biosynthesegene ist jedoch aufgrund der Ergebnisse aus Protoplastenexperimenten anzunehmen, dass HD-Zip-Proteine als

Regulatoren dieses Sekundärstoffwechselwegs nicht hinreichend sind, sondern wahrscheinlich im Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Proteinen wirken.

4.2.2 *ZmHD-Zip1::Mu*-Insertionsmutanten zeigen keinen DIMBOA-defizienten Phänotyp

Die Analyse der *ZmHD-Zip1::Mu*-Insertionslinien PV03 115 D-09 und BT94 4 G-12 hat gezeigt, dass in beiden Familien die homozygot vorliegende *Mu*-Insertion zu einem *ZmHD-Zip1*-Knockout führt. Dies konnte durch Quantifizierung der Transkriptmengen von *ZmHD-Zip1* in den Mutanten nachgewiesen werden (Kapitel 3.5.2). Die homozygoten Keimlinge zeigten jedoch weder einen DIMBOA-defizienten Phänotyp (Abb. 3.26 bis 3.28) noch sonstige phänotypischen Ausprägungen, die mit dem Genotyp kosegregieren.

Viele *HD-Zip*-Gene spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung pflanzlicher Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse: Infolge der Analyse von Mutanten wird für *GLABRA2* eine Funktion in der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung (Rerie *et al.*, 1994; Di Cristina *et al.*, 1996) und für *IFL1* (*INTERFASCICULAR FIBERLESS1*) eine Rolle in der Differenzierung der interfazikulären Fasern diskutiert (Zhong and Ye, 1999). Eine Rolle in der pflanzlichen Morphogenese wurde auch für viele andere *HD-Zip*-Gene vorgeschlagen: So scheinen die Gene *ZmOCL1* bis -5 wichtig für die Definition bestimmter Epidermisbereiche in der Embryonalentwicklung von Mais zu sein (Ingram *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 2000). In Überexpressionsstudien mit *ATHB-1* in Tabak konnte gezeigt werden, dass dieses Gen vermutlich eine Funktion in der Blattentwicklung einnimmt (Aoyama *et al.*, 1995). Eine mögliche Rolle als Regulator von Blattgröße und -entwicklung wird auch für *Oshox1* diskutiert (Meijer *et al.*, 1997).

Es ist auffallend, dass über zehn Jahre nach Identifizierung der ersten *HD-Zip*-Gene aus *Arabidopsis* (Schena and Davis, 1992) noch kein mutanter Phänotyp für *HD-Zip*-Gene der Klasse I beschrieben wurde. Die einzigen beschriebenen *HD-Zip*-abhängigen Phänotypen beziehen sich mit *glabra2* und *ifl1* auf die Klassen III und IV (Di Cristina *et al.*, 1996; Zhong and Ye, 1999). Es wäre möglich, dass Gene der Klasse I im pflanzlichen Organismus eine so wichtige Funktion einnehmen, dass ein Ausfall für die Pflanze letal ist. In diesem Fall wird die Funktion des ausgefallenen Gens häufig durch einen anderen Vertreter derselben Klasse übernommen, so dass die Mutation im entsprechenden Gen keinen Phänotyp erzeugt.

ZmHD-Zip1 und -2 zeigen eine überlappende Expression im Maiskeimling (Abb. 3.29). *ZmHD-Zip1::Mu*-Keimlinge zeigen im Vergleich mit Wildtyp-Pflanzen außerdem eine un-

veränderte Expression des Gens *ZmHD-Zip2*. Es wäre daher möglich, dass im Keimlingsstadium *ZmHD-Zip2* die Funktion des mutierten *ZmHD-Zip1*-Gens übernimmt und deshalb in den analysierten Mutanten kein Phänotyp zu beobachten ist. Eine solche funktionelle Redundanz wurde jedoch experimentell noch nicht belegt.

4.2.3 *ZmHD-Zip1* und *-2* zeigen verschiedene Expressionsmuster

Um Informationen über die Expression von *ZmHD-Zip1* und *-2* in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Gewebespezifität zu erhalten, wurden die Transkriptmengen der beiden Gene in verschiedenen Entwicklungsstadien und Organen der Maispflanze bestimmt und mit den jeweiligen Transkriptmengen von *Bx1* und *Bx2* verglichen (Kapitel 3.5.3). Dabei hat sich gezeigt, dass sich beide *HD-Zip*-Gene in ihrer Expression deutlich voneinander unterscheiden: *ZmHD-Zip1* zeigte eine schwache, aber konstant vorhandene Expression in allen untersuchten Keimlingsstadien und Organen der adulten Maispflanze (Kolben, Hüllblätter des Kolbens, Halm, Seide) sowie im Maiskorn (Abb. 3.29). Es ähnelt in dieser durchgehend vorhandenen Expression *ATHB-7*, dem nächst homologen Gen aus *Arabidopsis*. In Northern-Analysen konnte gezeigt werden, dass *ATHB-7* ebenfalls in Stiel, Wurzel, Blüte und Blatt von adulten Pflanzen sowie in Samen exprimiert wird (Söderman *et al.*, 1994). Das beschriebene Expressionsmuster von *ZmHD-Zip1* macht es unwahrscheinlich, dass das entsprechende Genprodukt eine spezifische Rolle als Regulator der keimlingsspezifisch exprimierten DIMBOA-Biosynthesegene einnimmt. Es ist eher möglich, dass *ZmHD-Zip1* eine Funktion erfüllt, die im Keimling und der adulten Pflanze gleichermaßen wichtig ist, wie zum Beispiel die Reaktion auf Umwelteinflüsse oder eine Phytohormon-abhängige Funktion, wie sie für mehrere *HD-Zip*-Gene vorgeschlagen wird. So wird *ATHB-6* als negativer Regulator der ABA-Signaltransduktion diskutiert (Himmelbach *et al.*, 2002). Wie *ATHB-6* werden auch *ATHB-7* und *-12* durch ABA induziert (Söderman *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998). Die Expression des Gens *HAT2* kann dagegen durch das Phytohormon Auxin induziert werden. Es wird daher als Regulator der Auxin-vermittelten Morphogenese diskutiert (Sawa *et al.*, 2002). Eine Phytohormon-abhängige Funktion für *ZmHD-Zip1* muss jedoch experimentell überprüft werden.

ZmHD-Zip2 zeigte in den durchgeführten Lightcycler-Analysen ein Expressionsmuster, das sowohl im zeitlichen Verlauf als auch bezüglich der Gewebespezifität dem der *Bx*-Gene ähnelt (Abb. 3.29): Wie bei den *Bx*-Genen, erfolgt die Expression von *ZmHD-Zip2* keimlingsspezifisch und lichtunabhängig. Schon drei Wochen nach der Keimung ist in Wurzeln und

Blättern keinerlei Transkript für *ZmHD-Zip2*, *Bx1* und *Bx2* mehr nachweisbar. Das Gleiche gilt für alle untersuchten Organe der adulten Maispflanze und das Maiskorn. Mit diesem keimlingsspezifischen, transienten Verlauf der Expression ist es wahrscheinlich, dass *ZmHD-Zip2* auch eine Funktion einnimmt, die spezifisch für das Keimlingsstadium ist, beispielsweise als Regulator von Differenzierungsprozessen. Im Zuge eines komplexen Entwicklungsprogramms könnte als ein Teilaspekt der Keimlingsentwicklung auch die transiente Expression der DIMBOA-Biosynthesegene gesteuert werden.

ZmHD-Zip1 zeigt eine generelle Expression im Keimling und der adulten Pflanze, während *ZmHD-Zip2* eine klare keimlingsspezifische Expression aufweist. Es ist daher denkbar, dass *ZmHD-Zip1* und *-2* an den Überschneidungspunkten ihres zeitlichen Expressionsverlaufs als Heterodimer spezifische Funktionen einnehmen, die sich von den Funktionen der einzelnen Homodimere unterscheiden. Innerhalb des Keimlingsstadiums, in dem beide Gene exprimiert werden, könnte eine solche Funktion beispielsweise die Regulation der DIMBOA-Biosynthese darstellen, da beide Proteine spezifisch an ein Sequenzmotiv aus den Promotoren der beteiligten Gene binden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die chromosomale Lokalisation von *ZmHD-Zip1* auf dem langen Arm von Chromosom 7 (bei Position 100). In unmittelbarer Nähe (bei Position 124) befindet sich auf demselben Chromosom ein QTL (Quantitative Trait Locus) für Resistenz gegen den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*). Diese Lokalisation ist ebenfalls ein Argument dafür, dass *ZmHD-Zip1* an der Regulation der DIMBOA-Biosynthese beteiligt sein könnte, da dieser Sekundärstoffwechselweg ja die Resistenz gegen den Maiszünsler vermittelt. Die DIMBOA-Biosynthesegene selbst befinden sich jedoch mit Ausnahme von *Bx9*, auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (Frey *et al.*, 2003). Auf dem langen Arm desselben Chromosoms ist auch *ZmHD-Zip2* lokalisiert.

4.3 Ausblick

ZmHD-Zip1 und -2 konnten als die ersten beiden *HD-Zip*-Gene der Klasse I aus Mais isoliert werden. Die Genprodukte beider Gene wurden hinsichtlich ihrer DNA-Bindepräferenzen und Dimerisierungseigenschaften bereits ausführlich charakterisiert. *ZmHD-Zip1* und -2 zeigten in mehreren *in-vitro*- und *in-vivo*-Systemen eine spezifische Bindung an ein Sequenzelement der *Bx*-Promotoren, das im Zuge einer bioinformatischen Analyse identifiziert wurde. Da in der Zwischenzeit die Methode der stabilen Maistransformation am Lehrstuhl für Genetik etabliert ist, sollte nun die funktionelle Überprüfung der *cis*-Elemente durch klassische Promotor-Deletions-Analysen erfolgen.

Die stabile Transformation von Mais stellt außerdem ein wichtiges Werkzeug für die weitere funktionelle Charakterisierung von *ZmHD-Zip1* und -2 durch ektopische Expression dar. Viele Hinweise über Funktionen von *HD-Zip*-Genen, beispielsweise von *ATHB-1* (Aoyama *et al.*, 1995), *ATHB-2* (Steindler *et al.*, 1999) oder *Oshox1* (Meijer *et al.*, 1997), gehen auf solche stabilen Transformationen im ursprünglichen oder in anderen Organismen zurück.

Für die *Bx*-Gene wurden bereits ausführliche Analysen der Genexpression sowohl in Hinblick auf deren zeitlichen Verlauf als auch die Gewebespezifität durchgeführt (Frey *et al.*, 1995; Schmäzlin, 2003). Da *ZmHD-Zip2* ein zeitliches Expressionsmuster besitzt, das dem der *Bx*-Gene ähnelt, wäre es interessant, auch den Expressionsort dieses Gens auf zellulärer Ebene aufzuklären und mit dem der *Bx*-Gene zu vergleichen. Dies könnte mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierung erfolgen.

Die Lokalisation von *ZmHD-Zip1* und -2 im Pflanzengewebe könnte in transgenen Pflanzen durch Fusionen der jeweiligen Gene an Markergene wie *GUS* oder *GFP* aufgeklärt werden. Eine zweite Möglichkeit der Detektion von *ZmHD-Zip1* und -2 *in planta* besteht in der Immunlokalisation der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Lokalisation der spezifischen Transkripte sowie der Genprodukte von *ZmHD-Zip1* und -2 würden Auskunft über etwaige Transportmechanismen geben. So konnte beispielsweise für KNOTTED1 gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor, ebenso wie seine mRNA, über Plasmodesmata zwischen verschiedenen Zellen und Zellschichten verlagert werden kann (Lucas *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002). Dieser Transportmechanismus stellt wahrscheinlich eine wichtige Möglichkeit der interzellulären Kommunikation dar und ermöglicht so die koordinierte Entwicklung verschiedener Zellschichten.

5 Zusammenfassung

DIMBOA stellt einen wichtigen Sekundärmetaboliten der generellen pflanzlichen Abwehr in Mais dar. Die an der DIMBOA-Biosynthese beteiligten *Bx*-Gene zeigen bezüglich des zeitlichen Verlaufs und der Gewebespezifität ihrer Transkripte ein ähnliches Expressionsmuster. Aufgrund dieser Koexpression wurde angenommen, dass die an der DIMBOA-Biosynthese beteiligten Gene einer Koregulation durch gemeinsame Transkriptionsfaktoren unterworfen sind. In einer bioinformatischen Promotoranalyse der *Bx*-Gene konnte ein konserviertes Sequenzmotiv identifiziert werden, dessen Kernmotiv TAATT lautet (*Bx*-Motiv).

In einem Yeast-One-Hybrid-Screen wurde erstmals ein *HD-Zip*-Gen der Klasse I aus Mais identifiziert. Das Gen wurde *ZmHD-Zip1* genannt. Sein Genprodukt bindet als Transkriptionsfaktor spezifisch an ein Motiv (*Bx2*.box) aus dem *Bx2*-Promotor der DIMBOA-Biosynthese und wirkt dadurch als Aktivator der Transkription.

In einem Yeast-Two-Hybrid-Screen konnte ein weiteres *HD-Zip*-Gen der Klasse I identifiziert werden, dessen Genprodukt über die Leucin-Zipper-Domäne spezifisch mit *ZmHD-Zip1* interagiert. Das Gen wurde *ZmHD-Zip2* genannt.

ZmHD-Zip1 und -2 zeigen im Hefesystem, aber auch in transfizierten Maisprotoplasten und *in vitro* eine spezifische Bindung an das *Bx2*.box-Bindemotiv aus dem Promotor des DIMBOA-Biosynthesegens *Bx2*. Beide Proteine sind in der Lage, Homodimere und Heterodimere mit dem jeweils anderen Protein auszubilden.

ZmHD-Zip2 zeigte in Lightcyler-Analysen ein keimlingsspezifisches, transientes Expressionsmuster, das sich mit dem der *Bx*-Gene überschneidet. Es ist daher möglich, dass dieses Gen eine Funktion in der Entwicklung und Differenzierung des Maiskeimlings einnimmt und im Zuge dessen auch die Expression der an der DIMBOA-Biosynthese beteiligten Gene als einer mehrerer Regulatoren beeinflusst.

ZmHD-Zip1 zeigt eine schwache, aber konstant vorhandene Expression im Keimling, der adulten Maispflanze und im Maiskorn. Es ist also möglich, dass dieses Gen eine Funktion im Keimling und der adulten Pflanze einnimmt. Außerdem ist denkbar, dass *ZmHD-Zip1* als Heterodimerisierungspartner von *ZmHD-Zip2* ebenfalls an der keimlingsspezifischen Regulation der DIMBOA-Biosynthese beteiligt ist.

6 Literatur

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F. *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.
- Aoyama, T., Dong, C.-H., Wu, Y., Carabelli, M., Sessa, G., Ruberti, I., Morelli, G. and Chua, N.-H. (1995) Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* **7**: 1773-1785.
- Aso, K., Kato, M., Banks, J.A. and Hasebe, M. (1999) Characterization of Homeodomain-Leucine Zipper Genes in the Fern *Ceratopteris richardii* and the Evolution of the Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family in Vascular Plants. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 544-552.
- Bailey, B.A. and Larson, R.L. (1991) Maize microsomal benzoxazinone N-monooxygenase. *Plant Physiol.* **95**: 792-796.
- Baima, S., Nobili, F., Sessa, G., Lucchetti, S., Ruberti, I. and Morelli, G. (1995) The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 4171-4182.
- Benson, R.J., Johal, G.S., Crane, J.T., Tossberg, J.T., Schnable, P.S., Meeley, R.B. and Briggs, S.P. (1995) Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell* **7**: 75-84.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bullock, W.O., Fernandez, F.M. and Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming rec A *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- Cambier, V., Hance, T. and de Hoffmann, E. (2000) Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry* **53**: 223-229.
- Cone, K.C., Burr, F.A. and Burr, B. (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *PNAS* **83**: 9631-9635.
- Cone, K.C., Cocciolone, S.M., Burr, F.A., Burr, B. (1993) Maize anthocyanin regulatory gene pl is a duplicate of c1 that functions in the plant. *Plant Cell* **5**: 1795-1805.
- Cuevas, L., Niemeyer, H.M. and Pérez, F.J. (1990) Reaction of DIMBOA, a resistance factor from cereals, with α -Chymotrypsin. *Phytochemistry* **29**: 1429-1432.
- Deng, X., Phillips, J., Meijer, A.H., Salamini, F. and Bartels, D. (2002) Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* **49**: 601-610.

- Di Cristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I. and Morelli, G. (1996) The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is a protein required for regulation of root hair development. *Plant J.* **10**: 393-402.
- Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* **4**: 394-400.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. and Eledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555-569.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., Sommer, H. (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**: 5370-5379.
- Eulgem T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**: 199-206.
- Facchini, P.J. (1999) Plant secondary metabolism: out of the evolutionary abyss. *Trends Plant Sci.* **4**: 382-384.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fields, S. (1993) The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Methods: A Companion to Methods Enzymol.* **5**: 116-124.
- Frey, M., Reinike, J., Grant, S., Saedler, H. and Gierl, A. (1990) Excision of the En/Spm transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins. *EMBO J.* **9**: 4937-4944.
- Frey, M., Kliem, R., Saedler, H. and Gierl, A. (1995) Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 100-109.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grün, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K. and Gierl, A. (1997) Analysis of a chemical defense mechanism in grasses. *Science* **277**: 696-699.
- Frey, M., Huber, K., Park, W.J., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R.B., Simmons, C.R., Yalpani, N. and Gierl, A. (2003) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* **62**: 371-376.
- Friebe, A., Schulz, M., Kück, P. and Schnabl, H. (1995) Phytotoxins from shoot extracts and root exudates of *Agropyron repens* seedlings. *Phytochemistry* **38**: 1157-1159.
- Gehring, W.J., Quian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wüthrich, K. (1994) Homeodomain-DNA Recognition. *Cell* **78**: 211-223.
- Glawischnig, E. (1997) Biochemische und genetische Aufklärung der Biosynthese von Benzoxazinonen in *Zea mays*. Dissertation, Technische Universität München.

- Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T. and Hagen, G. (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 619-627.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1987) Biochemical responses of plants to pathogens. *In: Offprints from innovative approaches to plant disease control* (I. Chet, ed.) John Wiley and Sons, pp. 229-254.
- Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *PNAS* **88**: 3720-3724.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Microbiol.* **166**: 557-580.
- Heath, M.C. (1985) Implications of nonhost resistance for understanding host parasite interactions. *In "Genetic Basis of Biochemical Mechanisms of Plant Disease"* (J.V. Groth, W.R. Bushnel, Eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. pp. 25-42.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. and Bailey, P.C. (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 735-747.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B. and Grill, E. (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**: 3029-3038.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Ingram, G.C., Magnard, J.-L., Vergne, P., Dumas, C. and Rogowsky, P.M. (1999) *ZmOCLI*, an HDGL2 family homeobox gene, is expressed in the outer cell layer throughout maize development. *Plant Mol. Biol.* **40**: 343-354.
- Ingram, G.C., Boissard-Lorig, C., Dumas, C. and Rogowsky, P.M. (2000) Expression patterns of genes encoding HD-ZipIV homeodomain proteins define specific domains in maize embryos and meristems. *Plant J.* **22**: 401-414.
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G.W., Montagu, M.V. and Okamoto, J.K. (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* **6**: 1211-1225.
- Johannesson, H., Wang, Y. and Engström, P. (2001) DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* **45**: 63-73.
- Jones, P. and Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**: 164-174.
- Kim, J.Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-Jagani, Z. and Jackson, D. (2002) Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. *PNAS* **99**: 4103-4108.

- Koroleva, O.A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M.R., Tomos, A.D. and Hedrich, R. (2000) Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol.* **124**: 599-608.
- Kutchan, T.M. (1995) Alkaloid biosynthesis - The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* **7**: 1059-1070.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. *et al.* (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Lloyd, A.M., Papanozzi, E.T. and Marks, M.D. (1994) Roles of the *GLABROUS1* and *TRANSPARENT TESTA GLABRA* genes in *Arabidopsis* trichome development. *Plant Cell* **6**: 1065-1076.
- Lawton, M.A. and Lamb, C.J. (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Mol. Cell Biol.* **7**: 335-341.
- Lee, Y. and Chun, J. (1998) A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol. Biol.* **37**: 377-384.
- Levine, M. and Tjian, R. (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**: 147-151.
- Liansen, L., White, M.J. and MacRae, T.H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants. *Eur. J. Biochem.* **262**: 247-257.
- Lloyd, A.M., Walbot, V. and Davis, R.W. (1992) Anthocyanin production in dicots activated by maize anthocyanin-specific regulators *R* and *C1*. *Science* **258**: 1773-1777
- Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20.
- Lucas, W.J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. and Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**: 1980-1983.
- Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L. and Wessler, S.R. (1989) *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. *PNAS* **86**: 7092-7096.
- Martin, C. and Paz-Ares, J. (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet.* **13**: 67-73.
- Marzabal, P., Busk, P.K., Ludevid, M.D. and Torrent, M. (1998) The bifactorial endosperm box of γ -zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZM *cis*-acting elements. *Plant J.* **16**: 41-52.

- Mayda, E., Tornereo, P., Conejero, V. and Vera, P. (1999) A tomato homeobox gene (HD-Zip) is involved in limiting the spread of programmed cell death. *Plant J.* **20**: 591-600.
- Meijer, A.H., Scarpella, E., van Dijk, E.L., Qin, L., Taal, A.J.C., Rueb, S., Harrington, S.E., McCouch, S.R., Schilperoort, R.A. and Hoge, J.H.C (1997) Transcriptional repression of *Oshox1*, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *Plant J.* **11**: 263-276.
- Meijer, A.H., de Kam, R.J., d'Erfurth, I., Shen, W. and Hoge, J.H.C. (2000) HD-Zip proteins of families I and II from rice: interactions and functional properties. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 12-21.
- Melanson, D., Chilton, M.-D., Masters-Moore, D. and Chilton, W.S. (1997) A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of *bxbx* maize. *PNAS* **94**: 13345-13350.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W., 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.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2001) The Arabidopsis *TT2* gene encodes a R2R3 Myb domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**: 2099-2114.
- Niemeyer, H.M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* **27**: 3349-3358.
- Nishitani, C., Demura, T. and Fukuda, H. (2001) Primary phloem-specific expression of a *Zinnia elegans* homeobox gene. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1210-1218.
- Nultsch, W. (1996) Allgemeine Botanik, 10. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ohashi-Ito, K., Demura, T. and Fukuda, H. (2002) Promotion of Transcript Accumulation of Novel *Zinnia* Immature Xylem-Specific HD-ZipIII Homeobox Genes by Brassinosteroids. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1146-1153.
- Ohnhäuser, R. (2000) Analyse der Promotorelemente des Gens *Bx4* von *Zea mays* mit Hilfe von Reportergenkonstrukten. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Oikawa, A., Ishihara, A., Hasegawa, M., Kodama, O. and Iwamura, H. (2001) Induced accumulation of 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside (HDMBOA-Glc) in maize leaves. *Phytochemistry* **56**: 669-675.
- Osborn, A. (1996): Saponins and plant defence – a soap story. *Trends Plant Sci.* **1**: 4-9.
- Palena, C.M., Gonzalez, D.H. and Chan, R.L. (1999) A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA. *Biochem. J.* **341**: 81-87.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A. and Saedler, H. (1987) The regulatory *c1* 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.

Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B. and Grotewold, E. (1999) Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* **153**: 427-444.

Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. and Meijer, J. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*. *Plant Mol. Biol.* **42**: 93-113.

Rerie, W.G., Feldmann, K.A., Marks, M.D. (1994) The GLABRA2 gene encodes a homeodomain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **8**: 1388-1399.

Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* **379**: 633-646.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.-L. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110.

Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription of RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 327-335.

Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.

Sahi, S.V., Chilton, M.-D. and Chilton, W.S. (1990) Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS* **87**: 3879-3883.

Sakakibara, K., Nishiyama, T., Kato, M. and Hasebe, M. (2001) Isolation of homeodomain-leucine zipper genes from the moss *Physcomitrella patens* and the evolution of homeodomain-leucine zipper genes in land plants. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 491-502.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklein, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.

Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S. and Koshiba, T. (2002) The *HAT2* gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 1011-1022.

Schena, M. and Davis, R.W. (1992) HD-Zip proteins: Members of an *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *PNAS* **89**: 3894-3898.

Schena, M. and Davis, R.W. (1994) Structure of the homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. *PNAS* **91**: 8393-8397.

- Schmälzlin, K. (2003) Expressionsanalyse der DIMBOA-Biosynthese in *Zea mays*. Dissertation, Technische Universität München.
- Sessa, G., Morelli, G. and Ruberti, I. (1993) The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J.* **12**: 3507-3517.
- Sessa, G., Carabelli, M., Ruberti, I., Lucchetti, S., Baima, S. and Morelli, G. (1994) Identification of distinct families of HD-Zip proteins in *Arabidopsis thaliana*. In: P. Puigdomènech and G. Coruzzi (Eds.) Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism, Springer-Verlag, Berlin, pp. 411-426.
- Sessa, G., Morelli, G. and Ruberti, I. (1997) DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J. Mol. Biol.* **274**: 303-309.
- Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G. and Ruberti, I. (1998) The Arabidopsis *Athb-8*, *-9* and *-14* genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Mol. Biol.* **38**: 609-622.
- Sheen, J. (2002) A transient expression assay using maize mesophyll protoplasts. (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>)
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M. and Gierl, A. (2000) Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int. Rev. Cyt.* **198**: 319-345.
- Smith, H.M.S., Boschke, I. and Hake, S. (2002) Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *PNAS* **14**: 9579-9584.
- Söderman, E., Mattson, J., Svenson, M., Borkird, C. and Engström, P. (1994) Expression patterns of novel genes encoding homeodomain leucine-zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **26**: 145-154.
- Söderman, E., Mattson, J. and Engström, P. (1996) The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* **10**: 375-381.
- Sommer, H., Beltan, J.-P., Hujser, P., Pape, H., Lönning, W.-E., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Z. (1990) Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*, the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**: 605-613.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. and Ruberti, I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* **126**: 4235-4245.
- Stettner, C. (1998) DIMBOA-Biosynthese in Mais: Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *Bx1*-Gens. Dissertation, Technische Universität München.
- Studier, F.W. and Mofat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Tang, Z., Sadka, A., Morishige, D.T. and Mullet, J.E. (2001) Homeodomain leucine zipper

proteins bind to the phosphate response domain of the soybean *VspB* tripartite promoter. *Plant Physiol.* **125**: 797-809.

The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-813.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.

van der Fits, L., Zhang, H., Menke, F.L.H., Deneka, M. and 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.

van der Fits, L. and Memelink, J. (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *SCIENCE* **289**: 295-297.

van der Fits, L. and Memelink, J. (2001) The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J.* **25**: 43-53.

VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. and Farmer, E.E. (1994) Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell* **6**: 1191-1192.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.

Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. and Hake, S. (1991) The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**: 241-243.

von Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A. and Frey, M. (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J.* **28**: 633-642.

Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D. and Gray, J.C. (1999) The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**: 1337-1349.

Wang, M.M. and Reed, R.R. (1993) Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* **364**: 121-126.

Wang, Y. (2001) The role of the homeobox gene *ATHB16* in development regulation in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, University of Uppsala.

Weisshaar, B., Block, A., Armstrong, G.A., Herrmann, A., Schulze-Lefert, P. and Hahlbrock, K. (1991) Regulatory elements required for light-mediated expression of the *Petrorelinum crispum* chalcone synthase gene. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **45**: 191-210.

Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M. and Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**: 1296-1300.

Wittstock, U. and Gershenzon, J. (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 1-8.

Wittstock, U. and Halkier, B.A. (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci.* **7**: 263-270.

Wolfertstetter, F., Frech, K., Herrmann, G. and Werner, T. (1996) Identification of functional elements in unaligned nucleic acid sequences by a novel tuple search algorithm. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 71-80.

Wood, W.B. (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutants affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* **16**: 118-133.

Woodward, M.D., Corcuera, L.J., Helgeson, J.P., Kelman, A. and Upper, C.D. (1978) Factors that influence the activity of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one on *Erwinia* species in growth assays. *Plant Physiol.* **61**: 803-805.

Zhong, R. and Ye, Z.-H. (1999) *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**: 2139-2152.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Alfons Gierl für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung eines interessanten Themas und sein stetes Interesse an meiner Arbeit bedanken. Mein Dank gilt ebenso meiner Betreuerin Dr. Monika Frey für das große Engagement, die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und stete Offenheit, Neues auszuprobieren.

Bei Dr. Karolin Schmäzlin bedanke ich mich für die mehrjährige gute Nachbarschaft an der Laborbank und die schönen Tratsch-Abende. Danke an Dr. Ulrich Genschel für die vielen Gespräche über Wissenschaft und so weiter. Bei Peter Weber möchte ich mich ganz herzlich für wissenschaftliche und andere Diskussionen sowie diverse Rettungsaktionen in Sachen Computer bedanken. Danke an Verena Kriechbaumer, Gerti Spielbauer, Rafal Jonczyk, Silvia Ronconi und Sabine Merl für die netten Kaffeepausen und gegenseitige Seelsorge. Bei Regina Hüttl möchte ich mich ganz herzlich für die vielen Sequenzierungen und die große Hilfe bei der Genotypisierung der Mutanten bedanken.

Allen weiteren Mitarbeitern am Lehrstuhl für Genetik, Dr. Erich Glawischnig, Dr. Ramon Torres Ruiz, Dr. Christine Schäfer, Hedi Kellner, Dr. Oksana Kortes, Dr. Woong June Park, Katrin Schullehner, Dr. Regina Schuegger, Thomas Rauhut, Birgit Treml, Peter Dobos, Heidi Miller-Mommerskamp und Stefanie Dommel danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Meinen Praktikanten und „Hiwis“ Anne Osterrieder, Kathi Lange, Martin Brauner, Anja Kriegeskorte, Nicola Schumacher, Veronika Zapilko und Lucas Martin danke ich für die Mitarbeit an meinem Projekt.

Ich danke Prof. Dr. Erwin Grill, der es mir ermöglicht hat, Versuche in seinem Labor durchzuführen. Bei Frau Yulin Tang möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfsbereitschaft und Geduld, mit der sie mich in die Methode der Protoplastentransfektion eingeführt hat, bedanken. Danke an Dr. Axel Himmelbach für seine stete Diskussionsbereitschaft auf dem Weg von und zum Wissenschaftszentrum.

Mein besonderer Dank gilt natürlich der DFG, die mich zuerst im Rahmen des SFB 369 „Molekulare und bioorganische Grundlagen des Sekundärstoffwechsels“ und später innerhalb eines Einzelprojekts gefördert hat.

Ich danke unseren Kooperationspartnern von Pioneer Hi-Bred für die gute Zusammenarbeit auf der Suche nach Regulatoren der DIMBOA-Biosynthese und für die Bereitstellung der *ZmHD-Zip1::Mu*-Insertionslinien.

Danke an Matthias Frisch und Dr. Thomas Werner von der Genomatix Software GmbH für die gute Kooperation bei der Durchführung einer *in-silico*-Promotoranalyse.

Meinem Freund Stefan danke ich für die Zeit des gemeinsamen Forschens im Garching Chemiegebäude, für die große Unterstützung und Begleitung bei meiner Promotion und im Rest des Lebens und dafür, dass er immer an mich und uns glaubt.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern und allen Familienmitgliedern bedanken, die sich immer geduldig meine Berichte über den aktuellen Stand der Forschung angehört haben, alle Hochs und Tiefs miterlebt haben, mich stets ermutigt und unterstützt haben und immer für mich da sind.