

Lehrstuhl für Genetik der
Technischen Universität München

Expressionsanalyse der DIMBOA-Biosynthese in *Zea mays*

Dipl.-Biol. Univ. Karolin Schmäzlin

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

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

Die Dissertation wurde am 11.12.2002 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 14.01.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Sekundärstoffwechsel bei Pflanzen.....	1
1.2 Der DIMBOA-Biosyntheseweg	2
1.3 Einbindung in den Primärmetabolismus	5
1.4 Ziel der Arbeit	7
2. Material und Methoden	10
2.1 Material und Bezugsquellen.....	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 Pflanzenmaterial	11
2.1.5 Verwendete Vektoren.....	11
2.1.6 Primer	12
2.1.7 Antikörper	14
2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	14
2.2.1 Isolierung von DNA	14
2.2.2 Southern Analyse von Phagen-DNA aus cDNA/genomischen Banken	14
2.2.3 Sequenzierungen	15
2.2.4 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese	15
2.2.5 PCR	16
2.2.6 „real time PCR“ mit dem Lightcycler	16
2.2.7 Klonierungen.....	17
2.2.7.1 Konstrukte für heterologe Expression des ZmASA2-Proteins in <i>E. coli</i>	17
2.2.7.2 Konstrukte für Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	18
2.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	18
2.3.1 Gewinnung von heterolog exprimierten Proteinen	18
2.3.2 Proteingewinnung aus Maiskeimlingen	18
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
2.3.4 Western-Analyse	19
2.4 Histologische Arbeitsmethoden	20
2.4.1 Fixierung von Maiskeimlingen	20
2.4.2 Technik der <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	20

2.4.2.1 Herstellung der Sonden	20
2.4.2.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung	21
2.5 Naturstoffanalysen	23
2.5.1 Benzoxazinon-Färbung mit Eisenchlorid.....	23
2.5.2 Isolierung von DIMBOA und HPLC-Analyse.....	23
3. Ergebnisse	25
3.1 Isolierung von Anthranilatsynthasegenen aus Mais.....	25
3.1.1 Isolierung der cDNA von <i>ZmAsa1</i> und <i>ZmAsa2</i>	25
3.1.2 Isolierung der genomischen Klone von <i>ZmAsa1</i> und <i>ZmAsa2</i>	26
3.1.3 Vergleichende Charakterisierung von <i>ZmAsa1</i> und <i>ZmAsa2</i>	32
3.1.4 Heterologe Expression von <i>ZmAsa2</i>	34
3.2 Experimente auf RNA-Ebene.....	34
3.2.1 Quantitative real time-PCR mit dem Lightcycler	34
3.2.1.1 Verwendetes Pflanzenmaterial	34
3.2.1.2 Analyse von Primärwurzeln von <i>Z. mays</i>	36
3.2.1.3 Analyse von Embryonal- und Kronwurzeln von <i>Z. mays</i>	37
3.2.1.4 Analyse der Mutante <i>lrt1</i>	38
3.2.2 <i>In situ</i> -Hybridisierungen	39
3.2.2.1 Auswahl der Sonden.....	40
3.2.2.2 Ergebnisse der <i>in situ</i> -Hybridisierungsexperimente.....	41
3.3 Experimente auf Protein-Ebene.....	44
3.3.1. Westernanalyse von Primärwurzeln.....	44
3.3.2 Die Mutante <i>lrt1</i>	45
3.4 Experimente auf Endprodukt-Ebene	46
3.4.1 DIMBOA-Isolation und HPLC-Analyse.....	46
3.4.2 Benzoxazinon-Färbung	47
4. Diskussion	50
4.1 Die α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen <i>ZmAsa1</i> und <i>ZmAsa2</i>	50
4.1.1 Genstruktur von <i>ZmAsa1</i> und <i>ZmAsa2</i>	50
4.1.2 Vergleich verschiedener α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen	51
4.1.3 Expression von <i>ZmAsa1</i> und <i>ZmAsa2</i>	56
4.2 Techniken der Expressionsanalyse und ihre Grenzen.....	56
4.2.1 Quantitative PCR.....	56
4.2.2 <i>In situ</i> -Hybridisierungen	57

4.3 Die DIMBOA-Biosynthese: Verteilungsmuster der mRNA und Proteine der beteiligten Gene und des Endprodukts.....	58
4.4 Wird das DIMBOA-Glucosid transportiert?	61
4.5 Das übereinstimmende Entwicklungsprogramm der Maiswurzeln	63
5. Zusammenfassung.....	65
6. Literaturverzeichnis.....	67
7. Anhang	73
Danksagung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIBOA	2,4-Dihydroxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DIFFZ	Differenzierungszone
DIMBOA	2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-Tetraessigsäure
Eppi	Eppendorf-Tube
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
G	Guanin
GAPDHC	cytosolische Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAc	Essigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	1-Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
MeOH	Methanol
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure

mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
OD _x	Optische Dichte bei <i>x</i> nm Wellenlänge
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Wurzelspitze
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Gelelektrophorese-Puffer
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethyldiamin
TRIBOA	2,4,7-Trihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜBZ	Übergangszone
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp

Zusätzlich wurden die Einbuchstabencodes für Aminosäuren und Nukleotide verwendet, sowie SI-Einheiten und die Symbole für die chemischen Elemente.

1. Einleitung

1.1 Sekundärstoffwechsel bei Pflanzen

„Die Existenz der gesamten Lebewesen auf unserer Erde ist an die autotrophe Pflanze gebunden: d.h., dass sie ihnen als Mittlerin der Sonnenenergie als Nahrung dienen muss. Die Pflanze ist daher dazu da, gefressen zu werden, und es würde diesem klar erkennbaren Prinzip, das das Lebensgetriebe auf unserer Erde beherrscht, widersprechen, wenn die Pflanze sich vor dieser Bestimmung schützen würde.“ Diese aus heutiger Sicht nicht nachvollziehbare Behauptung wurde von Josef G. Kisser im Handbuch der Pflanzenphysiologie 1958 in einem Kapitel über die ökologische Bedeutung der Terpenausscheidungen aufgestellt (Kisser, 1958). Sekundärstoffwechselprodukte in Pflanzen wurden vor 44 Jahren zum Teil noch als Abfall- oder Entgiftungsprodukte ohne weitere Aufgaben angesehen. Die chemischen Eigenschaften der Sekundärmetabolite wurden bereits seit der Mitte des 19. Jahrhunderts von organischen Chemikern untersucht (Buchanan *et al.*, 2000). Inzwischen werden Sekundärmetabolite als Stoffe angesehen, die für die Interaktionen der Pflanzen mit ihrer Umwelt zuständig sind (Hartmann, 1996). Beispiele sind die Abwehr von Schädlingsbefall, das Anlocken von bestäubenden und Samen verteilenden Insekten und Tieren und allelopathische Effekte. Dienen Sekundärmetabolite von Pflanzen der Abwehr von Schädlingen, kann man zwei Prinzipien unterscheiden. Phytoalexine werden als Antwort auf eine Schädigung durch ein Pathogen gebildet, Phytoantizipine werden konstitutiv gebildet (Osbourn, 1996). Um eine Selbstschädigung zu vermeiden, werden Phytoantizipine in speziellen Zellen aufbewahrt (z.B. Harzgänge, Milchröhren und Drüsenzellen), in die Zellwand eingelagert (z.B. Gerbstoffe) oder in einer inaktiven Form akkumuliert. Das zur Aktivierung benötigte Enzym ist meist in einem anderen Zellkompartiment vorhanden und kommt erst bei Schädigung der Zellstruktur mit seinem Substrat in Kontakt (Cicek und Esen, 1998). Neben dem unmittelbaren Nutzen für die Pflanze stellen die Sekundärmetabolite eine potentielle Quelle für die Entwicklung neuer Medikamente dar.

Die Vielfalt der sekundären Pflanzenstoffe ist sehr groß und damit auch die Anzahl der beteiligten Gene. Selbst bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., die vergleichsweise wenig Sekundärstoffe produziert, wird angenommen, dass ungefähr ein Viertel aller Gene (d.h. ca. 5000) am Sekundärmetabolismus beteiligt sind (The *Arabidopsis* genome initiative 2000). Einige Sekundärstoffwechselwege sind in Pflanzen vollständig aufgeklärt. Sind die an Stoffwechselwegen beteiligten Gene und Enzyme bekannt, kann man die Regulation dieser

Gene durch Transkriptionsfaktoren untersuchen. Sekundärmetabolite werden häufigentwicklungsspezifisch, in definierten Geweben oder nach Induktion durch exogene Faktoren gebildet. Beispiele für gut untersuchte Biosynthesewege sind die Anthocyanbiosynthese, die Synthese von Vinblastin und die Synthese von DIMBOA in *Z. mays*. Die Anthocyanbiosynthese wurde vor allem in *Z. mays*, *Anthirrinum majus* und *Petunia hybrida* untersucht (Holton und Cornish, 1995). Anthocyane besitzen viele Funktionen in Pflanzen. Neben der Färbung der Blütenblätter und Samen zur Anlockung nützlicher Insekten können Anthocyane auch zur Abschreckung von Fraßfeinden und zum Schutz vor UV-Strahlung dienen. In vielen Pflanzen sind Transkriptionsfaktoren bekannt, die die Anthocyanbiosynthese regulieren (Holton und Cornish, 1995). Ein weiterer, sehr gut untersuchter Stoffwechselweg ist der des Terpenoid-Indol-Alkaloids Vinblastin in *Catharanthus roseus*. Bei diesem Biosyntheseweg sind neben den Biosynthesegenen ebenfalls einige beteiligte Transkriptionsfaktoren isoliert (Vom Endt *et al.*, 2002). Die Orte der Expression wurden für frühe und späte Schritte der Vinblastinbiosynthese untersucht (St-Pierre *et al.* 1999). Mit *in situ*-Hybridisierungen konnte festgestellt werden, dass die Gene für die frühen Syntheseschritte in der Epidermis der Stengel, Blätter und Blütenknospen lokalisiert sind, wohingegen die Gene für die letzten beiden Syntheseschritte in Milchröhrenzellen und Idioblasten exprimiert werden. Diese räumliche Aufteilung von Biosynthesewegen ist häufig beschrieben. Die Synthese der Pyrrolizidinalkaloide (PAs) in *Senecio spec.* ist auf unterschiedliche Pflanzenorgane verteilt. Senecionine-*N*-oxid, die Grundstruktur der PAs in *Senecio spec.* wird in Wurzeln synthetisiert, über das Phloem in den Spross transportiert und dort chemisch verändert (Ober und Hartmann, 2000). Durch Immunohistologische Experimente konnte gezeigt werden, dass die Homospermidinsynthase, das erste Enzym der PA-Synthese in der Endodermis der Wurzeln in der Nähe des Phloems lokalisiert ist (Moll *et al.*, 2002). Wiederum scheinen Teile der Biosynthese auf bestimmte Zelltypen beschränkt zu sein.

1.2 Der DIMBOA-Biosyntheseweg

Benzoxazinone sind eine wichtige Klasse von Sekundärmetaboliten und kommen hauptsächlich in den monokotylen Gramineen vor. Auch bei dikotylen Pflanzen sind einzelne Vertreter der Acanthaceae, Ranunculaceae und Scrophulariaceae bekannt, die Benzoxazinone produzieren (Sicker *et al.*, 2000). In Mais (*Zea mays*) und Weizen (*Triticum aestivum*) ist das vorherrschende Benzoxazinon DIMBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on), in Roggen (*Secale cereale*) DIBOA (2,4-Dihydroxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on). Benzoxazinone sind Komponenten der generellen Pflanzenabwehr von Schädlingen. Im

Gegensatz zur spezifischen Resistenz werden durch die generelle Abwehr eine Vielzahl unterschiedlicher Insekten und Pathogene gehemmt (Sicker *et al.*, 2000). In Mais und Weizen korreliert der Gehalt an Benzoxazinonen mit der Resistenz gegen Schädlinge (Niemeyer, 1988). Benzoxazinone wirken gegen Bakterien, Pilze und Insekten. Gut untersucht ist zum Beispiel die Wirkung von DIMBOA aus Mais gegen den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*). Das Benzoxazinon führt bei diesem Hauptschädling zu verringertem Larvenwachstum, erhöhter Mortalitätsrate und geringerer Reproduktivität (Klun *et al.*, 1970). DIMBOA wirkt auch allelopathisch und autotoxisch (Sicker *et al.*, 2000). Bei Mais und Weizen konnte die Ausscheidung von DIMBOA über die Wurzeln nachgewiesen werden (Collantes *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2001).

Die Synthese von DIMBOA in Mais findet hauptsächlich in Keimlingen statt. Die höchste Konzentration von DIMBOA ist in zwei Tage alten Keimlingen vorhanden (Cambier *et al.*, 2000). Von zwei bis zehn Tagen sinkt zwar die DIMBOA-Konzentration in den Keimlingen, aber der Gesamtgehalt nimmt zu. DIMBOA wird also weiterhin produziert. Nach zehn Tagen nimmt der DIMBOA-Gehalt stark ab, es wird vermutlich in diesem Stadium aktiv abgebaut oder ausgeschieden (Cambier *et al.*, 2000). Benzoxazinone können als Phytoantizipine bezeichnet werden. Die weniger toxischen Glucoside werden in der Vakuole gelagert. Eine Glucosidase, die das toxische Aglucon produziert, ist im Chloroplasten lokalisiert (Esen, 1992, Cicek und Esen, 1998). Im intakten Zustand kommen Enzym und Substrat nicht in Kontakt. Wird die Zellintegrität durch Schädigung (z. B. durch Herbivoren) zerstört, wird das toxische DIMBOA-Aglucon freigesetzt.

Der Biosyntheseweg von DIMBOA konnte in Mais fast vollständig aufgeklärt werden (Frey *et al.*, 1997, v. Rad *et al.*, 2001) und geht von Indolglycerin-3-phosphat aus (Abb. 1). Das erste Enzym der DIMBOA-Biosynthese ist die Indolglycerinphosphatlyase BX1. Dieses Enzym besitzt Ähnlichkeit zur α -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) und definiert den Verzweigungspunkt Primär-/Sekundärstoffwechsel. Gene von Sekundärstoffwechselwegen sind häufig durch Duplikation und Diversifikation von Primärstoffwechselgenen entstanden. Die Duplikation der α -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *Zea mays* ist ein Beispiel hierfür (Gierl und Frey, 2001). Die Tryptophansynthase ist in Bakterien gut charakterisiert. Sie ist ein heterotetrameres Enzym, das aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten besteht und dessen Aktivität in dieser Kombination am höchsten ist (Creighton und Yanofsky, 1966). Für die Tryptophansynthase von Pflanzen scheint dasselbe zuzutreffen (Radwanski *et*

al., 1995). Die α -Untereinheit (TSA) katalysiert die Umwandlung von Indolglycerinphosphat zu Indol, die β -Untereinheit (TSB) die weitere Reaktion zu Tryptophan. Das entstehende Indol wird dabei nicht freigesetzt. Die zu der α -Untereinheit der Tryptophansynthase homologen Gene, BX1 und IGL (Indolglycerinphosphatlyase) sind für Reaktionen des Sekundärstoffwechsels zuständig. Beide Enzyme benötigen im Gegensatz zu TSA keine β -Untereinheit zur Aktivierung und setzen Indol frei (Gierl und Frey, 2001). Das *Igl*-Gen wird durch Volicitin induziert, das im Speichel des „Beet armyworms“ enthalten ist. Das nachfolgend synthetisierte Indol lockt zusammen mit einem Gemisch verschiedener Terpenoide Schlupfwespen an, die durch Eiablage in die Raupen den „Beet armyworm“ schädigen (Frey *et al.*, 2000). BX1 liefert Indol für die DIMBOA-Biosynthese. Weitere Beispiele für die Öffnung von Sekundärstoffwechselwegen durch Duplikation eines Gens aus dem Primärstoffwechsel sind die Homospermidinsynthase von *Senecio spec.*, die aus einer Duplikation der Deoxyhyphusinsynthase entstanden ist (Ober und Hartmann, 2000) und in *Arabidopsis thaliana* ein Serin-Carboxypeptidase-ähnliches Protein, das im Sekundärstoffwechsel als Acyltransferase funktioniert (Lehfeldt *et al.*, 2000).

Das durch BX1 produzierte Indol wird durch vier Hydroxylierungen und eine Ringerweiterung zu DIBOA umgesetzt. Diese Reaktionen werden durch vier Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen BX2-BX5 katalysiert. Dabei führt das BX4-Enzym die Ringerweiterung durch (vgl. Abb. 1, Spiteller *et al.*, 2001). Auch die Gene *Bx2-Bx5* sind wahrscheinlich durch Duplikation entstanden. Hinweise darauf sind die ähnliche Exon/Intron-Struktur und die hohe Sequenzhomologie dieser Gene (Gierl und Frey, 2001). Eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (BX6) katalysiert die Hydroxylierung der C7-Position von DIBOA (Huber, 2002; Frey *et al.*, in press). Die Übertragung einer Methylgruppe auf diese 7-Hydroxy-Gruppe durch eine Methyltransferase ist der letzte Schritt in der DIMBOA-Biosynthese. Das dafür verantwortliche Enzym, BX7, ist noch nicht isoliert. DIBOA und DIMBOA sind autotoxisch und werden durch Glucosylierung entgiftet. Die UDP-Glucosyltransferasen BX8 und BX9 katalysieren diesen Schritt (v. Rad *et al.*, 2001).

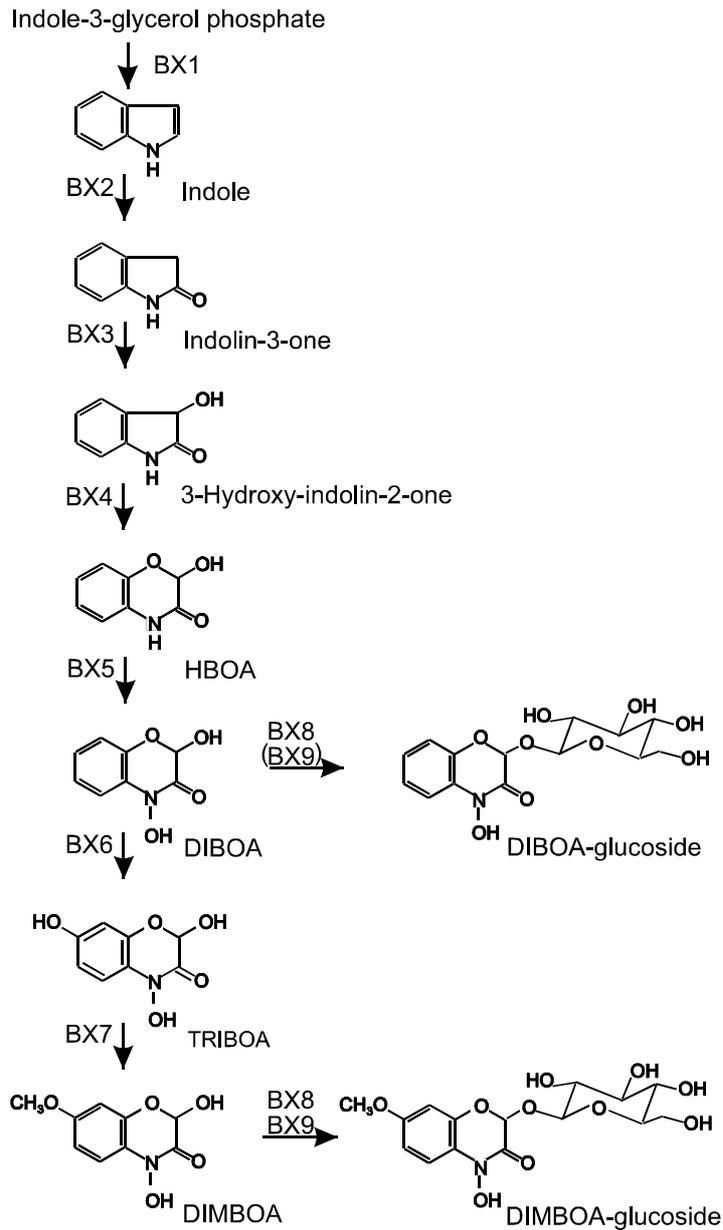


Abb. 1: DIMBOA-Biosyntheseweg und sein Verhältnis zur Tryptophansynthase, nach Sicker *et al.* 2000. BX1 ist eine Indolglycerinphosphatlyase mit Homologie zur α -Untereinheit der Tryptophansynthase, BX2-5 sind P450 abhängige Monooxygenasen. BX6 ist eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase und BX8 und BX9 sind UDP-Glucosyltransferasen. Die Methyltransferase BX7, die den Schritt von TRIBOA zu DIMBOA katalysiert, ist nicht isoliert.

1.3 Einbindung in den Primärmetabolismus

Das über den Shikimatweg gebildete Anthranilat (Abb. 2) ist eine spezifische Vorstufe der Indolbiosynthese. Seiner Bildung kommt also für die Tryptophan- und DIMBOA-Biosynthese eine besondere Bedeutung zu. Anthranilatsynthasen sind Tetramere aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Anthranilatsynthasen werden in Pflanzen im Cytoplasma synthetisiert und mit Hilfe einer Chloroplasten-Lokalisierungssequenz in den Chloroplasten importiert (Crawford,

1989, Radwanski und Last, 1995). Die Transitpeptide werden entfernt und das Holoenzym gebildet (Poulsen *et al.*, 1993, Bohlmann *et al.*, 1995, Romero und Roberts, 1996).

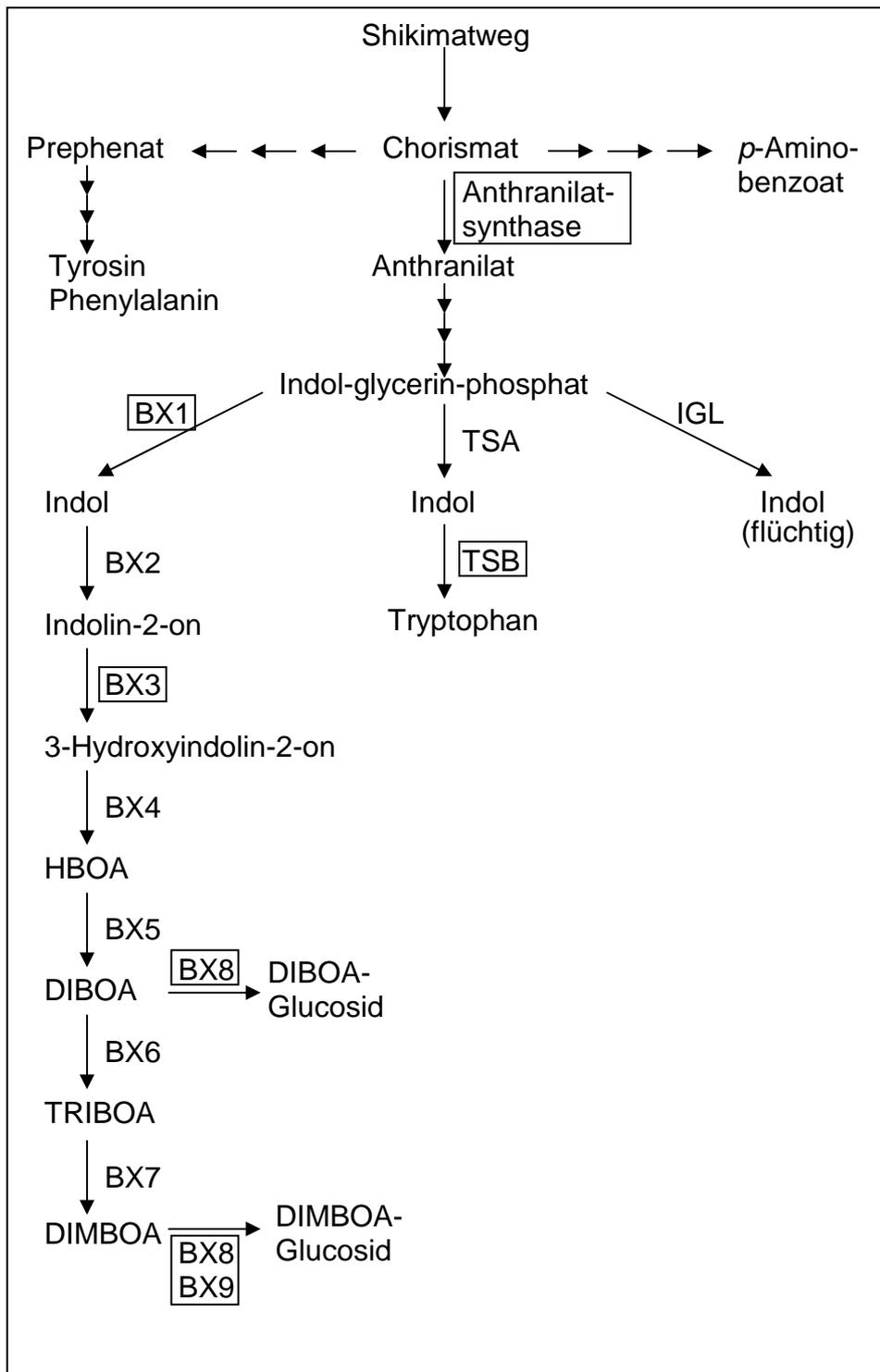


Abb. 2: Der DIMBOA-Biosyntheseweg, eingebunden in den Primärstoffwechsel. BX1-BX9 vgl. Abb. 1 und Text, TSA und TSB: α - und β -Untereinheit der Tryptophansynthase, IGL: Indolglycerinphosphatlyase. Für die Expressionsanalyse ausgewählte Gene sind umrandet.

Die β -Untereinheit der Anthranilatsynthasen besitzt eine Aminotransferaseaktivität, die Glutamin spaltet. Das entstehende Ammonium wird von der α -Untereinheit benutzt, um Chorismat in Anthranilat umzuwandeln. Diese Reaktion wird bei Vorhandensein von Ammonium in hoher Konzentration *in vitro* auch ohne die β -Untereinheit katalysiert (Niyogi und Fink, 1992, Bohlmann *et al.*, 1995).

Die Anthranilatsynthasen sind „feed back“ reguliert. Tryptophan, das Endprodukt des Biosyntheseweges, kann an die α -Untereinheiten binden und dadurch die Aktivität dieser Enzyme hemmen. Zwei nicht-allelische Kopien für α -Untereinheiten von Anthranilatsynthasen konnten aus folgenden Pflanzen isoliert werden: *ASAI* und *ASA2* aus *Arabidopsis thaliana* (Niyogi und Fink, 1992), *As α 1* und *As α 2* aus *Ruta graveolens* (Bohlmann *et al.*, 1995) und *OASAI* und *OASA2* aus Reis (*Oryza sativa*, Tozawa *et al.*, 2001). In Tabak (*Nicotiana tabacum*) sind möglicherweise mehr als zwei Gene vorhanden, isoliert ist allerdings bisher nur eines (Song *et al.*, 1998). Die Gene werden in zwei Gruppen eingeteilt (Tozawa *et al.*, 2001): *OASAI*, *As α 2* und *ASA2* werden auf einem sehr niedrigen Level exprimiert. *OASA2*, *As α 1* und *ASAI* sind in manchen Pflanzenteilen stärker exprimiert und induzierbar. Induziert werden die Gene durch Verwundung oder bakterielle Infektionen. Wahrscheinlich besitzen sie Aufgaben im Sekundärmetabolismus. *As α 1* wird z. B. eine Funktion in der Alkaloid-Biosynthese zugeschrieben (Bohlmann *et al.*, 1995). Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Informationen über die α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen in Mais vor. Es ist vorstellbar, dass auch in Mais mehrere α -Untereinheiten der Anthranilatsynthase existieren. Die DIMBOA-Biosynthese im jungen Keimling verbraucht große Mengen Anthranilat. Es ist deshalb möglich, dass es eine Verbindung zwischen der Regulation der DIMBOA-Biosynthese und der Regulation der Anthranilatsynthase gibt.

1.4 Ziel der Arbeit

Der DIMBOA-Biosynthese ist ein typischer Sekundärstoffwechselweg: BX1, das die Abzweigung vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel bewerkstelligt, ist durch Genduplikation entstanden, wie auch die beteiligten P450 Enzyme BX2-BX5. Das toxische Endprodukt wird in inaktiver (glucosylierter) Form in der Vakuole gelagert und erst bei Zerstörung der Zellintegrität wieder aktiviert. Nicht bekannt war zu Beginn dieser Arbeit, in welchen Pflanzengewebe die DIMBOA-Biosynthese stattfindet und wie stark die beteiligten Gene exprimiert werden. Diese Expressionsanalyse sollte sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-

ebene durchgeführt werden. Auch die Menge und Lokalisierung des Endprodukts DIMBOA-Glucosid sollten bestimmt werden. Für die Expressionsanalyse wurden Vertreter der einzelnen Enzymtypen ausgewählt: *Bx1*, codierend für die Indolglycerinphosphatlyase, *Bx3*, eines der vier P450 Gene und beide Glucosyltransferasegene, *Bx8* und *Bx9* (Abb. 2). Die Expression dieser Gene sollte mit Vertretern aus dem Primärstoffwechsel verglichen werden. Hierfür wurde TSB ausgewählt, die β -Untereinheit der Tryptophansynthase. Die Expression der α -Untereinheit der Anthranilatsynthase (ASA), die ein gemeinsames Primär- und Sekundärstoffwechselgen darstellt, sollte ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen werden. Dazu sollten die ASA-Gene aus Mais isoliert und bestimmt werden, ob unterschiedliche ASA-Gene in Primär- und Sekundärstoffwechsel eingebunden sind.

Als Untersuchungsmaterial wurde die Wurzel von Mais ausgewählt. *Zea mays* besitzt verschiedene Wurzeltypen, die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gebildet werden. Die Primärwurzel ist ein endogener Bestandteil des Embryos und wird aus dem basalen Meristem gebildet. Die Embryonalwurzeln entstehen während der späten Phase der Embryogenese aus dem Skutellarknoten. Die Kronwurzeln übernehmen in der erwachsenen Maispflanze die eigentliche Wurzelfunktion und werden aus dem Sprossknoten gebildet (Feix *et al.*, 2001, Abb. 3a). Sie entstehen erst an ungefähr sieben Tage alten Maiskeimlingen. Jede dieser Wurzeln bildet im Laufe ihrer Entwicklung noch Seitenwurzeln aus. Diese entstehen aus dem Perikambium und führen zu einer weiten Verzweigung des Wurzelsystems. Jede Wurzel kann in drei Zonen unterteilt werden: die Wurzelspitze, die Elongationszone und die Differenzierungszone (Nultsch, 1991, Abb. 3b). In der Wurzelspitze befindet sich das Wurzelmeristem. An ihrer Spitze ist sie von einer schützenden Wurzelhaube (Kalyptra) umgeben. Die äußeren Zellen dieser Kalyptra verschleimen und schützen auf diese Weise das empfindliche Wurzelmeristem vor Beschädigung beim Wachstum der Wurzel im Boden. In der Elongationszone der Wurzel findet keine Zellteilung mehr statt, die Zellen vergrößern sich durch Streckungswachstum. In der Differenzierungszone bilden sich aus Rhizodermiszellen die Wurzelhaare, die für eine bessere Nährstoffversorgung zuständig sind. Weiter oberhalb sterben die Wurzelhaare zusammen mit den Rhizodermiszellen ab. Das äußere Abschlussgewebe wird dann von der äußersten Schicht der Wurzelrinde (Cortex) gebildet (Kiesselbach, 1980). Die Bildung von Seitenwurzeln findet ebenfalls in der Differenzierungszone statt, ebenso wie eine verstärkte Einlagerung von Phenolen, eine Lignifizierung und sekundäres Dickenwachstum in älteren Wurzeln. Wurzeln stellen ein gutes Untersuchungsobjekt dar, da unterschiedliche Entwicklungsstadien gut über die Länge definierbar sind und jede Wurzel

mit Spitze, Elongations-, und Differenzierungszone unterschiedlich funktionelle Gewebe aufweist.

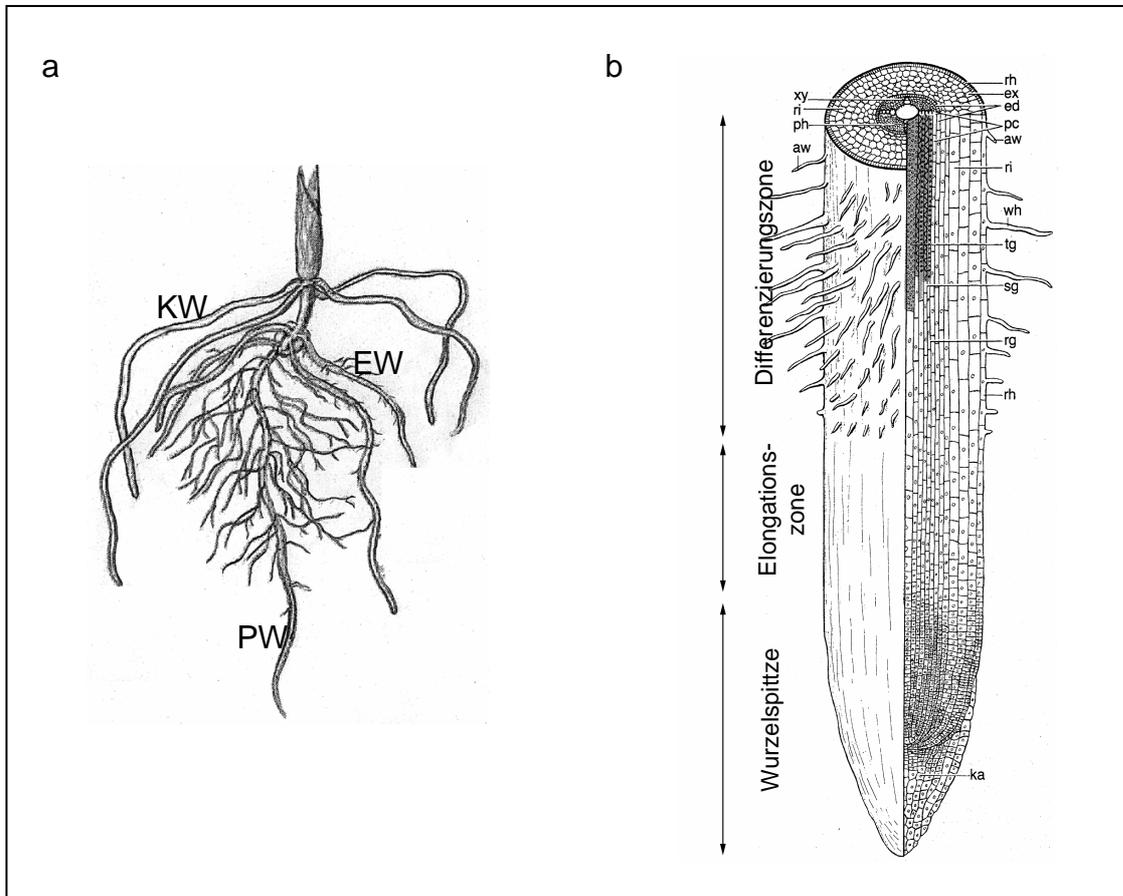


Abb. 3: Maiswurzeln. **a:** Wurzeltypen, nach Feix *et al.*, 2001; PW: Primärwurzel, EW: Embryonalwurzel, KW: Kronwurzel. **b:** schematischer Längsschnitt durch eine Primärwurzel, nach Nultsch, 1991. aw: abgestorbene Wurzelhaare, ed: Endodermis, ex: Exodermis, ka: Kalyptra, pc: Pericambium, ph: Phloem, rg: Ringgefäße, rh: Rhizodermis, ri: Rindenzellen, sg: Schraubengefäße, tg: Tüpfelgefäße, wh: Wurzelhaare, xy: Xylem

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), Stratagene (USA)

Für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen eingesetzte Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg), Sigma-Genosys (Großbritannien) und Sigma-Ark (Darmstadt) im Auftrag synthetisiert.

Radioaktiv markierte Nukleotide (^{32}P α -dCTP, 3000 Ci/mol) wurden von Amersham Biosciences (Großbritannien) bezogen.

Folgende Membranen wurden verwendet: Biotransfer B Transfer Membrane, 0,45 μm (Pall Biosupport Membranes), HybondTM ECLTM Nitrocellulosemembran und HybondTM N⁺ von Amersham Biosciences.

Verwendete Kits: NucleoSpin[®] RNA Plant zur Isolierung von RNA und NUCLEOBOND[®] AX5/20 Säulchen zur Reinigung von Plasmid DNA von Macherey und Nagel (Düren), Oligotex (Qiagen) zur Isolierung von Poly A⁺ RNA, TagMan Kit (PE Applied Biosystems, Darmstadt) zur Synthese von cDNA, GFXTM DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) zur Elution von DNA aus Agarose.

2.1.2 E. coli-Stämme

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

E. coli XL-1 Blue (Bullock *et al.*, 1987) für Klonierungen

E. coli K803 (Wood, 1966) für Phagenbankenscreens

E. coli BL21 DE3 (Studier & Mofat, 1986) für Proteinexpression

2.1.3 Phagenbanken

Es wurden EMBL3- und NM 1149- λ -Bakteriophagen verwendet (Frischauf *et al.*, 1983; Sambrook *et al.*, 1989; Murray, 1983).

Folgende Phagenbanken wurden benutzt:

cDNA-Bank: CI31A, 2-4 Tage alte Keimlinge, 60000 Primärtransformanden (Frey *et al.*, 1995)

cDNA-Bank: Azidoindanon-induziert, 11 Tage, Spross (Frey, nicht veröffentlicht)

cDNA-Bank: Volicitin-induziert, 11 Tage, Spross (Frey, nicht veröffentlicht)

Genomische Bank: λ EMBL4-Bank aus der Maislinie CI31A (Frey *et al.*, 1995)

2.1.4 Pflanzenmaterial

Folgende Maislinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Hybridmais LG-22 (Limagrain 22.43) wurde, soweit nicht anders angegeben, als Standard-Wildtyp-Linie für alle Maispräparationen verwendet.

Die Inzuchtlinie CI31A (Ac2175, für genomische und cDNA-Banken) wurde von Dr. P. A. Peterson (Iowa State University) zur Verfügung gestellt.

Die Maismutante *lrt1* (Hochholdinger, 1998) wurde von Frank Hochholdinger (Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Zur Keimung wurden die Maiskörner mindestens 2 Stunden in VE-H₂O eingeweicht, in feuchtes Keimpapier (Filterpapier Sorte 603/N, 75 g/m², 193 x 580 mm, Firma Sartorius) eingerollt und bei 28°C im Dunkeln angezogen.

2.1.5 Verwendete Vektoren

pBlueskript KS+ bzw. SK+, Resistenzmarker Ampicillin (Stratagene, USA)

pET-3aHis, Resistenzmarker Ampicillin (Rosenberg *et al.*, 1987).

2.1.6 Primer

Es wurden die in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführten Primer verwendet.

Tabelle 1: Primer für Light Cycler PCR

Primer für:	Primername	Primersequenz 5' → 3'
BX1	BX1f	ATG GCT TTC GCG CCC AAA ACG TCC TC
	BX1r	CGT GGA CCC CCG CCT CTT TCA TCT CG
BX3	BX3quantf2	AGC TGA CAG AGA TCA ACG TGT
	BX3quantr2	CGT CCG GCG AGC GCA TCG T
BX8	GT2A	TCG TCA CGG CGC TCA ACG CCG C
	GT2LC	GAC TGC GTC GTC CTT GCG CTC
BX9	GT1F	TCG TCA CCA CGC TGA ACG CCA G
	GT1R	GGA TCC TCC TTG CGC TCC TCT TTC
<i>ZmAsa1</i>	<i>Asa1spezIntronf</i>	GAC GCC GTC GCG GTG AGG GAG
	<i>Asa1spezIntronr</i>	GTA CCT CCC CAC ATT GGT GCC
<i>ZmAsa2</i>	ASSP2F	TAA GTT GGA AGT TAC GAG GCG A
	PSRev2	CTG GGC TAC TGT CGG CAA CA
<i>TSB1</i>	<i>TSB1spezif</i>	CTT GGT CGC TTG CGT CGG GGG T
	<i>TSB1spezr</i>	GCT GTC ATA TTC AGC GCG TCC G
<i>TSB2</i>	<i>TSB2spezif</i>	ATT GGT TGC CTG CGT CGG CGG C
	<i>TSB2spezr</i>	ACT ATC GTA TTC GGC ACG TCC A
<i>GAPDHC</i>	GAP f	GCT AGC TGC ACC ACA AAC TGC CT
	GAP r	TAG CCC CAC TCG TTG TCG TAC CA
Bluescript	BlueFW4	TGC AGG AAT TCG ATA TCA AGC
	BlueREV2	AAG CGG GCA GTG AGC GCA

Tabelle 2: Primer für die Isolierung der Anthranilatsynthasen und für Klonierungen

Primername	Primersequenz 5' → 3'
ASSP1F	TGA TCA GCT AGA AGT GAG TAT GC
ASAP1R	CTC GTC ATC CGG TTT GCT ATC A
ASSP2F	TAA GTT GGA AGT TAC GAG GCG A
PSRev2	CTG GGC TAC TGT CGG CAA CA
<i>Asa1 5' Nde Anfang</i>	CAC ACA CTG CAG CAT ATG GCC ACC GCC AGC CTC GCG CTC
<i>Asa1 5' Bam Mitte</i>	CCA TGA TTG TCC TGG GGA TCC TCA TGG GAT CAG
<i>Asa1 3' Bam Mitte</i>	GCC TGA TCC CAT GAG GAT CCC CAG GAC AAT CAT G
<i>Asa1 3' Bam Ende</i>	GTC TTC AAG AAA TGT GGA TCC AGC AAG GTC AAT GGC
<i>Asa2 5' Nde Anfang</i>	GTG AAG GTA GCC CCA TAT GGA ATC CCT AGC CGC
<i>Asa2 5' Nde Mitte</i>	CCT CAA ATG GGT TGG CAT ATG TTC GTC TCT CGA AC
<i>Asa2 3' Nde Mitte</i>	GTT CGA GAG ACG AAC ATA TGC CAA CCC ATT TGA GG
<i>Asa2 3' Bam Ende</i>	CTC TGC AAG ATC GAT GGA TCC AGC TAG TGC AGC AGC

Tabelle 3: Primer für Sequenzierungen

Primername	Primersequenz 5' → 3'
Asa1183	CTC ACT TCT AGC TGA TCA ATC
Asa1275	GTC ATT GTG TTT GAT CAT GTT
Asa193	TAT ATT CTT CGC TTG ACA TCG T
Asa1105	TGT CCA AAC CAG GTT CAG TAA
Asa1421	TCT ATA GTG ACG TCA TTG
Asa1840	TAA GAA TTT CAG GAC TCG
Asa1900	TGC TGG AAC CAT AAG AAG
Asa2r3	TGG TGC ACC ACT GAC TGT TC
Asa2u5	AGT ATA TTG TTA TCC ATT GG
Asa23r	CCA AAC TTG CGT GTG TGC AG
Asa25u	CTT GGG ACT CTA TGA TGA TGT
Asa2721	GGT CGA TTA ATA ATC TTC
Asa21140	CGG CAT GCA TCT GTT GAG
Asa2-1	GCG AAC GCG GGG TCA GTG
Asa2-2	GGT GGA TGG GTT GGG TTC
Asa2-3	CAC CAA CCG GTG TAG TTT CTG
Asa2-4	GTG CAC TGA TTT GCC TCA G
Asa2-5	GCA TTA TGT GCT CGG CAC
Asa2-6	GAT CAC CAC TTT GGA TCC
Asa2-7	GCA TGT TAA ATA CGG CAG
Asa2-8	GTC GTT TCT AGT TAT CTG
Asa2-9	CTG CTG CTC TCT TTA TCG
Asa2-10 aus 2-1	CAT CAT CAA TCA GGC AAG
Asa2-11 aus SP4-SP5	CAC TGA CCC CGC GTT CGC
Asa2-12 aus SP2-3	GTG CCC ATG TGG GAG TGC
Asa2-13 aus 2-4-29p	GGA TCC AAA GTG GTG ATC
Asa2-14 aus 2-6	CTA ACC GTT GAG CTG ATG
Asa2-15 aus 2-6	CTT CCC TCA TGC AAT AAA G
Asa2-16 aus 2-8-2r3	CTG TTC ATT TAA CAA TAC
Asa2-17 aus 2-8	GTC AGT GGT GCA CCA AAG
Asa2-18 aus 2-1	CCT CAT TGA AGG TAT AAA C
Asa2-19	GGC TTA TTG TAT GAC CGC
Asa2-20	GCA ACG CAA TTG CAT TTG
Asa2-21	GAG GCG GCT TGG TTT GGG
Asa2-22	CTT GGT TGA TAG GTA TAC
Asa2-23	GTT GTC ATC GGC TGA ACA G
Asa2-24	CCT GTC TTA CTG TCT CCG
Asa2-25	CTC AGC TAA AGG CCC
Asa2-26	CGG ATA TGT TTG CCG
Asa2-27	GAT TCT TGA GTT AAT ACT C
Niki SP5	GGA CGA GGC AGC GGT AGG
Niki SP5rev	CAG GCG AGC CCA GTG ATT AGC
Karo SP4	GCG CAC ACG AGA AAC GAG AC
Niki SP4	CGA TGC ACT CCC ACA TGG
Niki Asa2s29p	TAT TGG TTG CGT CTA GTC CTG
Niki Asa2s34p1	CTG CAA CTG TAG GAC AAT ACT C
Niki Asa2s34p2	GAG TAT TGT CCT ACA GTT GCA G

Asa2cDNAseq	GCT TGT GGA CTT GGG AAG
Asa2 Test	CAC AAC ACG ATG TAC TCA TAC
Oli1	GAG GAG GAC AAG AGG CGG
Oli2	GTC GTC CAC TAC CTG CTC

2.1.7 Antikörper

Heterolog exprimiertes, gereinigtes ZmASA2-Protein wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen durch die Firma Eurogentec (Belgien) verwendet. Die gelieferten Antikörper (Asa2-1161 und Asa2-1162) wurden getestet. Der Antikörper Asa2-1162 zeigte eine höhere Sensitivität als der Antikörper Asa2-1161. Deswegen wurden alle Western-Analysen im Folgenden mit dem Antikörper Asa2-1162 durchgeführt.

Die Antikörper antiBX1 (Stettner, 1998), BX3 (Glawischnig, 1997), BX8/9 (v. Rad, 2000) und TSB (Hüttl und Frey, unveröffentlicht) wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt auf die gleiche Weise von der Firma Eurogentec hergestellt.

Sekundäre Anti-Ig-Kaninchen-Antikörper, an die der Fluoreszenzfarbstoff CY5 gekoppelt ist, wurden von der Firma Amersham bezogen, Antikörper, die mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt sind von der Firma Sigma. Anti-DIG-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, für die *in situ*-Analysen, wurden von der Firma Roche (Schweiz) bezogen.

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Isolierung von DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Methoden „Lyse durch Kochen“ nach Sambrook *et al.* (1989) und „Isolierung durch alkalische Lyse“ (Birnboim und Doly, 1979) verwendet. Aus Phagen wurde die DNA nach Sommer *et al.* (1990) und Frey *et al.* (1990) isoliert.

2.2.2 Southern Analyse von Phagen-DNA aus cDNA/genomischen Banken

Isolierte Phagen-DNA wurde mit *EcoRI* geschnitten und auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Für die Übertragung der Phagen-DNA auf eine Biotinylated Transfer Membran (Pall Biosupport Membranes) und die Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden wurde die in Sambrook *et al.* (1989) beschriebene Methode verwendet. Die Sonden

(PCR-Fragmente oder komplette cDNAs) wurden mit Hilfe einer Klenow-Reaktion mit ^{32}P α -dCTP markiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphoimager STORM 860 mit Hilfe des Programms „Image Quant“ (Molecular Dynamics).

2.2.3 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Methode von Sanger *et al.* (1977). Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde mit einer PEG-Fällung gereinigt und in einer Konzentration von 0,5 bis 1 μg zur Sequenzreaktion mit dem DYEnamic ET terminator kit (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Analysiert wurden die Sequenzreaktionen mit einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA). Ausgewertet wurden die Sequenzen mit dem Programm Seqman (Lasergene, DNASTar).

2.2.4 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese

Die Isolierung von RNA erfolgte bei größeren Pflanzenmengen nach der Guanidium-Hydrochlorid-Methode von Logeman *et al.* (1987). Bei kleinen Pflanzenmengen wurde zur RNA-Isolation der Kit NucleoSpin[®] RNA Plant nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Isolierung von Poly-A⁺-RNA aus Gesamt-RNA wurden Oligo(dT)-Latexkugeln nach Angaben des Herstellers (Oligotex, Qiagen) benutzt.

Zur Überprüfung der Qualität der RNA und zur Mengenbestimmung dienten denaturierende Agarosegele mit Formaldehyd.

10x Gel-Puffer, pH 7,0:	200 mM MOPS 50 mM NaOAc 10 mM EDTA
Proben-Puffer:	1 ml Formamid (deionized, amberlite) 0,38 ml 35 % Formaldehyd 200 μl 10x Gel-Puffer 100 μl 0,25 % Bromphenolblau (frisch zubereitet)
Northern Gel:	100 ml 1,2 g Agarose 10 ml 10x Gel-Puffer 70 ml VE-H ₂ O 19 ml 37 % Formaldehyd

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des Taqman Kits (Roche, Schweiz) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Inkubation: 10 min 25°C, 45 min 48°C, 5 min 95°C.

2.2.5 PCR

Für PCR-Reaktionen (Sambrook *et al.*, 1989) wurde der Thermoblock UNO (Biometra) und Taq-Polymerase der Firma Roche verwendet. Die verwendeten Primer hatten eine Länge von 18-30 bp. Die verwendete „Annealing“-Temperatur wurde durch Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur des Primers bestimmt. Bei Amplifikation besonders GC-reicher Sequenzen aus Mais wurde die DMSO-Konzentration bei Bedarf auf 10 % erhöht (Chester & Marshak, 1993). Als Standard-Puffer wurde der Puffer KCl V verwendet (50 mM Tris, pH 8,3; 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 3 % DMSO). Standardprogramm: 30-40 Zyklen, 1 min 94°C, 30 s Annealing, 90 s 72°C, 10 min 72°C, Abkühlung auf Raumtemperatur.

2.2.6 „real time PCR“ mit dem Lightcycler

Für alle quantitativen PCRs mit Hilfe des Lightcyclers wurde der FastStart DNA Master SYBR Green I kit der Firma Roche Molecular Biochemicals nach Angaben des Herstellers verwendet. Für jeden Ansatz wurde ein Duplikat durchgeführt. Als Standard zur Mengenbestimmung dienten linearisierte Plasmide mit der entsprechenden cDNA. Die Konzentration der Plasmide wurde im Photometer bestimmt und mit Hilfe eines Agarosegels und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Die Ergebnisse wurden gegen ein Transkript normiert, das in allen Zellen vorkommt, nämlich die cytosolische Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase GAPDH.

Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng eingesetzt, in diesen 500 ng Gesamt-RNA sind ca. 5 ng PolyA⁺-RNA enthalten. 1/20 davon, also 250 pg wurde für jede Lightcycler-Reaktion eingesetzt. In den Lightcycler-Experimenten konnte 1 fg des jeweiligen Gens nachgewiesen werden. Rechnerisch können also Transkripte mit einer Abundanz von 1 in 250 000 (4 ppm) nachgewiesen werden.

Lightcycler-Bedingungen:

Die MgCl₂- und DMSO-Mengen pro Reaktion und die Annealing-, Extension-Temperaturen und Zeiten wurden gemäß Tabelle 4 gewählt.

Tabelle 4: Bedingungen für Lightcycler-PCR.

Untersuchtes Gen	μl MgCl ₂	μl DMSO	Annealing- Temperatur	Annealing- Zeit	Extension- Zeit
<i>BX1</i>	0,4	0,6	65°C	8 s	27 s
<i>BX3</i>	0,8	0,3	64°C	8 s	20 s
<i>BX8</i>	0,8	0,5	68°C	8 s	17 s
<i>BX9</i>	0,4	0,5	68°C	10 s	30 s
<i>ZmAsa1</i> ^{*)}	0,8	0,3	63°C	8 s	15 s
<i>ZmAsa2</i>	0,8	0,4	65°C	10 s	18 s
<i>TSB1</i>	1,6	0,4	64°C	10 s	15 s
<i>TSB2</i>	1,6	0,4	64°C	10 s	15 s
<i>GAPDHc</i>	0,4	0,6	65°C	8 s	27 s
Bluescript	1,6	2 Q-solution!	57°C	8 s	15 s

*) Bei *ZmAsa1* wurde aufgrund von starker Primer-Dimer-Bildung die Fluoreszenz nicht wie sonst am Ende der Extension gemessen, sondern nach der Extension bei 85°C, da bei dieser Temperatur die Primer nicht mehr doppelsträngig vorliegen.

2.2.7 Klonierungen

2.2.7.1 Konstrukte für heterologe Expression des ZmASA2-Proteins in *E. coli*

Der Vektor pET3aHis besitzt neben den sechs Histidinen eine *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstelle, mit deren Hilfe es möglich ist, das gewünschte Gen „in frame“ einzuklonieren. Für *ZmAsa2* musste in das Startcodon eine *NdeI*-Schnittstelle gelegt und das Stopcodon durch eine *BamHI*-Schnittstelle ersetzt werden. Dies wurde mit mismatch-Primern erreicht (Primersequenzen vgl. Tabelle 2). Die Amplifizierung erfolgte aus verschiedenen cDNA-Banken (CI31A, 2-3 Tage alte Keimlinge und Volicitin-induziert, 11 Tage Spross). Da in den Genen interne *BamHI* und *NdeI*-Schnittstellen vorhanden waren, erfolgte die Klonierung in zwei Schritten (siehe Abb. 4). Die PCR-Fragmente wurden mit den entsprechenden Enzymen nachgeschnitten und nacheinander in den Vektor inkloniert.

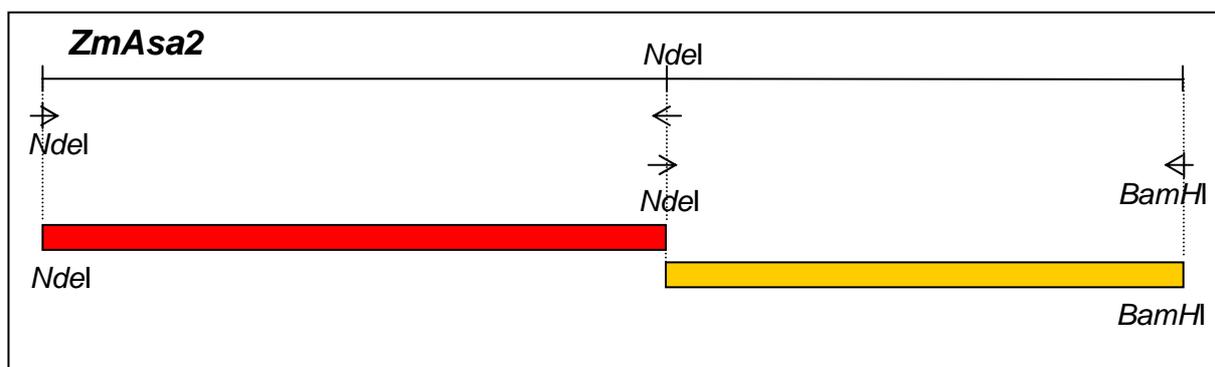


Abb. 4: Klonierungsschema des Konstrukts für die heterologe Expression von *ZmAsa2*

Zur Klonierung der Konstrukte wurden die Ligationsansätze in den *E. coli* Stamm XL1-Blue transformiert. Das fertige, mit Sequenzierung überprüfte Konstrukt wurde dann zur Expression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert.

Ein Expressionskonstrukt wurde nur für das Gen *ZmAsa2* hergestellt. Die Sequenzierung der *ZmAsa1*-cDNA zeigte, dass die isolierte cDNA ein Intron enthielt, es lag also keine mature cDNA vor. Aus der Volicitin-induzierten cDNA-Bank konnte diese isoliert werden.

2.2.7.2 Konstrukte für Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Bei den Konstrukten wurde jeweils das PolyA-Stück der entsprechenden Gene entfernt.

BX1: Klon p435, Restriktion mit *HindIII* und Religation (Stettner, 1998)

BX3: Klon p385, Restriktion mit *HindIII* und Religation (Frey *et al.* 1995)

BX9: Klon p545, Restriktion mit *BamHI* und Religation (v. Rad *et al.*, 2001)

2.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

2.3.1 Gewinnung von heterolog exprimierten Proteinen

Zur heterologen Expression von *ZmAsa2* wurde das entsprechende Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert. Transformanden wurden in Terrific Broth Medium bis zur OD₆₀₀ 0,4 angezogen, mit 1 mM IPTG induziert und nach zwei Stunden bei 27°C geerntet. Die Zellen wurden in 6 M GuHCl-Puffer lysiert (The QIAexpressionist, 2001; Protocol 10) und das His-getaggte Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen mit Ni-NTA-Agarose nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (The QIAexpressionist, 2001; Protocol 17).

2.3.2 Proteingewinnung aus Maiskeimlingen

Zur Isolierung von Proteinen aus Mais wurde das Pflanzenmaterial gewogen, gemörsert, mit 0,3 g Polyclar pro g Pflanzenmaterial vermischt, und pro g Pflanzenmaterial wurden vier mal so viele ml Protein Extraction Buffer zugegeben. Die Suspension wurde abzentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

Protein Extraction Buffer: 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerin, pH 7,5 mit HCl. 1 mM PMSF und 70 µl β-Mercaptoethanol pro 100 ml wurden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden denaturierende Tris-Glycin SDS-Polyacrylamid-Gele benutzt (Lämmli, 1970; Trenngele 12,5 %, Sammelgele 5 %). Zur Elektrophorese wurden Mighty-Small Apparaturen (Hofer) benutzt, Proteine im Gel wurden mit Coomassieblau (Sigma) angefärbt.

2.3.4 Western-Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die Proteingele 15 min in Western Transfer Buffer geschüttelt. Zum Transfer wurden der SemiDry-Blotter der Firma BioRad und Hybond™ ECL™ Nitrocellulosemembranen (Amersham) benutzt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau-Rot (Sigma) gefärbt. Die entfärbte Membran wurde mindestens 1 h in Tris/Salt/Tween Buffer (TST) geschüttelt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte ebenso für 1 h in TST (Verdünnungen der ersten Antikörper siehe Tabelle 5). Danach wurde 3x 15 min mit TST gewaschen, anschließend wurde 1 h mit dem zweiten Antikörper in TST (Anti-Kaninchen, CY5-gekoppelt; 1:3000) im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min wurde die Membran mit Hilfe des STORM Phosphoimagers (Molecular Dynamics) im Modus Red Fluorescence ausgewertet.

Tabelle 5: Verdünnungen für Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Anti BX1	1:300
Anti BX3	1:300
Anti BX8/9	1:300
Anti ZmAsa2	1:100
Anti TSB	1:100

Western Transfer Buffer: 5,83 g Tris, 2,93 g Glycine, 3,75 ml 10 % SDS, 200 ml Methanol ad 1 l mit MilliQ-Wasser.

Tris/Salt/Tween Buffer: 10x Puffer: 60,57 g Tris, 87,66 g NaCl ad 1 l mit MilliQ-Wasser; Arbeitslösung: 1:10 Verdünnung und 5 ml/l Tween 20.

2.4 Histologische Arbeitsmethoden

2.4.1 Fixierung von Maiskeimlingen

Als Material zur Fixierung wurden 1 cm lange Primärwurzeln (1-2 Tage alt), ganze Keimlinge (1 Tag alt), oder 3 cm lange Primärwurzeln (in je 1 cm-Stücke geteilt) verwendet. Die Pflanzen wurden in 4 % Formaldehyd in PBS (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) gegeben und entgast. Das Fixans wurde anschließend erneuert. Nach mindestens zwei Stunden Fixierung (auch über Nacht bei 4°C möglich) wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann mit der aufsteigenden Ethanolreihe begonnen (10 % Ethanol bis 100 % Ethanol, in 0,85 % NaCl in 10er Schritten). Dazu wurde das Pflanzengewebe immer mindestens für eine Stunde (oder über Nacht) in der jeweiligen Lösung inkubiert. Nach der aufsteigenden Ethanolreihe wurde das Ethanol stufenweise durch HistoClear (Plano) ersetzt: 3:1, 1:1, 1:3 EtOH:HistoClear. Inkubation wiederum mindestens je eine Stunde. Anschließend wurden Paraplast Plus Chips (Sigma) bis zur Sättigung zugegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das Pflanzenmaterial in der gesättigten HistoClear/Paraplast-Lösung bei 60°C inkubiert und die Lösung nach einem Tag durch geschmolzenes, pures Paraplast ersetzt. Die Inkubation bei 60°C wurde für mindestens drei Tage fortgesetzt, wobei ein- bis zweimal pro Tag die Wachslösung gewechselt wurde. Die fixierten Pflanzen wurden zusammen mit dem Paraplast in kleine Petrischalen gegossen, entgast und nach Abkühlung wurden mit Hilfe des Mikrotoms (Leica) 10 µm dicke Schnitte hergestellt.

2.4.2 Technik der *In situ*-Hybridisierung

2.4.2.1 Herstellung der Sonden

Zur *in vitro* Transkription wurde der DIG RNA Labeling Mix der Firma Roche Molecular Biochemicals nach Angaben des Herstellers benutzt. Verwendete Restriktionsenzyme/ Polymerasen siehe Tabelle 6.

Die Sonden wurden über den gesamten Bereich der jeweiligen Gene transkribiert und besaßen somit eine Größe von ca. 2 kb. Da diese Länge für die *in situ*-Hybridisierungen zu groß ist, wurden die Sonden mit alkalischer Hydrolyse in 200 bp große Stücke zerkleinert. Dazu wurden die Sonden 1 zu 1 mit dem Hydrolysepuffer versetzt und bei 60°C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$t = \frac{L_0 - L_f}{k \cdot L_0 \cdot L_f}$$

L_0 : Ausgangslänge in kb
 L_f : gewünschte Länge in kb
 k : 0,11 kb⁻¹min⁻¹

Die Hydrolyse wurde durch Fällen der Sonde mit Essigsäure, NaAc und Isopropanol gestoppt.

Tabelle 6: Zur *in vitro* Transkription verwendete Restriktionsenzyme und Polymerasen

Gen	<i>antisense</i> (as)/ <i>sense</i> (s)	Restriktionsenzym zur Linearisierung	Polymerase
<i>BX1</i>	as	<i>Bam</i> HI	T3
	s	<i>Hind</i> III	T7
<i>BX3</i>	as	<i>Bam</i> HI	T3
	s	<i>Hind</i> III	T7
<i>BX9</i>	as	<i>Xba</i> I	T3
	s	<i>Hind</i> III	T7
<i>ZmAsa2</i>	as	<i>Bam</i> HI	T3
	s	<i>Hind</i> III	T7

Hydrolysepuffer: 240 µl 0,5 M Na₂CO₃
 160 µl 0,5 M NaHCO₃
 600 µl DEPC-H₂O

Die Konzentration der in DEPC-H₂O resuspendierten Sonden wurde mit Hilfe eines Dot Blots bestimmt. Dazu wurden die Sonden in unterschiedlichen Verdünnungen auf eine Biotin Transfer Membrane (PALL) getropft. Als Standard diente DIG-Control-RNA bekannter Konzentration. Nach dem Fixieren der RNA auf dem Filter wurde kurz gewaschen, 30 min blockiert, 30 min mit dem anti-DIG-Antikörper inkubiert, zweimal 15 min gewaschen und mit der Färbelösung inkubiert.

Maleic acid buffer: 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

Washing buffer: maleic acid buffer m. 0,3 % Tween

Blocking buffer: maleic acid buffer m. 1 % blocking reagent (Roche)

Detection buffer: 100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 8 µl NBT/BCIP pro ml Puffer

2.4.2.2 *In situ*-Hybridisierung

Bei der *in situ*-Hybridisierung verwendete Puffer und Lösungen wurden bis zur RNase-Behandlung der Objektträger mit DEPC-Wasser hergestellt bzw. mit DEPC behandelt (Sambrook *et al.*, 1989).

Die 10 µm dicken Schnitte des fixierten Maisgewebes wurden auf Wassertropfen auf SuperFrost® Plus Objektträgern der Firma Menzel-Gläser gegeben und durch Erhitzung auf einer Wärmeplatte (42°C) auf den Objektträgern fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe von Histoclear (Plano) entparaffiniert und mit einer absteigenden Ethanolreihe auf die Proteinase K-Behandlung unter wässrigen Bedingungen vorbereitet. Die Proteinase K-Behandlung (0,5 bis 1 µg/ml) diente dazu, das Gewebe für die RNA-Sonden durchlässiger zu machen. Anschließend wurde mit 4 % Formaldehyd (frisch aus Paraformaldehyd) nachfixiert und die negativen Ladungen mit Essigsäureanhydrid (0,25 % in 0,1 M Triethanolamin-HCl-Puffer, pH 8) acetyliert. Vor der Hybridisierung mit den entsprechenden RNA-Sonden wurde das Gewebe mit einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder entwässert.

Zur Hybridisierung wurde der fertige Hybridisierungsmix auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (mit einem weiteren Deckglas als Abstandshalter) bedeckt. Die Inkubation der Objektträger erfolgte für 16 h in einer feuchten Kammer (2x SSC und Formamid 1:1) bei 60°C. Nach der Hybridisierung wurden nicht gebundene RNA-Sonden durch Waschen und eine RNase A-Behandlung (20 µg/ml) entfernt. RNase A greift nur einzelsträngige RNA an.

Vor der Anti-DIG-Antikörper-Inkubation (Verdünnung 1:3000) wurden die Gewebe zunächst mit Blocking Reagent (Puffer 2) und BSA (Puffer 3) blockiert. Nach der Antikörper-Inkubation wurde mit Puffer 3 gewaschen und mit der Färbelösung über Nacht versetzt. Die Färbelösung wurde durch Waschen in VE-H₂O wieder entfernt. Die trockenen Objektträger wurden mit Entellan (Merck) eingedeckelt und mit dem Axiophot der Firma Zeiss mikroskopiert. Aufnahmen wurden mit einer digitalen Nikon-Kamera F5 SLR (Kodak DCS 790 Digital Camera) durchgeführt und mit Hilfe des Programms Photoshop (Version 6.0, Adobe) bearbeitet.

Hybridisierungsmix:	0,75 ng/µl	RNA
	x	DEPC-H ₂ O
	50%	Formamid
	0,5 mg/ml	tRNA (Sigma)
	0,1 mg/ml	PolyA (Roche)
	300 mM	NaCl
	2x	TE
	1x	Denhardt
	10%	Dextransulfat (Roth)
	100 mM	DTT

Waschpuffer: 2x SSC, 50% Formamid

Puffer 1: 100 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl

Puffer 2: Puffer 1 mit 0,5% Blocking Reagent (Roche)

Puffer 3: Puffer 1 mit 1% BSA (Sigma), 0,3% Triton-X-100

Puffer 4: Puffer 3 mit anti-DIG-Antikörper (Roche) 1:3000

Puffer 5: 100 mM Tris, pH 9,5; 100 mM NaCl, 50 MgCl₂

Färbelösung: Puffer 5 mit 10% Polyvinylalcohol (Sigma) und NBT (150 µg/ml)/BCIP (75 µg/ml) (Roche).

2.5 Naturstoffanalysen

2.5.1 Benzoxazinon-Färbung mit Eisenchlorid

DIBOA/DIMBOA können mit Eisen(III)-Chlorid in Maiskeimlingen direkt nachgewiesen werden (Simcox, 1985, Iwamura, 1996).

Färbelösung: Für die Färbungen an ganzen, ungeschnittenen Keimlingen wurde folgende Färbelösung verwendet: 10 g FeCl₃·6H₂O, 100 ml 95% EtOH, 500 µl 3M HCl, ad 200 ml mit VE-H₂O. Für die Färbungen der geschnittenen Wurzeln wurde folgende Färbelösung verwendet: 5 g FeCl₃·6H₂O, 49,5 ml EtOH, 0,5 ml rauchende HCl.

Die zu färbenden Gewebe wurden entweder im Ganzen für ca. 10 s in die Färbelösung getaucht oder geschnitten und mit der Färbelösung überschichtet. Anschließend wurde mit VE-H₂O entfärbt und sofort mit Hilfe eines Stemi SV 11 Binokulars der Firma Zeiss und der digitalen Nikon F5 Kamera photographiert.

2.5.2 Isolierung von DIMBOA und HPLC-Analyse

DIMBOA wurde nach Bailey und Larson (1991) und Glawischnig (1997) isoliert.

Das Pflanzenmaterial wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 4 Vol VE-H₂O suspendiert und 30 bis 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der pH mit 3 M HCl auf pH 2 angesäuert (etwa 1/300 Vol) und 5 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde zweimal für 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden dreimal mit je 400 µl EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und enthielten DIMBOA.

Mit Hilfe der Speedvac wurden die DIMBOA-Lösungen eingedampft und der entstehende Rückstand wurde in 60 µl MeOH gelöst. Vor der Analyse in der HPLC wurde noch einmal abzentrifugiert.

Für die HPLC-Analysen wurde das System Gold Nouveau (Autosampler 508, Pumpeneinheit 126, Diodenarraydetektor 168) der Firma Beckmann mit der Bedienungssoftware System Gold V 810 verwendet. Für Trennungen nach dem reversed phase Prinzip wurde eine LiChroCART RP-18-Säule (250x4, analytisch) der Firma Merck verwendet. Die Detektion von Signalen erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Folgende Methode wurde verwendet: 20 min isokratisch 18% MeOH, 82 % 10%ige Essigsäure; 3 min 100% MeOH, um die Säule zu spülen; 3 min wieder 18% MeOH, Rest 10% Essigsäure zur Äquilibrierung der Säule.

Der DIMBOA-Gehalt der jeweiligen Proben wurde mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Dazu wurde reines DIMBOA eingewogen, das von Dr. Sicker, Leipzig, zur Verfügung gestellt wurde.

3. Ergebnisse

Die Expressionsmuster einer Auswahl von Genen der DIMBOA-Biosynthese wurde für die Maiswurzel bestimmt und mit Genen des Primärstoffwechsels verglichen (Abb. 2). Qualitativ wurde die Genexpression durch *in situ*-Hybridisierungen, quantitativ durch real time PCR und Western-Analyse untersucht. Parallel dazu wurde DIMBOA lokalisiert und quantifiziert.

3.1 Isolierung von Anthranilatsynthasegenen aus Mais

3.1.1 Isolierung der cDNA von *ZmAsa1* und *ZmAsa2*

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Anthranilatsynthasegene von Mais nicht isoliert vor. Deshalb wurde zunächst eine Datenbanksuche durchgeführt. In öffentlichen EST-Datenbanken konnten vier Einträge gefunden werden. Die Sequenzen aus „ear“-, „tassel“-, „endosperm“- und „root“-cDNA-Banken konnten durch Sequenzvergleich den beiden Anthranilatsynthasegenen *OASA1* und *OASA2* aus Reis zugeordnet werden. Auch in Mais scheint es also zwei Gene für die α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen zu geben. Diese werden im Folgenden *ZmAsa1* und *ZmAsa2* genannt. Für beide Gene wurden spezifische Primer hergestellt (vgl. Tabelle 2). Die mit diesen Primern in einer λ -Phagen-cDNA-Bank von 2-3 Tage alten Maiskeimlingen gewonnenen PCR-Fragmente von 226 bp für *ZmAsa1* und 215 bp für *ZmAsa2* wurden als Sonden für einen Screen derselben cDNA-Bank verwendet. Isolierte Phagen wurden mittels einer Southernanalyse überprüft. Zur Klonierung der entsprechenden Phagen-DNA wurde diese mit *EcoRI* geschnitten und in den Vektor pKS Blueskript inkloniert. Für *ZmAsa1* wurde ein 1686 bp großes Fragment isoliert, für *ZmAsa2* ein 1447 bp großes Fragment. Beide cDNA-Fragmente wurden doppelsträngig sequenziert. Die 5'-Bereiche beider Sequenzen waren unvollständig (siehe Abb. 5, 6, unterstrichene Sequenz und Anhang).

Um Sequenzinformationen über diese 5'-Bereiche und über die Promotorsequenzen zu erhalten und um die Exon-Intron-Strukturen der Gene aufklären zu können, wurden die genomischen Sequenzen isoliert.

3.1.2 Isolierung der genomischen Klone von *ZmAsa1* und *ZmAsa2*

Zur Isolierung der genomischen Klone der beiden Anthranilatsynthasegene wurde jeweils das komplette cDNA-Fragment als Sonde und eine genomische Phagenbank der Maislinie CI31A (Frey *et al.*, 1995) verwendet. Die Phagen wurden in einer Southernanalyse überprüft und mit der cDNA hybridisierende Fragmente wurden in den Vektor pKS Blueskript einkloniert. Für beide Anthranilatsynthasen wurden die genomischen Klone isoliert. Für *ZmAsa1* (Abb. 5) wurde ein 8930 bp großes Fragment sequenziert, für *ZmAsa2* (Abb. 6) ein 5574 bp großes Fragment. Der genomische Klon für *ZmAsa2* war am 3'-Ende der codierenden Sequenz unvollständig. Auch weitere Phagenbankenscreens führten nicht zur Isolierung dieser Sequenzen.

Ergebnisse

GAATTC	CCCCGATCAGATCCCCAGTGTCCGGAGATGTTGTTACTGGCGACGACGATTGCTGTGTAGATGATTGCTAGTACGAAGGATCG	90
TCGTATCGTAGAGCTGGAGCATATGCCGACCCAGATCCCATTTTCTGAGTCCCAGTGGATTGGTTGCGAACTCGTGCCTGCGGCAGCCGG	180	
CGTGGCCACGCCACGATGCGTCGCCAAGCAAAGCCCCCGCCTCGCTGCTCCCGATCCGTTTCTTGATGTCGATTCGGCTTTTGAATCT	270	
TCCGTCAATAATGAAGACATGACAAAGACTATTTTTTTTCTTATCGGTAACACATAAATATTTTATTCTTTTTTCTCATTTTTCTTCTC	360	
GTTATCATTATAAGGGCATAAATTTATTATATAGAAAGGTAGAGTACTCAGGCATATGTTTGATACTAACCGACGTAACTTTTATAGG	450	
GTTTCTTAACATTTGGTGTCAATTTTAAATTGATGAACTAAACCGATGTGCTGGGCTACGAAGTAACATGTGTGTCTATCGATTTTATTA	540	
AAAAAAGGTCATTGTCTATCAAGCATACAAAGGTATATATGGTCATATAGAACATATACTCTTTGTCGCTGATTTTAAATTGATGAACG	630	
AGATTGATAACTATGATGTACAAAACGATTATAAGCATGAGGCCAAAACCTTTTTTTTTGTAAAATGGGACCCCAAATGACTTGG	720	
GGAGCATGAGGCCGCCGCCCTCCAAAGCCAGGCCAGAGTCGGCCCATTTCTATCCTTAGCTGTACTGAAATGCTGATACTCTTTTTGT	810	
ATCTTCTAATAATAGGGGGTCTGCTGGTTGGATTCTGCTGGACTGCTGCTGATACTATGGGCTGGCTCGTTTGCCGTTGGGCGTGGCGCTA	900	
TGGGCCACGCGTGAAGTTATCATCCGAATAGCCAGCACCCCGGTGGTTCGCGCTGGACAACCTAGCAGGATAAAAACAAAGCAGTGGGC	990	
CGTGGTGAGCCTCTGTTAGGTGGTCCCAGGAATAAAACAAGAATATCCAGCGCCACTACACTCGACTCGTTGATAACGTGCACGCTTTC	1080	
CCTGGGCTGTCTCCGTTCAAGTACGTTTCGTGCCAGCTCACGTGTGCATGCCGAACCGTTTCTGTTGTCTAGCGTGGCGCAATTGCACAC	1170	
GTGATCGATCGTCTTCTTCTCGCGAAACACAGCCGTTTGTGCTCGTCATGCCAAAGATGTCATTATATGGCAGAGAAGGATGTGACA	1260	
ACATATAGCTGTAGACCTTGGCACAAGCATGCGATGCGAGCAGTTTCAAACCTCGTGGGCAGAGCAGCACAAACAGCATTTCTTTGGCGG	1350	
AGCACGAGGGGGCCACGCCTGAATGCCAGGCCTGGCCGCGAGCTGTGCGCCTCGCCCTCCCGACTCCACTCCACTCCACTCCACTCG	1440	
CCCGCGCCCGCCCGCGCTGCTCCTCCCTCGCGCCCGCCCGCCCGCCCTATCTATATCCATTCCCGCTCGTCCCCCTCAACAACC	1530	
CTCCTCACCGCGACTCGTGTTCGTGTGCATCCCGCCCGAGGCCGAGTCCATGGCCACCGCCAGCCTCGCGCTCTCGCTGCGCCTCGCG	1620	
M A T A S L A L S L R L A		
CCGTCTCGCGCCCGCTGAGCCTCCGCGCCGGGGGGCCCGGGCGTCACTGCGCGCCACCACCGCCACGTTCCACCAGCTCGACGCC	1710	
P S S R P L S L R R R G A A G V T C R A T T A T F H Q L D A		
GTCGGTGAGTGCCTGTGCCTCGATCCGAGGCCGTGTCTGTTCCGCGGATTGGGACCGGGCGTGTGCAGTTTTGGTTAACTATTAATGC	1800	
V		
CGTCGAGGTACGGTCTCGTTTCTCGTGTGCGCGCGCAGCGGTGAGGGAGGAGAGTCCAGGTTCCGGACGGCGGGCGGAGGGCCGC	1890	
A V R E E E S R F R T A A A E G R		
AACCTGTGCGCTCACGAGGTGCATCTTCTCCGATCACCTCACGCCGTGCTCGCGTACCGCTGCCTCGTCAAGGAGGACGAACGCGAG	1980	
N L L P L T R C I F S D H L T P V L A Y R C L V K E D E R E		
GCGCCAGCTTTCTCTTCGAGTCTGTTGAGCAGGGGTCGAGGGCACCAATGTGGTGAGTAGTGATTCGCCACCCGTGACACCCGCCCG	2070	
A P S F L F E S V E Q G S E G T N		
ACTGTCTCTCTAGTCTGGTGTCTCCAGACATTTACCGAGCATGTGATTTGAGGGGAGGTACAGCGTGGTTGGGCGCAGCCTGCTAT	2160	
G R Y S V V G A Q P A M		
GGAGGTGCTGGCCAAGGCTAACCATGTGACGGTTCATGGACCATGAGATGAAGTTCGAGGAGGGAGCACTTCGTGCCTGATCCCATGAGGAT	2250	
E V V A K A N H V T V M D H E M K S R R E H F V P D P M R I		
CCCCAGGACAATCATGGAGCAGTGAACCCGAGATTGCTGACAGCCTCCCTGATGCATTTTGTGGTACAGTTTTGCCCGCCCGCTCTT	2340	
P R T I M E Q W N P Q I A D S L P D A F C G		
CCCGGTA	CTTGTGTTTAGAATGTGAAGCATCTTAAATGTTGTGCATAGTGTCACTTGCATAGATCTGTGCAATTGCTTTTGAGGTAAA	2430
AACATCCTCTGCTGCCTCTTGCCATTTCTACTCATGGTATGTGTCTATACTTTCTACAGCAGCACATGATTCCATACTTGTCTCTGTTCTC	2520	
TCTCCATGCACATGTTGCTGGTACCCCTCCATCTCAAATGATAGTAGTATTTAATGAGGAAAAAGTCTAACAAAATAGACTCCGGCC	2610	
GTTATTTTTTCTCACTGCATGTTGTTATTTGCTAATAAATCAATTTCAAATAGAGGACACTTTGGATATAAGTCTATTGATAACAAGTT	2700	
TCATATCCTAATCTTGTAGGTAATTTAATAACTGTTGATCTAAATTTGTAATTTTACTCCTTTCAGTAGCTAGAATGTTGTTGGTGA	2790	
TATACTAATAATATTTTCTTCTCGATATCTAGAATGCTCTTGAGAATGCTCCTTATGGAGGACATGGGGATAGTCTTTTGTATTGATCA	2880	
ATTACAGTCACAATATTTGTATGATATTTGTAGGAGGATGGGTTGGATTCTTCTCATATGATACAGTGCCTTATGTTGAAACAAAGAAG	2970	
G W V G F F S Y D T V R Y V E T K K		
CTTCTTTCAGTAAGGCACCACATGATGATGAACCTTCTGATATTCATTTAGGCCCTCTATAGTGACGTCATTGTGTTGATCATGTT	3060	
L P F S K A P H D D R N L P D I H L G L Y S D V I V F D H V		

Ergebnisse

GAAAAGGTATGCACCATATACACCATCCTTTTATATGTTTCAGTTGATTAGATAATGCTCTAATTTGTAATTTATACATGGTTAGCATA	3150
<u>E K</u>	
TCAGATTATTGATGTTGCTTTCTCCTTAAGAAGCTACTCAAGATACCATAAGAGTGCATGCTTATAAATCAAATGATGTTACACTCCCC	3240
CCGTTTTAAATATTGTTACTTGGATTAATCGACTAAGTCTCAGGAAAATATATATTAGCATCTACAGTTGTAATACAGTACTATAAAA	3330
CATATTTTATAGACAGTCTAATGAAACTAGTTTGATGTTGTAGATATGAACCATTTTGTATAAACATGGTTAAAGTTTAAAAGTTTG	3420
ACCGAGAAAAACAAAACAAATATAATTTGGAATAGATGTATGTAATCTTATATGTGGTTAATATACTCATATATAGATGTTACTTTC	3510
TTCTTATGAAGCTACTCAAACCTATATAAGAGTGCATGCTACATAATAGTTATGCACATTCTTCATCCTAACGTTTATAGTATTCTTC	3600
CATTATGCAAGATTGATCTGTTCTCTATAATAAATTAACAAATTTAAGATTTGTTGTATGTTTTCATACAAGTTCTATTTACATGGTAT	3690
ATCATTGGACATGATTAGGGTTATGTCATCAAATGTTTCCCGCTCTGKCCCTCGTCGTGATTTTTGCACTTTTTATAAATTATCCACAA	3780
CCACATATTGTGGTTGTTTTTGGTATATTACACTCCCTTAATTATCACAAAATTTCAAACCACTCTATTATTTTTTATATATTTTTTA	3870
AGATTATAATTAGGTAAGGACACACCATATAGGAACAATGCTTTTTTCAAAAATATATTGTTTTCTCAGTACTTTTGTCCATATCAAAA	3960
ACAACAACATACGTATCAAACCTATGGGAATAAAGATCTTGTGCTTACCTGTCTAATCTTTATTTGCAATAGAAAAACATGTTATTTCAT	4050
<u>K T H V I H</u>	
TGGGTGAGGACAGACTGCTATCGTTCTGTTGATGAAGCATATGAAGATGGAAGAAATCGGCTTGAAGCTTTGTTATCAAGATTACATTGC	4140
<u>W V R T D C Y R S V D E A Y E D G R N R L E A L L S R L H C</u>	
CTCAATGTGTGAGTTCTAAGACTTGGATAACTCATCATTTTCCACAAGCATTGTTTCTTCTACTAGTCTCATTTTACTAATCAGCTATT	4230
<u>L N V</u>	
AATCATTCTTGTAGCCCAACACTTTCTTCTGGTTCTATAAACTCAATGTTGAAAACCTTTGGCCAGTAATGCAAAAATCAACGATGTCA	4320
<u>E N F G P V M Q K S T M S</u>	
AGCGAAGAATATAAAAATATCGTTGTCCAAGCTAAAGAACACATCTTGGCCGGTGACATTTTCCAAGTTGTTTTAAGCCAGCGTTTGGAG	4410
<u>S E E Y K N I V V Q A K E H I L A G D I F Q V V L S Q R F E</u>	
AGACGGACATTCGCCGACCCCTTTGAAATCTATCGTGCATTGCGCATCGTAAATCCTAGTCCATATATGGCCTATCTACAGGTGACTATA	4500
<u>R R T F A D P F E I Y R A L R I V N P S P Y M A Y L Q</u>	
ATACATGCAAAAATATATAGTTTTGTATAACATGTTGACCAACATATACTAATTGATATGCATGTGATTCATCTTATGACAACTCTTAG	4590
GCACGAGGTTGATTCTCGTGGCATCGAGTCCGAAATCTTACC CGGTACAAAAGTATAGTGAATATTTAAACATATCTCCAAGTTA	4680
<u>A R G C I L V A S S P E I L T R V Q K</u>	
TAGTTTTACCCTATTCTTTAGAAATTATTGTATATCTATAGCGACATTGTAGCACATGTGACATAGCAACATACTTTGTGATTTTTCAA	4770
ATAGTGAATGAAAACGTAGTTGAGATTGATGTGATAAAATTAACGGGAATCCATAACCTCAACATGAAATATTTAGCAATGTTATTAG	4860
AACCAATGCAGTTTAAATTATATTACCTTTCCATATGCTTAGATTATCATAAATTAACCTTAGTGGTTATTGCACTATCTTAAATATTAT	4950
AAAAAATATTATGTTGAAAGTATCATAATGAACCTTTCTTTCTATAATTATATTTTTTTCAGAGGACAATAATCAATCGTCCGCTTGCTGG	5040
<u>R T I I N R P L A G</u>	
AACCATAAGAAGAGGCAAAAACAAAAGCAGAAGACAAAACCTTTAGAACAATTGCTTTTTGAGTGATGAAAAGCAGTGTGCTGAACATATTAT	5130
<u>T I R R G K T K A E D K T L E Q L L L S D E K Q C A E H I M</u>	
GCTAGTAGATCTTGGCCGAAATGATGTTGGGAAGGTTCAATTTTTATTTCTGTTTTTTAGCATGCTTCTTTCCAATTCATTTTAGAAT	5220
<u>L V D L G R N D V G K V</u>	
TTGTGCCATTTATATTTCTTCATTATCTTCTATATCCGTAATATTGAGAAGCTTCTGGATGACAAGATACTAGAGTGGTCATGGCTTTAT	5310
GTTAGTAAAGTCGGTTCTAAAACCTAAATATTTTGGAGCATGGTAAACATCTTAAAGATCTGGATAGGAATGTAACCTTTTCGAGTAGAAAT	5400
ACTTTGTGGAATGTTTATAGTGGTTGCTACTTGCCATGAATCGAACTTTTACCAGTTTTATGGACGACTATATTTTTCAGTTTTATGTTTAA	5490
GCAAATTTGAGAAAGTTTCTATAACAAAAATAGATAAATTTCTATCGGACACATCATTTATTTCTACATTTTTATTAGTGGATAATAAT	5580
GAAATACATGCAATATCAACGAGAAGGACTTGATTGCGTTACGGTTTACGACAAGACAAACCTTTATATATGCTTGTCTGCTACTATGGTTCA	5670
GAAAAAGTTAGTTTGGTGTTTTATTAGTTATTAGTTATTACACATCTATCTGTTTTTCTACTACAATGAACCTTGTCTTATTACAGGTGT	5760
CCAAACCAGGTTTCAAGGTTAGAGAAATTTGATGAATATCGAACGATATTCTCATGTGATGCACATCAGCTCAACAGTGGTCTTCTTG	5850
<u>S K P G S V K V E K L M N I E R Y S H V M H I S S T</u>	
TAAAATAATAACAAAATTCATCACTATCACAATTTTCATGGATGATTTAGTTAAACAATTTATCGTCTTTATCATATAATACAAGCGTAGC	5940

Ergebnisse

ATTAAGTCTTATTATGATTGTTTCTGTGAGTAATCTTTTTATGATTGTATTATCAAGAATTATTTATAAGAAACATGCCTATTTTAAA	6030
ACTTATGTAGGTAACCTGGAGAGCTACGCGATGATCTTACGTGTTGGGATGCGCTACGAGCCGCATTGCCAGTTGGAACCGTTAGTGGCGC	6120
<u>V T G E L R D D L T C W D A L R A A L P V G T V S G A</u>	
TCCAAAGGTAACCTGTTGAACATGTAGTAATAGTCATGTATAACTAAGGAACAAACAACATGATTGTATCCCTCAATGTTGTTGTGACA	6210
<u>P K</u>	
TCCGATCACTATAAACACATTAGTTGAACCACACCCTGTTAAAAACAAAACCTTACTTCTATAAAAAGGGTCTGCTTTTATAGAAAAAA	6300
CATGGATTTGGTACACCAGCTGGAATACAATATGATAGAAGGTGAGAAAAACATAATATCAACATACACAATCTGTAGAAAAGAAGTAAAG	6390
CACCATTAACAAACAGCGGTACTAGCTAAATACATGCAAACTATAAACATATAGAAGTTGTTGTTAACATGATGAAACATAGTATATGTC	6480
AACTAGGGATGGCAACCTTCCCGCAGATATATGTACAAAATCCATCCACGGATGCGAGTCTAGATATAAAATCTACCAGTGGATATG	6570
GGTGCGGGTATATTGCTTTACCATTGGTGCCTGAAATGCAAGGGTATATATTCTAGTGATAAACCAACTCGCATATGCAGATAATC	6660
ATAGGTATCATATTCAATGTGTATACCTGTGTTGGCCGCGTAAGGAGGCCATTTTTGTACTGTTTTTGCCTCCTAAGGCCATTTTTT	6750
CTTCTTAATATAATGATGCGTAGTCTCCACTTCTGATAAAAAAGGTATGCAAACTGTTACTCGCAGGTATAAAATTTACCATTCC	6840
ATACTTCGTTGCGAGTGGTAATTTACTCCATCCGTGCCTTAGCTGGCACACGCATCATTAAATGTGAACCTCCCTATCATGACTAAACTGG	6930
TGATAAACTTGTGTATATTTATGGGTTTTAGTAAACATTTATAAACTTATAATAATTTAGGATATATCATTAGTATGTTTTTCATTGCA	7020
TGACCATTGACTAAGTGGTGTCTTCGCTTCAATGATGTTGTTGGCAACATTTTTTTCTTTTCCCTGAAGCCGTCTTGAGTCTGATTT	7110
CTCATGTCGTTTTGTGAACCCAACAGGTGAGAGCAATGGAGTTGATTGATCAGCTAGAAAGTGAATGCGTGGGCCGTATAGTGGTGGC	7200
<u>V R A M E L I D Q L E V S M R G P Y S G G</u>	
TTTGGAGGGATTTCCCTTTCGCGGCGACATGGACATGGCACTGGCTCTTCGCACTATCGTCTTCCCACCCGATCTCGGTTTGATACCATG	7290
<u>F G G I S F R G D M D I A L A L R T I V F P T A S R F D T M</u>	
TACTCGTACACAGACAGTAAGTCCCGACAGGAGTGGTGGCTCACCTCCAGGCCGAGCTGGCATAGTTGCTGATAGCAAAACCGGATGAC	7380
<u>Y S Y T D S K S R Q E W V A H L Q A G A G I V A D S K P D D</u>	
GAGCACAAGAGTGTATAAAACAAGGCTGCAGGTGTTGCTCGTCCATTGACCTTGTGAACTTACATTTCTTGAAGACTAGTCTAGTCTA	7470
<u>E H Q E C I N K A A G V A R A I D L A E S T F L E D</u>	
ATGAAGGAAATGTATGTTAAGTTCTCTGTACAATATGATGTCCTAGAAAACAGGCTTTCTTAGGCCGAATAAAAACTCAATTGTAA	7560
TAAAGTTAATAAATGGACAACCTTAGCTATCATAGCATGTTAATTTACATTAGAAAACGGCAGTTTAAGGCCGACAATCAAGAAAAGCAT	7650
GAAAAACATCCAATATGTGATGTTTCATGTTTGTCTTAATCATTGACATCTAGTTGTGCTTTTTATCATATATTTCTTTTCATT	7740
GACGAGGAAAGTCTGTAGTTGCTGCTCAGTTGACTTCTATGCATATCACAATCAGCCATGTGCACCGTACTGGTTCTAACAGAATATC	7830
ATAATAATTTCTTGTAGTCTTTTATCTAAAAATCATTGTAAGGTGAGAAGTTTATAAGATTGCTATATATATACAAAGAACTGTGTTT	7920
TCGTATTTCAAATAACATTATAGAAGACTAATGTGAGGTTAAGATTTATAATTTTTTTGTTAAAGTGATACTTTTGAAAAAAGAACGAAA	8010
ATTATTTTAAATATTTCTATCAAATTTGGGAAGAATTAGGACAAAAGCTGTGTTGACGATCTAAAACTTCACTTAAGAAGTAAGATGT	8100
GTGCATATAGCCTTAAATAATAAATATGCTCAACCTAACAAATGTTACATACATTTAATTATGAGCAAAAACAACAGGCTTCTAGCAATC	8190
TGGTTATCTGTGTGGTCACTGGTCAATCCATATCCTTTGCAAACATTGCACTAACACCATCGGCTAGCTAATGCATAATCGATGTTCTT	8280
ATTGCATACATTGGTGCAAGTAATTGCTCAAGTTAATTTTCCTAAGTCGGACTATCCGCTATCCAATCGATCTTGTTCAGATAATCATC	8370
ATCGTCAGTCTTAGAATGTAGTGAGCACACCACACCATCATAATTTCAAGGAATAAATGGTCACAAGTCGTACAAAATATAATAACAA	8460
CTCAAAAGTACTTGACAAAAAATAGTTTACATACACAACACAAAAAGAAAATATTCCTCAAGAGCAGCTTGTACACTCCTTTGTGCAC	8550
CCACACTTGCAATAATCAAGGTAGCAAGACGATGGTCAATGTTTGTCTCGTATATCCAAATGTAGGCCACCATTCTGTTGCAATAATGGA	8640
AATAGCCATAAGCATCCTTCAACAATCATGCAAAGCAACTTAAGGGTAGTACCATAAGTATGAGGTACCATGTGACTTATCCACAATATA	8730
ATGCTACAATTGAAGTGGTGCAATGTTGGTAGCCAAGGTCATTGGAAGGTAAAGTTGAATGTAAGTATCCACAATACAAATTATTGAAA	8820
GCAAAAGAAATATAATGCCAAGATCTCTAGTCAAGTACAAAACCTGTTTACATAAGTAAATATGATCATATCACATGATCTCAATCTTCCA	8910
TAGTCTCGTTTTGAGAATTC	8930

Abb. 5: Sequenz des genomischen Klons von *ZmAsa1*. Unter der codierenden Sequenz ist die Proteinsequenz angegeben. Die der cDNA entsprechende Sequenz ist unterstrichen, auf die putative Lage und Sequenz von Exon1 und Intron1 wurde durch Vergleich mit der orthologen Reissequenz geschlossen. Sie sind nicht experimentell bestimmt.

Ergebnisse

CTGATGGTTTTTACTTGGACGAACCGGTACCGGTAGCCTCCCAGACCGTTGTCATCGGCTGAACAGTTTATTGGCTGACGGTCGGTCCAC	90
GATCCTTGGGACGACTGTCGTGAAGACTTTGGAATACGGAACGGAGCACACATGTTCCGCCGATTGCGGAACGAGTTACACGCGCACGCGC	180
CGCCACGCTGGCCGTTTTCCCCTCATCCATCAACTGCGCCTGTAGATCGTGGCCGCTGCTGCCCATACATTACTTTGCTCCGATCGAGTA	270
AAAGAGGGCCTCGTTTTCTCGTGGAGAAACCACAACATCAGCAACATATAGCTGCGTTCGCTGAGAATTGTCGCCTACCAACCACACG	360
TTGATGCGCGCCGTGGTGCCACGGGCGCTCGCGCCCCGCTGCCGTGCAGTTTCCGCGCACGACCAAGTGAGCAGCGCACGCCGGGGCGG	450
CGGACTGACACTGCCGTCTAACGTTTAGCTGGCTTCAATGCCGATTTGTTTGGTTGTTTAGAGCGAAGGTTTCTGTGTGCTTAAGGCAC	540
GGTATACCTATCAACCAAGTAGAGGTGATCAAAATGAAGCTGAACCATCTGGGATCAATAATTACGAAAGAGTCCATGAAGAAGGGATGAC	630
AGACGAGGACACCATCCACTGTGGCTCCATGCTCGGGCACAACCGNCCACGATTGGTGGNTGCCTTGGTGTGGGGACCCAGACACCGGG	720
ATTTTTCGTGCAAAACACTTGCAGCTAATTTGGCCCTGTCTTACTGTCTCCGATACGATAAGGTTACCACGGCAGCGGTTCGACAGANT	810
ATTCTCCTGTGTCCAGTGTCCACAAAATANATACACGCTATATATATCAAAGAATTAATTTTCAAATTTCAATGTTTATACCTTCAAT	900
GAAGTTTATAGAAATCATATTTCCACAACAATAATAATACACATTATTTACTATATATTTAGTTGATTTATTTTCGAGATGAAAGAGTA	990
ATATTATATATTTTTTGACAAGTACTGACTCGTCCCCATCATCAATCAGGCAAGCGACGGTGGCTTCTTCTCCCTCCACTCCCCAG	1080
TCCCCTTACCCAAACCAAGCCGCTCGCCAGCACCCAGCAGCCCGCATCACTCGTCTCCATTAATAATCGGTTTCTCCTTGAAATCTG	1170
CTGGCGTGTCCAGGACCCAAATGCCCACTCTTATTACCTGCTAATTTTGAATTTCTAATCAGGTTGCAGCTGCTTATATAAGCTCAC	1260
TGACCCCGCTTCGCTTCTCCGACTCCACCTCCAGCCAAATCGGCCTATAGATCAAACGCTGCACGTAGGGAGCGTGAAGCCAGCGG	1350
CGAATGGAATCCCTAGCCGCCACTCCGTGTTTCGCGCCTCCCGCTCGCCGTCGCGCGGGCCCTGGTTAGGGCGGGGACGGTG	1440
M E S L A A T S V F A P S R V A V P A A R A L V R A G T V	
GTACCAACCAGGCGGACGAGCAGCCGGAGCGGAACCAGCGGGGTGAAATGCTCTGCTGCCGTGACGCCGAGGGAGCCAGTATTAGC	1530
V P T R R T S S R S G T S G V K C S A A V T P Q A S P V I S	
AGGAGCGCTGCGCGCGGAAGCGCGGGAGGAGACAAGAGCGGTTCTTCGAGGCGCGCGGGGAGCGGGAAGGGAACTGGTG	1620
R S A A A A K A A E E D K R R F F E A A A R G S G K G N L V	
CCCATGTGGGAGTGCATCGTGTGCGACCATCTCACCCCGTCTCGCCTACCGCTGCCTCGTCCCCGAGGACAACGTCGACGCCCCAGC	1710
P M W E C I V S D H L T P V L A Y R C L V P E D N V D A P S	
TTCTCTTCGAGTCCGTCGAGCAGGGGCCAGGGCACCACCAACGTCGTACGTGCCTCATGTTCCCTGTCAAATCTGCTGCTCTTTA	1800
F L F E S V E Q G P Q G T T N V	
TCGAATTTATCCCCGTCAAGAGCTCGCGGTGCGCATGCGGACTGATTGGATTGGATTGCAGGGCCGCTACAGCATGGTGGGAGCCCA	1890
G R Y S M V G A H	
CCCAGTGATGGAGATTGTGGCCAAAGACCACAAGGTTACGATCATGGACCACGAGAAGAGCCAAGTGACAGAGCAGGTAGTGGACGACC	1980
P V M E I V A K D H K V T I M D H E K S Q V T E Q V V D D P	
GATGCAGATCCCAGGACCATGATGGAGGGATGGCACCCACAGCAGATCGACGAGCTCCCTGAATCCTTCTCCGGTGGAGCAGCTCGATT	2070
M Q I P R T M M E G W H P Q Q I D E L P E S F S G	
GCTGAGAAGGAGAGAAGATTTGATGTTGCCGATGATGTTATGTGAATAGTCACTTTTGGTCTTCTGTTCTTGATAGGTGGATTGGG	2160
G W V G	
TTCTTTTCTATGATACGGTTAGGTATGTTGAGAAGAAGAAGCTACCGTTCTCCAGTGTCTCCTCAGGACGATAGGAACCTTCTGATGTG	2250
F F S Y D T V R Y V E K K K L P F S S A P Q D D R N L P D V	
CACTTGGACTCTATGATGATGTTCTAGTCTTCGATAATGTTGAGAAGGTAATAATTCAAGAATTTCTGTTCTCGTTCGTAACCTAACTCAT	2340
H L G L Y D D V L V F D N V E K	
GATGTTCTCTGTTTCAGAGTATTGCTTACAGTTGCAGTTATGATTAAGTATTAATCACTTTGCCTTGGAGCACCAATTTTTTGGAGG	2430
CTGAATAAGATAGCTAGTATTGATATAGGAAGTTAACTATACTAATTTCTAAAGATATGATGATGTTGTCAGTGTTCATCCTATT	2520
TTTTTTTTACATCTACAACAGACAGAAACTACACCGGTTGGTGCATTTAGGTAATTTGCACCTTATGAGGCTGTTTCGCTTGGAGACAAT	2610
TTGTGGGGAAAATGTGTTTCTCAATGACATGGTTCTTTTCTGTTTATTAGAAAGTATATGTTATCCATTGGGTCAATGTGGACCG	2700
K V Y V I H W V N V D R	
GCATGCATCTGTTGAGGAAGCATAACCAAGATGGCAGGTCGCGACTAAACATGTTGCTATCTAAAGTGCACAATTTCAATGTGTAAGCTAT	2790
H A S V E E A Y Q D G R S R L N M L L S K V H N S N V	
GCTGCCTATTTTCAATTCGATCTGCTAATTACTTTGKTCACTCTCATTTGATCTATTTGCTTTGGATTTTCAGCCCCACTCTCTCCTGG	2880
P T L S P G	

Ergebnisse

ATTTGTGAAGCTGCACACACGCAAGTTTGGTACACCTTTGAACAAGTCGACCATGACAAGTGATGAGTATAAGAATGCTGTTCTGCAGGC	2970
F V K L H T R K F G T P L N K S T M T S D E Y K N A V L Q A	
TAAGGAACATATTTATGGCTGGGGATATCTTCCAGATTGTTTTAAGCCAGAGGTTTCGAGAGACGAACATATGCCAACCCATTTGAGGTTTA	3060
K E H I M A G D I F Q I V L S Q R F E R R T Y A N P F E V Y	
TCGAGCATTACGGATTGTGAATCCTAGCCCATACATGGCGTATGTACAGGTATAGAAGCATAAAGTACACCCATTTGAACATTTGGTATG	3150
R A L R I V N P S P Y M A Y V Q	
TGCACTGATTTGCCTCAGATTTTATAATCAACACCTTTGACTGTCTATTTAGGCAAGAGGCTGTGTATTGGTTGCGTCTAGTCCTGAAAT	3240
A R G C V L V A S S P E I	
TCTTACACGAGTCAGTAAGGTATATGAATTTTGGACCTTTTATGATTATTCATTAGATTATAAAATTGCTTCTCACAAATGTGCACATT	3330
L T R V S K	
TTTTTAATATTTCTCAGGGGAAGATTATTAATCGACCCTTGTGGAAGTGTTCGAAGGGGCAAGACAGAGAAGGAAGATCAAATGCAAGA	3420
G K I I N R P L A G T V R R G K T E K E D Q M Q E	
GCAGCAACTGTTAAGTGATGAAAAACAGTGTGCCGAGCACATAATGCTTGTGGACTTGGGAAGGAATGATGTTGGCAAGGTCTGTATTTT	3510
Q Q L L S D E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K	
TTTTTCCCTATTAGAACTCCATAATATAGTACATTGCATTCTGATATAAATACAATGCTATTTTTCCTTTGGGAAATTTGGATCCATACC	3600
ATAAAAGATCACCACTTTGGATCCATACCATTACTATCTCACTTACATGTGGGTCCACATGAGTCAATGACATGTGGGGTCCATGGTAT	3690
ATATCTAAAGTTTGGATCTTTTAATGGTATAGATCCAATTGKCTTTTCTTTTGAAGTATTTTCTATTGTTAACTCACATTCTGACAT	3780
GATAGCAATGTCATGGCCATAAGAATGGCTAGTATGCAATCTAGCCATCCTTTAAAGTCATGAAAACGGATATGTTTGGCCGATATT	3870
GCTCTCCAATGGTGGCTGTATTGGATGTTTTTCTGATGACTGCGCTTGATAGGTATCCAAACCAGGATCAGTGAAGGTGGAGAAGTTGA	3960
V S K P G S V K V E K L	
TGAACATTGAGAGAWACTCCCATGTTATGCACATCAGCTCAACGGTTAGGCTGTTCTTCCCTCATGCAATAAAGTTATTATGATATATCA	4050
M N I E R ? S H V M H I S S T V	
AATTTACGCTTTGCAAATTTATAGATACTTGATAATTAATAAATCACCTTCATTGAATTTGGTTTAGCATGTTTCTTGCGGCAATAAT	4140
CTTTAATTAGATTATAAGCGAACGGGCCTTTAGCTGAGTTGTTTAGATGGCTCCAGTAGCACTACTCAGATCCTGTGTTTCGACTCCATAAT	4230
AAGATCGAATTTTCAGAGTGGGGTTAAAAACGTCAACTGATGGTTTCTGTTGTGTGAACATGAGACAGACTAACCTATGCGGGGTGGA	4320
TCCTCATGTAGTGGCTAGGAGACTCAAAGCACGGGTAAGATCTGGCCTATAGGGGGTGGACCCCTTATGTTGCACGGGGGCTAGTTTTTCG	4410
TGACCTTTTTTCGATTGGGCTATAATTGAGCTTCTTCTTAATATGATAATGTGGGGTGGTCTTTTCCACCGGCCGAGTTTTTAATTAATA	4500
TTATAAGGGTTTGCTAACGGCAAGGGTTAGCTCAAAAATACAAAAAATTTATCAATGATCCTTGAGTTAATACTCTTTTATTTGGC	4590
ATTGAGGAATAGTCTACAATATGGTTTCAGTTTCAGAAATACAAAAACAATTTGTTATACAACCTCAGTAAATTACATGCAATGTCGTTTCT	4680
AGTTATCTGGTTTGGCTTATTGTATGACCGCTGACGCGGTTGATATCATTTTTGTTACTTTTTGTTGTCTTCTGCCGATTTTAAACATGCA	4770
TACGAACAGCCTTTCATATTTTCCAAATGGCACCTTTGTTATATTTTCTAATATTGACATGATGATTGTTAAATGAACAGTTGTGAGTC	4860
TACGGGCTTGGTTTCCAACTATGAAAAATTTTCGACAACAATTAATGTTTAATGAACGAGTGTTTTTTTTTGTTGTGAAATTTTCATTTCAAT	4950
CTACAAGATGGATTTTGATTATAGTGTACATGGTAGAAGATCTAGGCTTTGGAAAATATTGCAATGTCATGCAAAAAATTGTAACATCG	5040
GGTTGAATGTTTGCAGGTTAGTGGACAGTTGGATGATCATCTCCAGAGTTGGGATGCCTTTGGAGAGCTGCCTTGCCCGTTGGAACAGTCA	5130
S G Q L D D H L Q S W D A L	
GTGGTGACCAAAGGTGAAGTTGTTTCCAATATCTTATTGGATCTTGAACCTTCACTCATGTAATATATTTTTTGTGTGACATGTTTG	5220
CCAAATTTTCTGCCTCTTGATATATGTTTATATTAAGTCACGCAATGCTGGCCTAAAATATCATCAGCGATTGTAACATTTTTAACTTA	5310
TTATAATTTGACATGTGTCTGATATAGATTCTTGATCGTTCTTTAATTGCAACGCAATTCATTTGTAGATCTATTTGACTATGTTGCTC	5400
GGTTTAGTGGCTGACATATTTGTGGCTATTCTAAAACCATCCCCATTTACTGACTTCTTCTTTTTTAAACAAAGTATTTTTTCTCTGC	5490
TTTCAACAGTTGTTTAGAGCTAGTTTGACAACCCTATTTTTTAAAGGGATTTTCATTTTCTTAACGCCCGTTGGATCATTG	5574

Abb. 6: Sequenz des genomischen Klons von *ZmAsa2*. Unter der codierenden Sequenz ist die Proteinsequenz angegeben. Die der cDNA entsprechende Sequenz ist unterstrichen, auf die putative Lage und Sequenz von Exon1 wurde durch Vergleich mit der orthologen Reissequenz geschlossen. Sie ist nicht experimentell bestimmt.

3.1.3 Vergleichende Charakterisierung von *ZmAsa1* und *ZmAsa2*

Die putative codierende Sequenz von *ZmAsa1* ist 1734 bp lang, die von *ZmAsa2* 1742 bp. Die genomische Sequenz von *ZmAsa1* weist 10 Introns unterschiedlicher Länge auf, die Sequenz von *ZmAsa2* vermutlich nur 9 (Abb. 7). Vergleicht man die Exon-/Intronstrukturen beider Gene, fällt auf, dass die Lage der Introns identisch ist. Ausnahme ist das erste Exon von *ZmAsa2*, das bei *ZmAsa1* vermutlich in zwei Exons mit einer kurzen Intronsequenz aufgeteilt ist (vgl. Abb. 7). Für das 3'-Ende der beiden Sequenzen kann keine Aussage getroffen werden, da hier die Sequenzinformation für *ZmAsa2* fehlt.

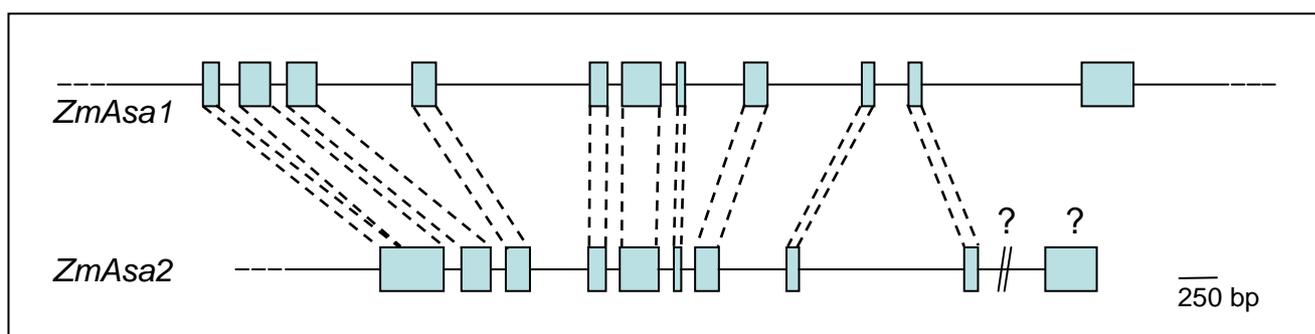


Abb. 7: Exon-/Intronstruktur der beiden Gene *ZmAsa1* und *ZmAsa2*. Exons sind als Kästchen dargestellt, nicht codierender Bereich (Introns, 5'- und 3'-Bereich) als schwarze Linie. Durch die Fragezeichen soll das Fehlen des 3'-Endes im genomischen Klon von *ZmAsa2* verdeutlicht werden.

Ein Vergleich der Proteinsequenzen beider Mais-Anthranilatsynthasen ergibt eine Aminosäureidentität von 69,7 % (Tabelle 7). Dagegen haben *ZmASA1* (*Z. mays*) und *OASA1* (*Oryza sativa*) 85,3 %, *ZmASA2* und *OASA2* 87,9 % Identität (Tabelle 7). Das Alignment dieser vier Proteinsequenzen in Abb. 8a sowie der daraus resultierende Stammbaum in Abb. 8b zeigen, dass die Duplikation der Anthranilatsynthasegene in den Gräsern vor der Aufspaltung von *Z. mays* und *O. sativa* stattgefunden hat und *ZmAsa1* und *ZmAsa2* einen monophyletischen Ursprung haben.

Tabelle 7: Homologie der Anthranilatsynthasen auf Proteinebene (% Identität). *ZmASA1*, *ZmASA2*: Anthranilatsynthasen aus *Z. mays*; *OASA1*, *OASA2*: Anthranilatsynthasen aus *O. sativa*

	<i>ZmASA1</i>	<i>ZmASA2</i>	<i>OASA1</i>	<i>OASA2</i>
<i>ZmASA1</i>		69,7	85,3	69,2
<i>ZmASA2</i>			67,6	87,9

Ergebnisse

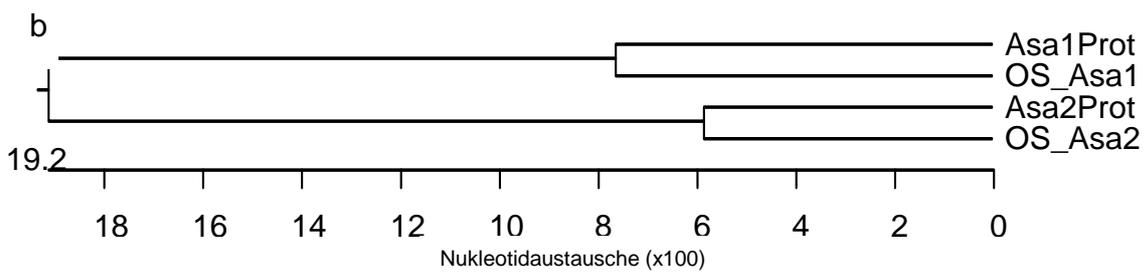
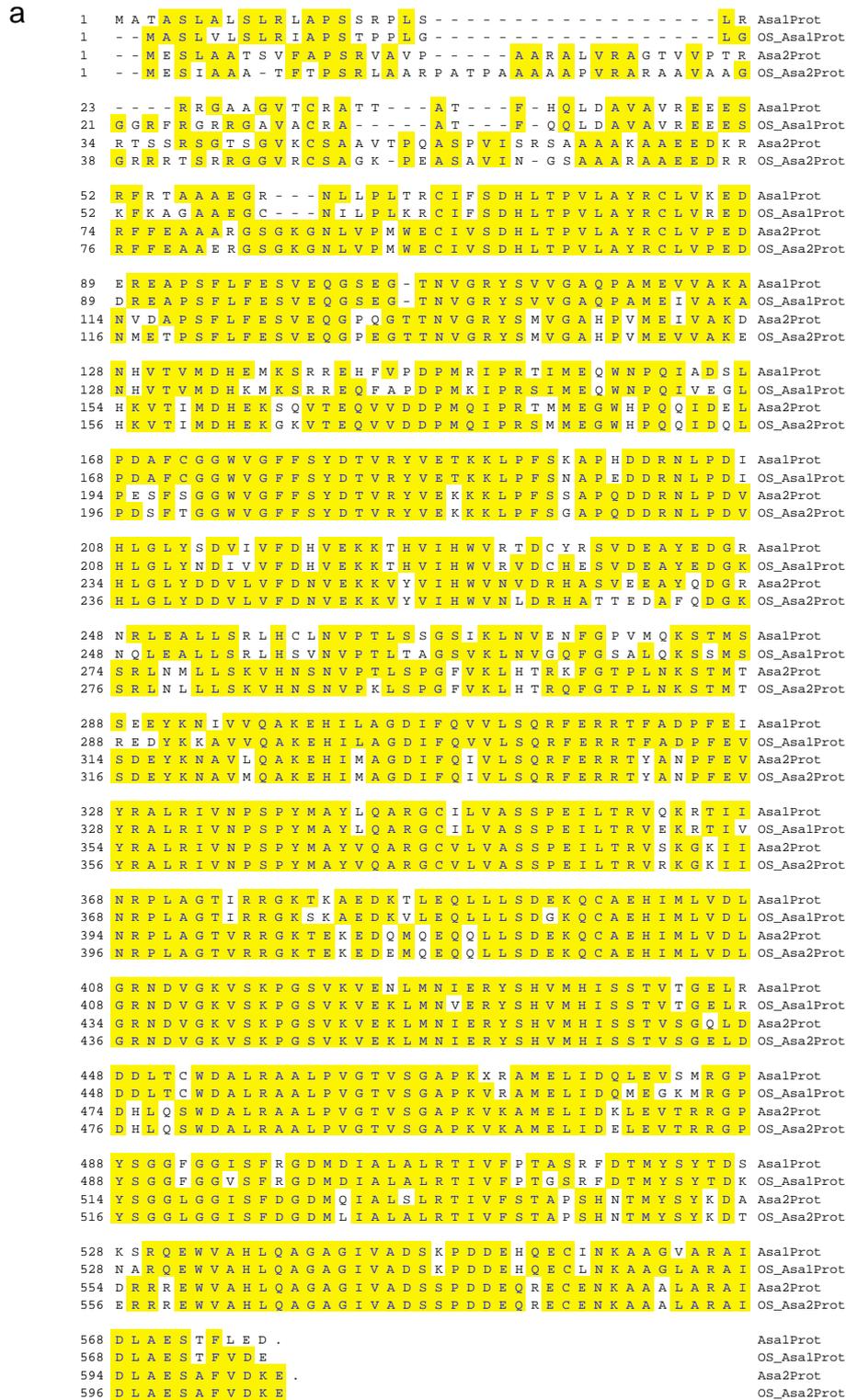


Abb. 8: **a:** Alignment der Proteinsequenzen für die einzelnen Anthranilatsynthasen aus Mais (*Zea mays*) und Reis (*Oryza sativa*), identische AS sind unterlegt. **b:** Stammbaum, resultierend aus **a**.

3.1.4 Heterologe Expression von *ZmAsa2*

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern und als Kontrollprotein für Westernanalysen wurde *ZmAsa2* heterolog exprimiert. Die entsprechende cDNA-Sequenz wurde wie unter 2.2.7.1 beschrieben in den Vektor PET3AHis inkloniert und mit Hilfe des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG exprimiert. Aus 1,8 l *E. coli*-Kultur wurden mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose 820 µg ZmASA2-Protein isoliert.

3.2 Experimente auf RNA-Ebene

Zur Expressionsanalyse auf RNA-Ebene wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen die quantitative real time PCR mit Hilfe des Lightcyclers (Roche), zum anderen die Technik der *in situ*-Hybridisierungen. Mit der PCR-Methode können quantitative Aussagen über die Transkriptmengen der jeweiligen Gene getroffen werden, die *in situ*-Hybridisierungen liefern Informationen über die Lokalisierung der Gene.

3.2.1 Quantitative real time-PCR mit dem Lightcycler

Neben der Information über die einzelnen Transkriptmengen bietet diese Methode auch die Möglichkeit, zwischen sehr ähnlichen Genen zu unterscheiden. Dazu wurden die Primer so ausgewählt, dass sie in den spezifischen Bereichen der jeweiligen Gene binden. Die Spezifität wurde mit den klonierten cDNA-Sequenzen überprüft.

3.2.1.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Für die Lightcycler-Experimente wurden Primär-, Embryonal-, und Kronwurzeln von *Z. mays* der Linie LG22 in unterschiedlichen Entwicklungsstufen verwendet. Da Maiskeimlinge gleichen Alters Wachstumsunterschiede aufwiesen (vgl. Abb. 9a), wurden die Entwicklungsstufen nicht über das Alter der Keimlinge festgesetzt, sondern über die Länge der jeweiligen Wurzeln. Für die Primärwurzeln wurden folgende Längen verwendet: 1 cm, 3 cm und 12-15 cm (Abb. 9b - d). Für die Embryonal- und Kronwurzeln wurden 1 und 3 cm lange Wurzeln untersucht (Abb. 9e, f). Die 1 cm langen Wurzeln wurden im Ganzen analysiert, längere Wurzeln wurden in drei Abschnitte geteilt. Wurzeln besitzen, wie bereits beschrieben drei Zonen: Die Wurzelspitze (mit Wurzelmeristem und Kalyptra), die Elongationszone und die

Differenzierungszone. Allerdings gehen diese drei Zonen fließend ineinander über. Deswegen wurde die Einteilung folgendermaßen vorgenommen:

- 0-1 cm: die Wurzelspitze (SP), sie enthält die Wurzelhaube, das Wurzelmeristem und die Elongationszone,
- 1-2 cm: die Übergangszone (ÜBZ) zwischen Elongations- und Differenzierungszone,
- der obere Rest der Wurzel: die Differenzierungszone (DIFFZ).

Bei den 12-15 cm langen Wurzeln ist in der Differenzierungszone eine große Anzahl von Seitenwurzeln vorhanden (Abb. 9d). Diese wurden in die Untersuchungen miteinbezogen, d. h. nicht entfernt. Die Embryonal- und Kronwurzeln wurden für die Expressionsanalysen ausgewählt, weil sie unterschiedliche Entstehungsorte besitzen. Die Embryonalwurzelsprimordien entstehen aus dem Skutellarknoten während der späteren Phase der Embryogenese, wohingegen die Primärwurzel aus dem basalen Meristem gebildet wird und ein endogener Bestandteil des sich entwickelnden Embryos ist. Die Kronwurzeln schließlich werden aus den Sprossknoten gebildet (Feix *et al.*, 2001).

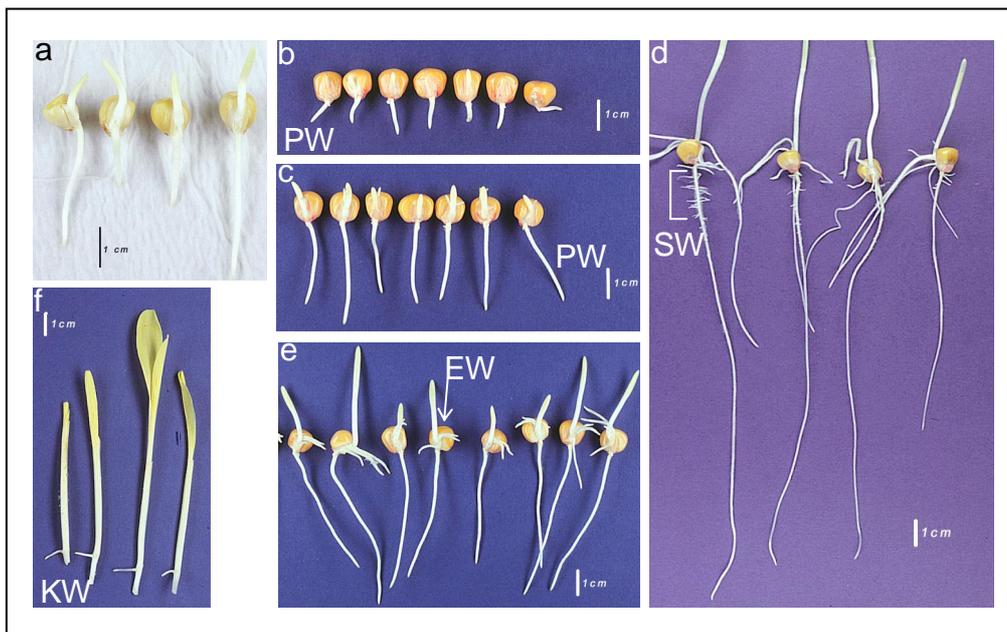


Abb. 9: Verwendetes Pflanzenmaterial der Linie LG22. **a:** 2-3 Tage alte Maiskeimlinge; wegen der stark unterschiedlichen Größe wurde das Entwicklungsstadium nicht über das Alter, sondern über die Länge der Wurzeln festgesetzt. **b-d:** Primärwurzeln, 1 cm, 3 cm und 12-15 cm Länge; in d sind die Seitenwurzeln zu erkennen. **e:** Embryonalwurzeln, 1 und 3 cm. **f:** Kronwurzeln, 1 cm Länge. EW: Embryonalwurzel, KW: Kronwurzel, PW: Primärwurzel, SW: Seitenwurzel.

Das Pflanzenmaterial wurde nach dem Zerschneiden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Die Herstellung der RNA und die cDNA-Synthese erfolgten wie in 2.2.4 beschrieben.

3.2.1.2 Analyse von Primärwurzeln von *Z. mays*

Die Expression folgender Gene wurde in den Primärwurzeln von Mais untersucht: *Bx1*, *Bx3*, *Bx8*, *Bx9*, *ZmAsa1*, *ZmAsa2* und *TSB2*. Alle Daten wurden gegen das „housekeeping gene“ cytosolische Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDHC) normalisiert. Die hier gezeigten Daten sind die Mittelwerte aus zwei Lightcycler-Experimenten einer cDNA (Abb. 10).

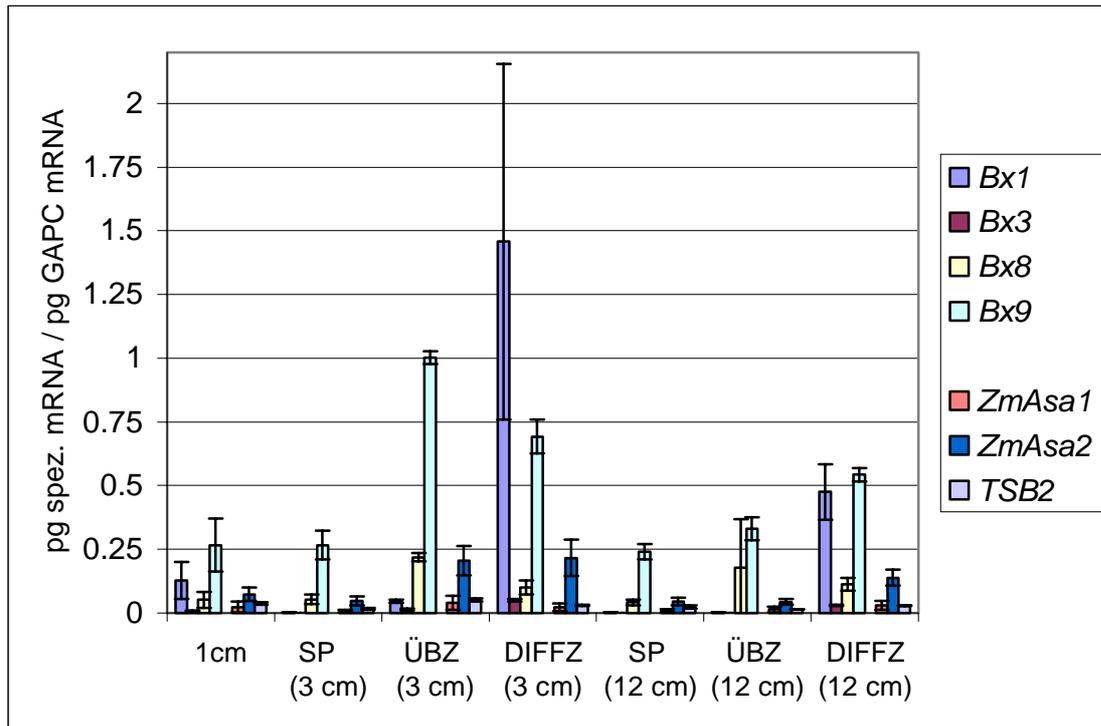


Abb. 10: Ergebnisse der Lightcycler-Analyse mit Primärwurzeln unterschiedlicher Länge. Die Daten wurden gegen GAPDHC normalisiert. SP: Spitze, ÜBZ: Übergangszone, DIFFZ: Differenzierungszone. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die relativ höchsten Transkriptmengen für die *Bx*-Gene werden in der 3 cm langen Wurzel nachgewiesen. Das Transkript für *Bx1* ist in der 1 cm langen Primärwurzel nachweisbar, die nicht unterteilt wurde. In der Spitze der 3 cm langen Wurzel konnte die mRNA für *Bx1* nicht nachgewiesen werden, in der Übergangszone nur in geringen Mengen. In der Differenzierungszone ist die relative Transkriptmenge für *Bx1* extrem hoch. In der 12-15 cm langen Wurzel ist die Differenzierungszone die einzige, in der *Bx1* nachgewiesen werden konnte. Die Transkriptmenge für *Bx3* ist generell geringer als *Bx1*, das Muster stimmt ansonsten überein. Die Gene für die Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* konnten in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, wobei die Transkriptmengen von *Bx8* stets von denen von *Bx9* übertroffen werden. Die relativ höchste Menge für beide Gene ist in der Übergangszone vorhanden. Die drei Primärwurzelgene *ZmAsa1*, *ZmAsa2* und *TSB2* werden in allen Geweben

exprimiert. Die Werte von *ZmAsa2* liegen stets höher als die von *ZmAsa1*. Während der Entwicklung der Primärwurzel kommt es zu einer Erhöhung der *ZmAsa2*-Transkriptionswerte, sie sind am höchsten in der Übergangs- und Differenzierungszone (ÜBZ u. DIFFZ) der 3 cm langen Wurzel.

3.2.1.3 Analyse von Embryonal- und Kronwurzeln von *Z. mays*

Wiederum wurden zwei Entwicklungsstadien dieser drei Wurzeltypen untersucht, 1 und 3 cm. Exemplarisch sind in Abb. 11 die Ergebnisse für die 3 cm langen Wurzeln dargestellt.

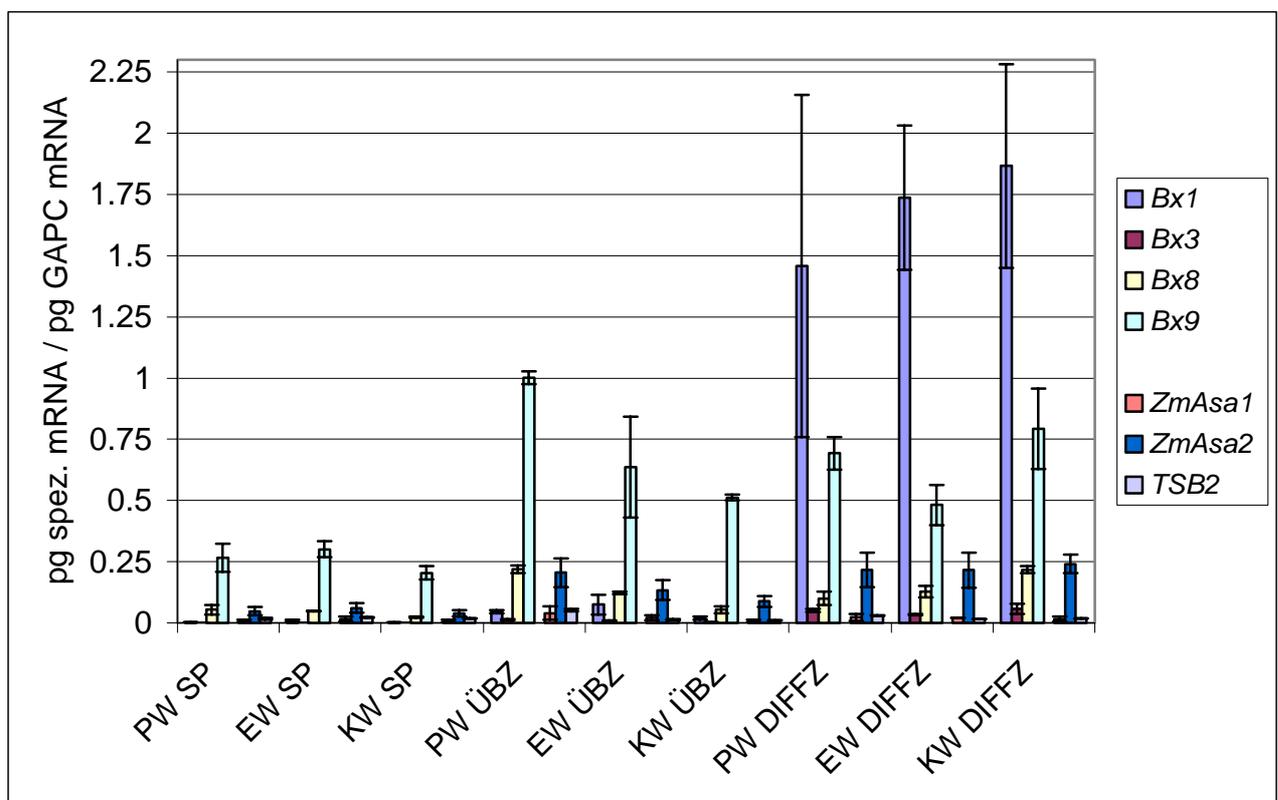


Abb. 11: Ergebnisse der Lightcycler-Analyse mit Primär-, Embryonal- und Kronwurzeln von 3 cm Länge. Die Daten wurden gegen GAPDHC normalisiert. DIFFZ: Differenzierungszone, EW: Embryonalwurzel; KW: Kronwurzel, PW: Primärwurzel, SP: Spitze, ÜBZ: Übergangszone. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Obwohl die drei Wurzeltypen unterschiedliche Entstehungsorte besitzen, stimmen die Expressionsmuster der verschiedenen Gene in den drei Wurzeltypen überein (Abb. 11). Konsistent für alle Wurzeltypen weist *Bx1* einen extrem hohen Wert in der Differenzierungszone auf. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die Transkriptmenge von *GAPDHC*. Von allen DIMBOA-Glucosid-Biosynthesegenen sind in der Wurzelspitze nur die Gene *Bx8* und *Bx9* nachweisbar.

3.2.1.4 Analyse der Mutante *lrt1*

Die Expressionsanalyse wurde zusätzlich mit der Mutante *lrt1* durchgeführt. Die Mutante kann weder in Primär- noch in Embryonalwurzeln Seitenwurzeln ausbilden (Hochholdinger und Feix, 1998). Durch histologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Seitenwurzelentwicklung bereits in einem sehr frühen Stadium gestört ist, da keine Seitenwurzelprimordien nachgewiesen werden konnten. Auch die Kronwurzelentwicklung am ersten Nodus des Sprosses ist in dieser Mutante gestört. Allerdings konnten hier noch undifferenzierte Primordien nachgewiesen werden und an höheren Nodi ist die Bildung der Kronwurzeln normal (Hochholdinger und Feix, 1998).

Die Mutante *lrt1* lag in Form von segregierenden Maiskörnern mehrerer Familien vor. Die Analyse erfolgte nach sieben Tagen Anzucht, die Wurzeln besitzen eine ungefähre Länge von 12 cm. Zu diesem Zeitpunkt sind die ausgebildeten Seitenwurzeln gut zu erkennen, so dass die *lrt1*-Mutanten von den Wildtypen getrennt werden konnten (vgl. Abb. 12). Die Wurzeln wurden wiederum in die drei Zonen aufgeteilt, der Spross wurde im Ganzen in die Analysen mit aufgenommen. Als Wildtyp-Kontrolle wurden die Keimlinge dieser Familie mit Seitenwurzeln (Wildtyp) verwendet, um die Analyse im gleichen genetischen Hintergrund durchzuführen.

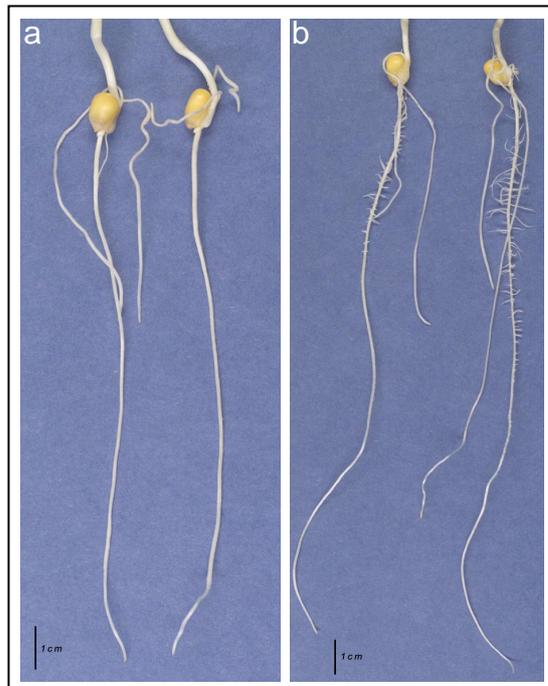


Abb. 12: Die seitenwurzellose Mutante *lrt1* (a), im Vergleich mit dem Wildtyp (b).

Generell sind die relativen Transkriptmengen aller *Bx*-Gene geringer als in der Maislinie LG22. Während in der Linie LG22 der Transkriptionswert von *Bx1* stets ca. 10-mal höher war als der von *Bx3*, ist der Wert in Wildtyp und Mutante nur ca. 2-mal höher. Die Expressionsmuster der restlichen untersuchten Gene sind wiederum mit den Mustern aus den vorherigen Analysen vergleichbar (Abb. 13). In keiner der untersuchten Proben unterscheidet sich das Expressionsmuster der Wildtyppflanzen von denen der Mutanten. Auch in der Differenzierungszone sind die Muster identisch. Die hohe Transkriptmenge von *Bx1* und *Bx3* in der Differenzierungszone kann also nicht auf die Bildung der Seitenwurzeln zurückgeführt werden. Im Spross sind die Transkriptmengen aller untersuchten Gene deutlich höher als in den unterschiedlichen Wurzelproben.

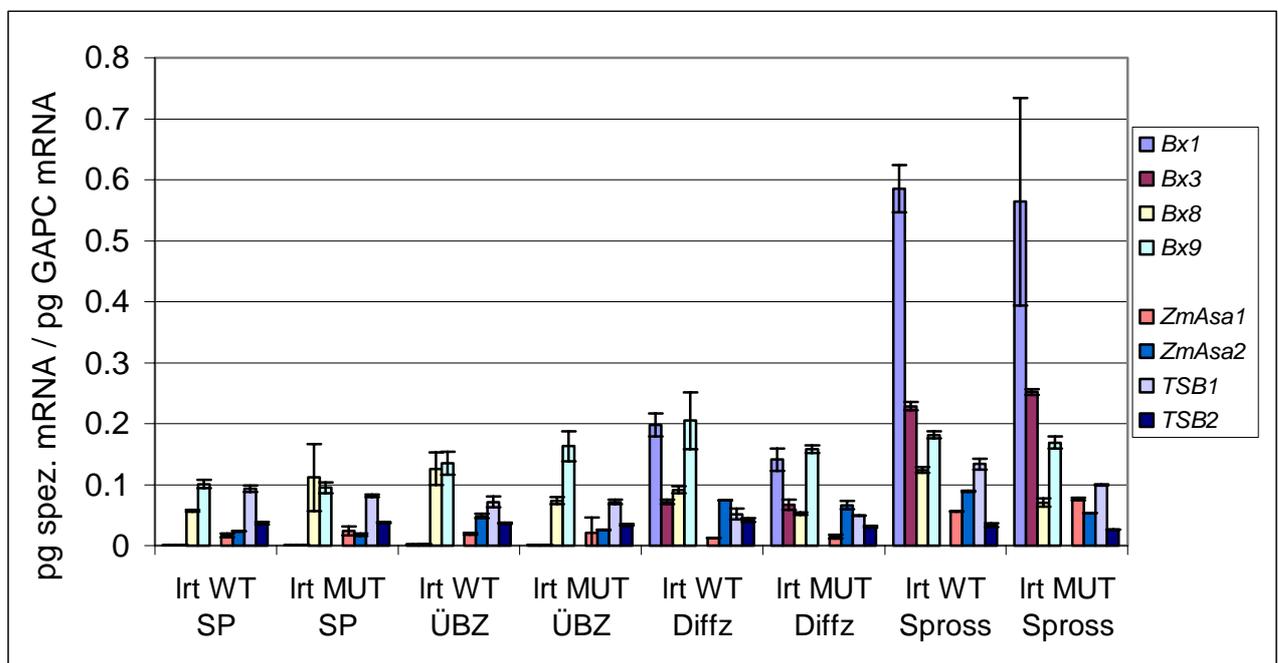


Abb. 13: Ergebnisse der Lightcycler-Analyse mit der Mutante *lrt1*. Die Daten wurden gegen GAPDHC normalisiert, es wurden Wurzeln von rund 12 cm Länge verwendet. Sp: Spitze, ÜBZ: Übergangszone, DIFFZ: Differenzierungszone, MUT: *lrt1*-Pflanzen, WT: Wildtyppflanzen im gleichen genetischen Hintergrund. Die Standardabweichungen sind angegeben.

3.2.2 *In situ*-Hybridisierungen

Neben der Bestimmung der Transkriptmenge wurde die Lokalisierung der mRNAs für die jeweiligen Gene untersucht. Als Pflanzenmaterial wurden ganze, 1-2 Tage alte Keimlinge und 1 cm lange Primärwurzeln verwendet. Auch mit der Differenzierungszone der 3 cm langen Wurzeln wurden *in situ*-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Allerdings war es in diesem Gewebe nicht möglich, die Transkripte zu lokalisieren, da auch die Negativsonden (*sense*) ein starkes unspezifisches Signal zeigten (Abb. 14).

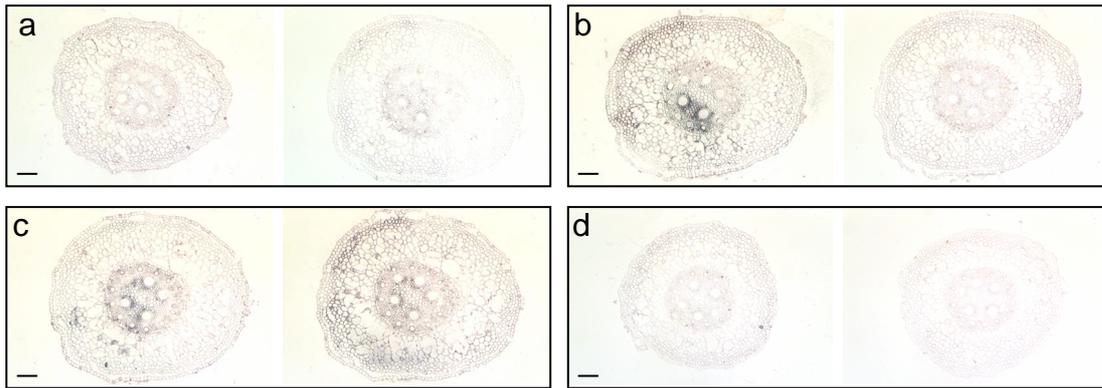


Abb. 14: *In situ*-Hybridisierungen an Wurzelquerschnitten der Differenzierungszone von 3 cm langen Primärwurzeln. **a:** *Bx1 antisense* und *sense* Sonde, **b:** *Bx3 antisense* und *sense* Sonde, **c:** *Bx9 antisense* und *sense* Sonde, **d:** *ZmAsa2 antisense* und *sense* Sonde. Zwischen *antisense* und *sense* Sonde sind keine Unterschiede zu erkennen, die vorhandenen Signale sind unspezifisch. Der Balken entspricht bei allen Wurzelquerschnitten 119 μm

3.2.2.1 Auswahl der Sonden

Für die ersten Hybridisierungsversuche wurden kurze, spezifische Bereiche als Sonden ausgewählt. Die Hybridisierung mit diesen Sonden war nicht sensitiv genug, so dass Sonden verwendet werden mussten, die an den gesamten Bereich der mRNA hybridisieren. Diese Sonden mussten nach der *in vitro* Transkription durch alkalische Hydrolyse in kleinere Stücke gespalten werden, um eine Hybridisierung im Pflanzengewebe gewährleisten zu können. Die Verwendung der langen Sonden führt zum Verlust der Spezifität, so dass zwischen den Transkripten von *ZmAsa1* und *ZmAsa2* bzw. *Bx8* und *Bx9* nicht mehr unterschieden werden kann. Für alle hier gezeigten *in situ*-Hybridisierungen wurden als Sonde die *antisense* RNA und als Negativkontrolle die entsprechende *sense* RNA verwendet. Es zeigte sich, dass es für die Negativkontrolle wichtig ist, einen vergleichbaren GC-Gehalt zu haben wie die eigentliche Sonde. Dies, sowie die Ausbildung eventuell vorhandener Sekundärstrukturen, ist mit der *sense* Sonde am besten gewährleistet. Die Bedingungen der *in situ*-Hybridisierung wurden so eingestellt, dass die *sense* Sonde kein Signal zeigte. Die Verwendung einer nicht-pflanzlichen Negativkontrolle in Form des transkribierten Plasmids pKS Blueskript erwies sich als untauglich.

Die Expressionsmuster von folgenden Genen wurden mit den *in situ*-Hybridisierungsexperimenten untersucht: *Bx1*, *Bx3*, *Bx9* und *ZmAsa2*. Für *TSB* wurden keine *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt, da die Lightcycler-Experimente zeigten, dass *TSB* sehr gering exprimiert ist und deswegen nicht mit einem Signal zu rechnen war.

3.2.2.2 Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungsexperimente

1-2 Tage alte Keimlinge zeigen deutliche Hybridisierungssignale mit den *antisense* Sonden von *Bx1*, *Bx3*, *Bx9* und *ZmAsa2* (Abb. 15). Die stärksten Signale finden sich jeweils im Spross. Die Transkripte von *Bx1*, *Bx3* und *ZmAsa2* sind vor allem in der Koleoptile und in den äußersten Blättern lokalisiert, während *Bx9* in allen Blättern vorkommt. Auch in den Embryonalwurzelprimordien sind *Bx1*, *Bx3* und *Bx9* gut nachweisbar. In den Primärwurzelspitzen ist nur für *Bx9* und *ZmAsa2* eine deutliche Hybridisierung zu erkennen. Die *Bx3-antisense* Sonde liefert, verglichen mit der *sense*-Sonde, ein sehr schwaches Signal, das an der Wurzelspitze in der Exodermis und im Prokambium lokalisiert ist (Abb. 15d, Pfeile). Dies steht in Einklang mit früheren *in situ*-Hybridisierungen mit *Bx3* (Frey *et al.*, 1995). Im Bereich des Mesokotyls scheint sich das Expressionsmuster zwischen den untersuchten Genen zu unterscheiden. Dies ist allerdings hauptsächlich auf die Änderung der Schnittebene innerhalb der seriellen Schnittabfolge und damit auf die Änderung der Strukturen des Gewebes zurückzuführen.

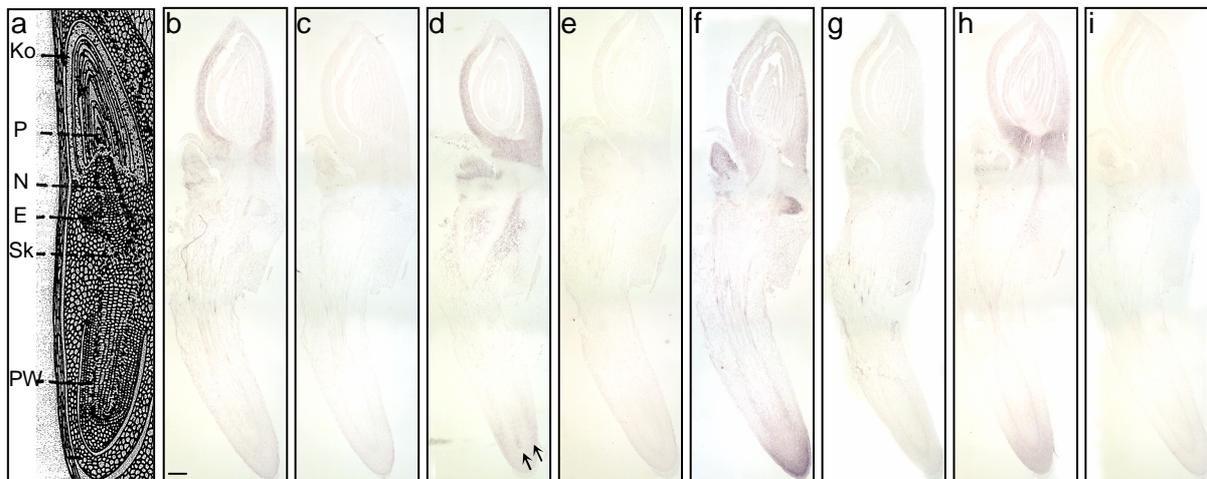


Abb. 15: *In situ*-Hybridisierungen an seriellen Längsschnitten von 1-2 Tage alten Keimlingen. **a:** Übersichtsbild (nach Kiesselbach, 1980), **b** und **c:** *Bx1 antisense* und *sense* Sonde; **d** und **e:** *Bx3 antisense* und *sense* Sonde, die Pfeile weisen auf das Signal von *Bx3* hin; **f** und **g:** *Bx9 antisense* und *sense* Sonde; **h** und **i:** *ZmAsa2 antisense* und *sense* Sonde. E: Embryonalwurzelprimordium, Ko: Koleoptile, Me: Mesokotyl, N: erster Nodus, P: Plumula, PW: Primärwurzel, Sk: Skutellarknoten. Der Balken in b entspricht einer Länge von 430 μm

Bei den *in situ*-Hybridisierungen an 1 cm langen Primärwurzeln (Abb. 16) konnten *Bx1* und *Bx3* nicht lokalisiert werden. Nur für *Bx9* und *ZmAsa2* war dies in der Wurzelspitze möglich. *Bx9* wird nicht in der Rhizodermis exprimiert. Die Expression in der Exodermis dagegen ist deutlich nachweisbar. In den Leitgefäßen kann kein *Bx9* lokalisiert werden. Ein ähnliches

Muster ergibt sich für *ZmAsa2*, mit dem Unterschied, dass die mRNA auch in der Rhizodermis nachweisbar ist.

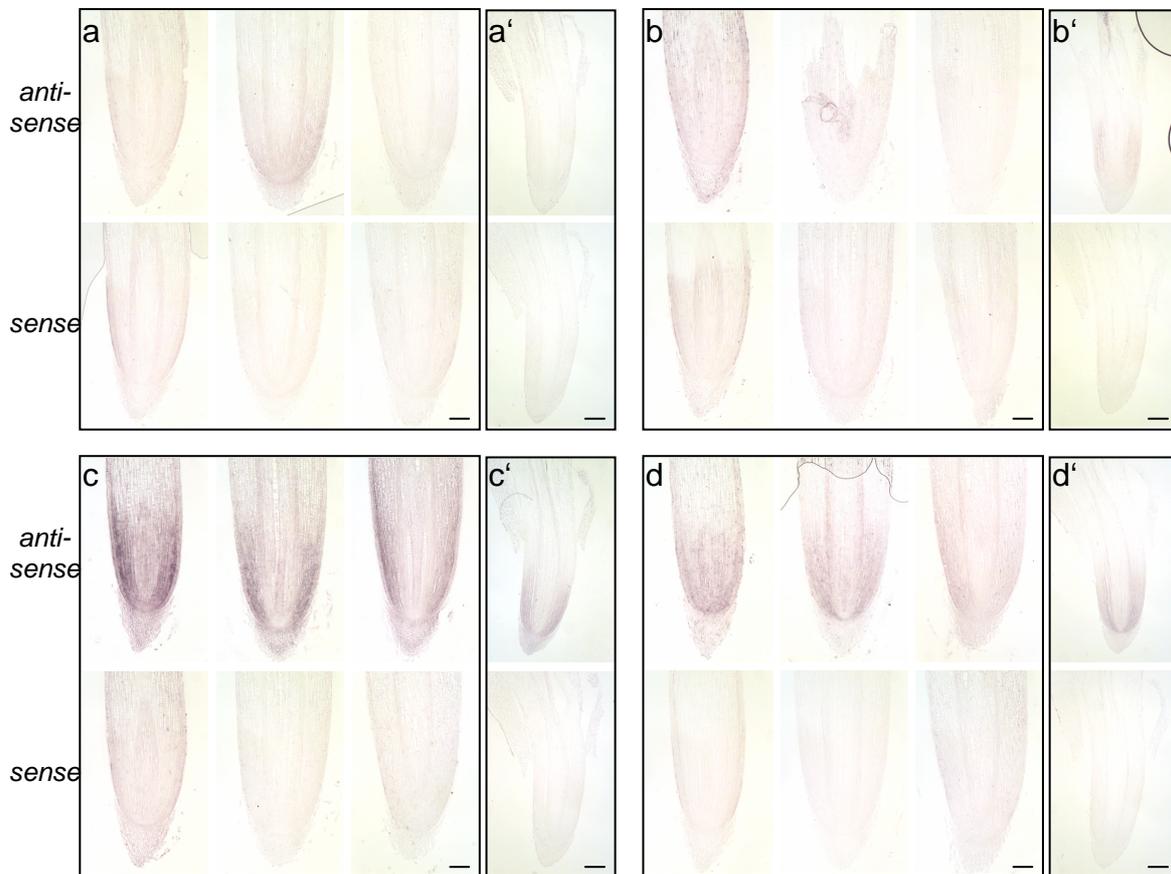


Abb. 16: *In situ*-Hybridisierungen an seriellen Längsschnitten von 1 cm langen Primärwurzeln. **a** und **a'**: *Bx1 antisense* und *sense* Sonde, **b** und **b'**: *Bx3 antisense* und *sense* Sonde, **c** und **c'**: *Bx9 antisense* und *sense*, **d** und **d'**: *ZmAsa2 antisense* und *sense* Sonde. Der Balken entspricht in a-d 170 μ m, in a'-d' 250 μ m.

Bei Wurzelquerschnitten (Primärwurzel, 1 cm, Abb. 17) sind die Transkripte von *Bx1* und *Bx3* wiederum nicht lokalisierbar. Wie schon bei den Längsschnitten hybridisiert *Bx9* in der Wurzelspitze am stärksten in der Exodermis der Wurzel. Ein schwächeres bzw. kein Signal findet sich in der Rhizodermis und in den Leitgefäßen der Wurzel (Abb. 17c II). Richtung Spross nimmt die Expression in der Exodermis ab (Abb. 17c III) und ist weiter oben in der Endodermis lokalisierbar (Abb. 17c IV). Die mRNA für die Anthranilatsynthase ist an der Wurzelspitze nicht auf bestimmte Zelltypen konzentriert, Richtung Spross ist auch dieses Transkript in der Endodermis lokalisiert (Abb. 17d III und IV).

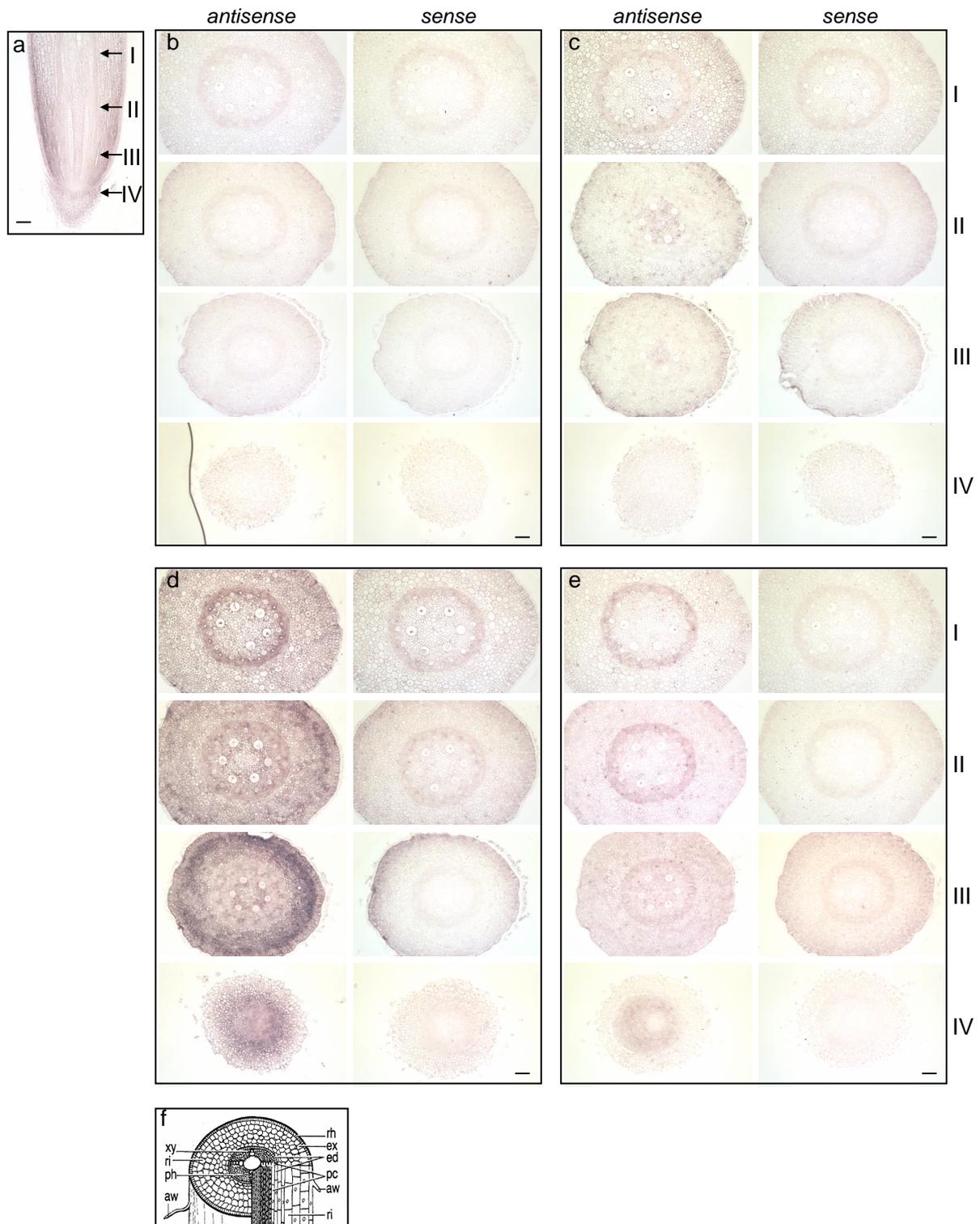


Abb. 17: *In situ*-Hybridisierungen an seriellen Querschnitten von 1 cm langen Primärwurzeln. **a:** Längsschnitt einer Primärwurzel, hybridisiert mit *Bx9*, Pfeile kennzeichnen die Schnittebenen I-IV der Querschnitte; **b:** *Bx1* antisense und sense Sonde, **c:** *Bx3* antisense und sense Sonde, **d:** *Bx9* antisense und sense Sonde, **e:** *ZmAsa2* antisense und sense Sonde, **f:** Schematischer Querschnitt einer Primärwurzel. aw: abgestorbene Wurzelhaare, ed: Endodermis, ex: Exodermis, pc: Pericambium, ph: Phloem, rh: Rhizodermis, ri: Rindenzellen, xy: Xylem. Der Balken in a entspricht 140 µm, in c-f 75 µm.

3.3 Experimente auf Protein-Ebene

Neben der Quantifizierung und Lokalisierung der Transkripte der jeweiligen Gene wurde auch die Verteilung der Proteine untersucht. Dazu wurden die Methoden der Westernanalyse und immunohistologische Untersuchungen benutzt. Die immunohistologische Lokalisierung der Proteine war nicht möglich. Deswegen wurden auf Proteinebene nur Westernanalysen durchgeführt, die im Gegensatz zu den Lightcycler-Analysen keine quantitativen Aussagen liefern.

3.3.1. Westernanalyse von Primärwurzeln

Als Pflanzenmaterial für diese Analysen wurden Primärwurzeln in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (1 cm, 3 cm und 12-15 cm) verwendet, wobei die längeren Primärwurzeln wiederum in die drei Zonen geteilt wurden. Es wurden je 30 µg Protein des Pflanzenextraktes und zur Kontrolle jeweils das heterolog exprimierte, gereinigte Protein aufgetragen. Zusätzlich zu den Proteinextrakten aus der Wurzelregion wurde der Proteinextrakt vom Spross eines drei Tage alten Maiskeimlings analysiert. Dieser Proteinextrakt diente als Kontrolle im Experiment, da von früheren Westernanalysen bekannt war, dass die Proteine BX1 und BX3 in der Wurzel kaum nachweisbar sind (v. Rad, 2000). Der Proteintransfer wurde mit Hilfe einer PonceauS-Färbung überprüft.

Die Größe der Kontrollproteine unterscheidet sich von der Größe der erhaltenen Signale (Abb. 18), da die Kontrollproteine BX3, BX8, ZmASA2 und TSB noch das His-Tag besitzen, mit dem die Proteine nach der heterologen Expression gereinigt wurden (siehe Material und Methoden). Das Signal für das BX1-Kontrollprotein ist kleiner als das in den Proteinextrakten, weil hier nur das Core-Protein heterolog exprimiert wurde (Stettner, 1998). Die Hybridisierung mit dem Antikörper gegen BX1 liefert bei den Extrakten aus dem Spross ein ca. 34 kD großes Signal. Bei den Wurzelextrakten ist das Protein nur in der Differenzierungszone der 3 und 12-15 cm langen Wurzeln nachweisbar. Diese Verteilung des Proteins entspricht dem Verteilungsmuster der RNA. BX3 ist bei den Proteinextrakten der Wurzel nicht nachweisbar, mit Extrakten des Sprosses liefert es ein schwaches Signal von 59 kD. Die Signalstärke in der Kontrollproteinspur lässt vermuten, dass der Antikörper für BX3 ähnlich sensitiv wie der für BX1 ist, d.h. in den Wurzelextrakten ist also tatsächlich kaum BX3-Protein enthalten. Die Glucosyltransferasen, die beide durch den Antikörper gegen BX8 erkannt werden, zeigen ein deutliches Signal von ca. 48 kD in allen untersuchten Proben. Ebenso gleichmäßig ist das ZmASA2 Protein in allen Extrakten vorhanden (66 kD). Für TSB ist in

der 1 cm langen Wurzel, in den Spitzen der 3 und 12-15 cm langen Wurzeln und im Spross ein etwas stärkeres Signal (48 kD) zu beobachten.

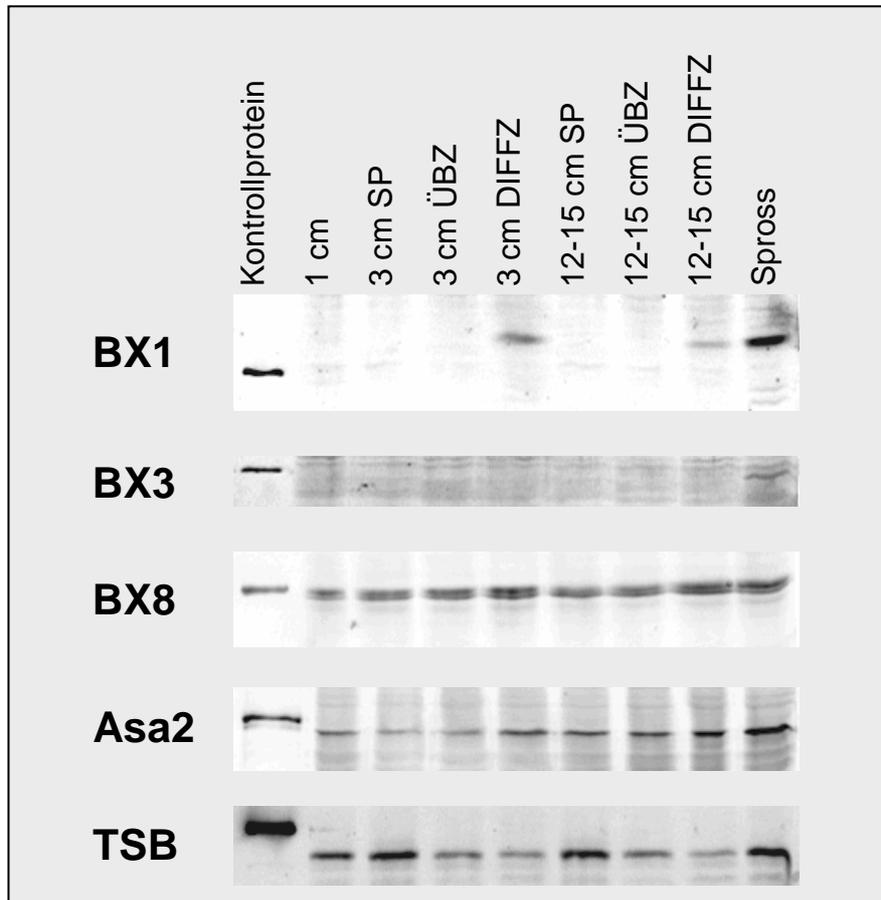


Abb. 18: Westernanalysen mit Proteinextrakten der Primärwurzel. In der jeweils ersten Spur sind Kontrollproteine aufgetragen (BX1: 48 ng, BX3: 25 ng; BX8: 150 ng, ZmASA2: 600 ng, TSB: 250 ng), pro Spur Pflanzenextrakt wurden 30 µg Protein aufgetragen. SP: Spitze, ÜBZ: Übergangzone, DIFFZ: Differenzierungszone.

3.3.2 Die Mutante *lrt1*

Auch mit der Mutante *lrt1* wurden Westernanalysen durchgeführt. Die Proteinextrakte der Mutante wurden mit Proteinextrakten der Wildtyppflanzen verglichen.

Wie bei der Quantifizierung der RNA unterscheiden sich Mutanten und Wildtyppflanzen nicht in den Mengen der untersuchten Proteine (Abb. 19). Das BX1-Protein konnte in den Wurzelextrakten nicht nachgewiesen werden, BX3 auch nicht im Sprossextrakt. BX8 und ZmASA2 sind wiederum in allen Proben gleichmäßig verteilt. TSB scheint in der Differenzierungszone geringer und in der Wurzelspitze in größerer Menge vorhanden zu sein.

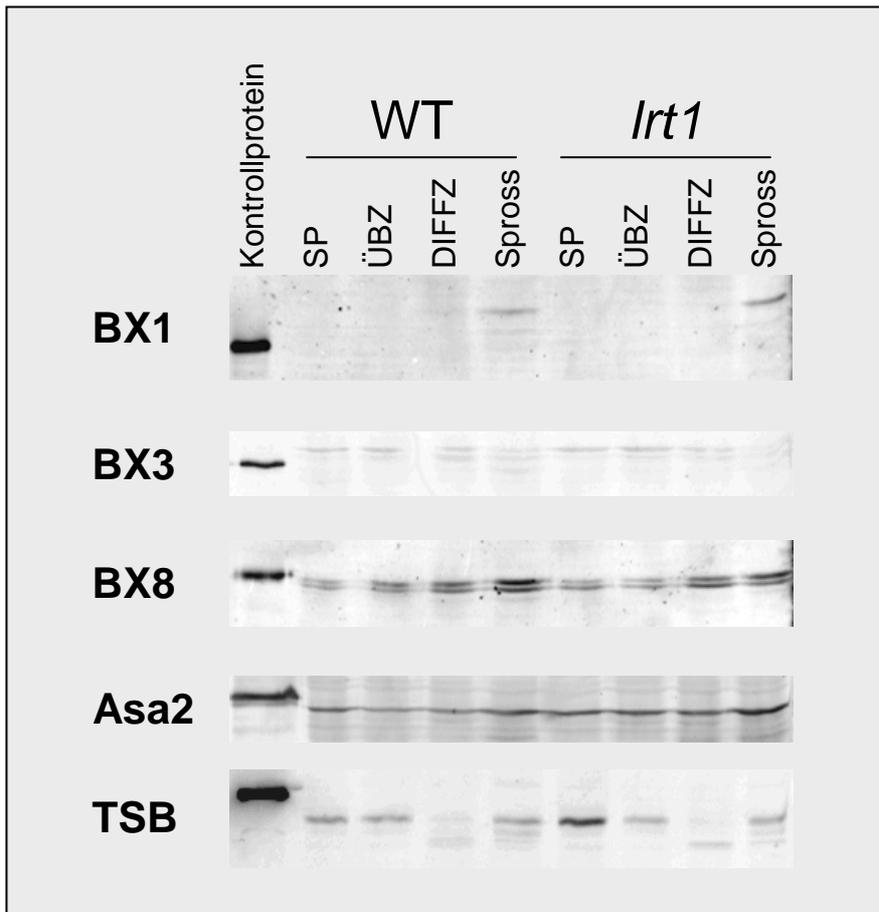


Abb. 19: Westernanalysen mit Proteinextrakten verschiedener Wurzelproben. In der jeweils ersten Spur sind Kontrollproteine aufgetragen (BX1: 48 ng, BX3: 25 ng; BX8: 150 ng, ZmASA2: 600 ng, TSB: 250 ng), pro Spur Proteinextrakt wurden 30 µg Protein aufgetragen. Mutanten und Wildtyp-pflanzen stammen aus einer segregierenden Population. SP: Spitze, ÜBZ: Übergangszone, DIFFZ: Differenzierungszone.

3.4 Experimente auf Endprodukt-Ebene

Neben den Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene wurde in dieser Arbeit auch die Menge von DIMBOA bestimmt und lokalisiert. Zur quantitativen Mengenbestimmung wurde DIMBOA isoliert und der Gehalt mit Hilfe einer HPLC-Analyse bestimmt. Zur Lokalisierung von DIMBOA im Gewebe wurde eine Benzoxazinonfärbung verwendet (Iwamura *et al.*, 1996). Als Pflanzenmaterial dienten wie bei den Experimenten auf Proteinebene die Primärwurzeln in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

3.4.1 DIMBOA-Isolation und HPLC-Analyse

DIMBOA wurde, wie in 2.5.2 beschrieben, nach Bailey und Larson (1991) und nach Glawischnig (1997) isoliert. Das isolierte DIMBOA wurde mit Hilfe der HPLC von anderen

isolierten Stoffen getrennt (siehe Material und Methoden). Die Mengenbestimmung erfolgte durch den Vergleich der Fläche des DIMBOA-Peaks mit einer erstellten Eichkurve.

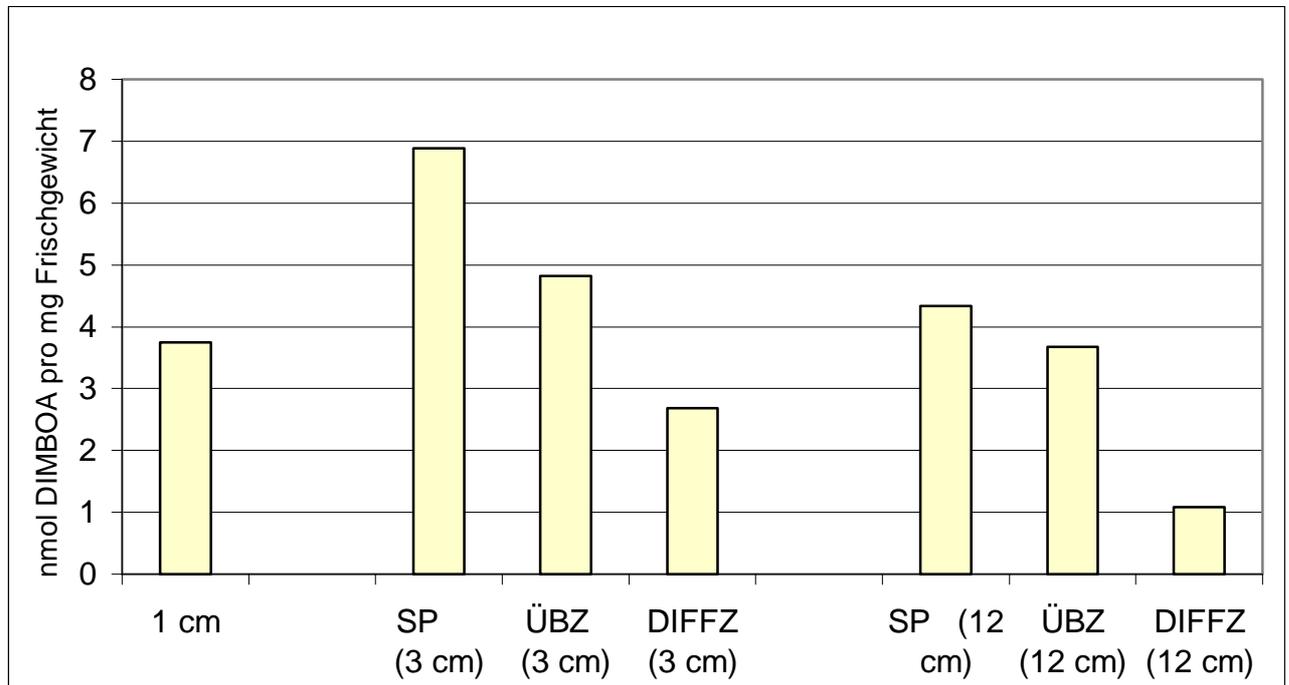


Abb. 20: DIMBOA-Gehalt in der Primärwurzel von *Z. mays*. Längere Wurzeln wurden in drei Zonen unterteilt. Sp: Spitze, ÜBZ: Übergangszone, DIFFZ: Differenzierungszone.

Die relativ höchste Konzentration von DIMBOA ist in Wurzelspitze der 3 cm langen Primärwurzel vorhanden (Abb. 20). Die Konzentration nimmt von der Wurzelspitze über die Übergangszone zur restlichen Differenzierungszone kontinuierlich ab. Dies ist unabhängig vom Alter der Wurzeln.

3.4.2 Benzoxazinon-Färbung

Zur Lokalisierung von DIMBOA im Gewebe wurde die Benzoxazinonfärbung nach Iwamura *et al.* (1996) verwendet. Hierbei bildet sich zwischen dem Eisenchlorid in der Färbelösung und den vorhandenen Benzoxazinonen (bei Mais sind die vorherrschenden Benzoxazinone DIMBOA und DIBOA) ein violetter Komplex. Bei der 3 cm langen Wurzel ist die höchste DIMBOA-Konzentration in der Wurzelspitze lokalisiert (Abb. 21). Dies bestätigt die quantitativen Experimente der DIMBOA-Isolierung. Bei der 1 cm langen Wurzel ist in ungeschnittenem Zustand keine Färbung zu erkennen. An Längs- bzw. Querschnitten der Wurzelspitze 3 cm langen Wurzel und der ganzen 1 cm langen Wurzel (Abb. 21) erkennt man, dass DIMBOA an der Spitze in der Exodermis lokalisiert ist. Ob DIMBOA auch in der Rhizodermis vorhanden ist, konnte bei dieser Auflösung nicht bestimmt werden. Am oberen

Ende der Wurzelspitze wird DIMBOA mit Ausnahme der Leitgefäße im gesamten Bereich gefunden.

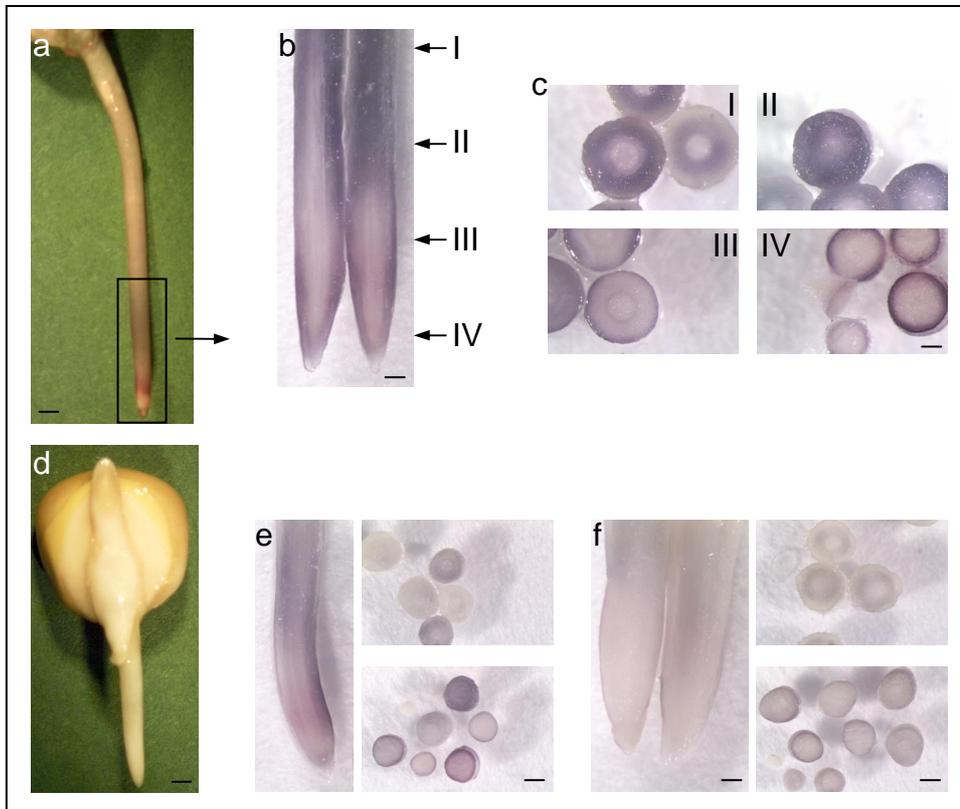


Abb. 21: **a-c:** DIMBOA-Färbung an 3 cm langen Primärwurzeln. **a:** Färbung einer ungeschnittenen Wurzel, **b:** Längsschnitt der Wurzelspitze einer 3 cm langen Wurzel, die Pfeile kennzeichnen die Schnittebenen für die Querschnitte, **c:** Querschnitte; **d-f:** DIMBOA-Färbung an 1 cm langen Primärwurzeln. **d:** DIMBOA-Färbung einer ungeschnittenen Wurzel, es ist keine Färbung zu erkennen, **e** und **f:** Längs- und Querschnitte von 1 cm langen Primärwurzeln. Der Balken entspricht in a und d einer Länge von 1 mm, in b 0,4 mm, in c 0,25 mm, in e 0,5 mm, in f bei den Längsschnitten 0,3 mm, bei den Querschnitten 0,5 mm.

Auch mit der *lrt1* Mutante wurde die DIMBOA-Färbung durchgeführt. Mutante und Wildtyp unterscheiden sich in ihrem Färbungsmuster in Wurzelspitze und Übergangszone nicht (Abb. 22a-d). In der Differenzierungszone (Abb. 22e-h) sieht man bei der Wildtypwurzel im Gegensatz zur Mutante die Bildung der Seitenwurzeln. Dort, wo die Seitenwurzeln aus den Primärwurzeln wachsen, ist eine deutliche DIMBOA-Färbung am basalen Ende der Wurzeln zu erkennen (Abb. 22f). Bei längeren Seitenwurzeln (Abb. 22h) lokalisiert DIMBOA in der Wurzelspitze.

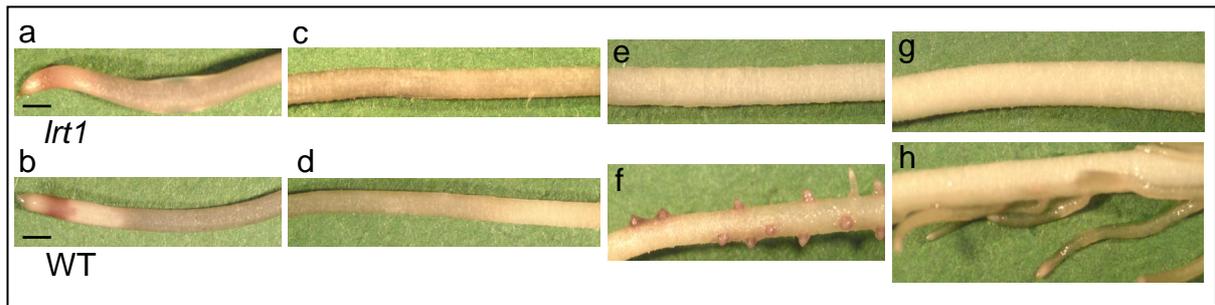


Abb. 22: DIMBOA-Färbung in der segregierenden Population der Mutante *lrt1*. Oben Mutante, unten die Wildtyp. **a** und **b**: Wurzelspitze, mit Übergangzone, **c-h** untere, mittlere und obere Differenzierungszone.

4. Diskussion

4.1 Die α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen *ZmAsa1* und *ZmAsa2*

4.1.1 Genstruktur von *ZmAsa1* und *ZmAsa2*

Die Gene *ZmAsa1* und *ZmAsa2* haben eine ähnliche Struktur. *ZmAsa1* besitzt 10 Introns, *ZmAsa2* wahrscheinlich nur 9 (Abb. 7). Die Intronsequenzen selbst sind nicht konserviert. Die Größe der Introns beträgt bei *ZmAsa1* 93-1011 bp, bei *ZmAsa2* 82-1052 bp. Hoch konserviert sind die Splice-sites von Introns. Bei 99 % aller bis 1996 bekannten Introns monokotyler Pflanzen sind die ersten beiden Nukleotide G und T, die letzten beiden A und G (Simpson und Filipowicz, 1996). Alle Introns von *ZmAsa1* und *ZmAsa2* besitzen diesen Konsensus. Auch die an die GT-Nukleotide angrenzende Sequenz beeinflusst die Effizienz der Prozessierung der RNA. Die Sequenz AG↓GTAAGT an der 5'-Splice-site ist komplementär zur Erkennungssequenz einer Untereinheit des Splicosomes (Simpson und Filipowicz, 1996). Je besser die Übereinstimmung mit dieser Sequenz ist, desto effizienter werden die Introns aus der RNA entfernt. Kein Intron aus *ZmAsa1* und *ZmAsa2* besitzt eine 100%ige Übereinstimmung mit dieser Konsensussequenz (Tabelle 8). Die Effizienz des Splicens wird auch durch den A/T-Gehalt der Introns beeinflusst. Ein hoher A/T-Gehalt ist zwar nicht zwingend notwendig, verbessert aber die Effizienz (Luehrson und Walbot, 1994). Bei beiden Genen liegt der A/T-Gehalt in den meisten Introns mit 57-76 % über dem der codierenden Sequenzen mit 48,8 % für *ZmAsa1* und 46,6 % für *ZmAsa2* (Tabelle 8). Nur die ersten beiden putativen Introns von *ZmAsa1* haben einen niedrigeren A/T-Gehalt als die entsprechende cDNA.

Tabelle 8: Konsensussequenz der 5'-Splice-sites im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz in Intron 1-10 von *ZmAsa1* und 1-8 von *ZmAsa2* und A/T-Gehalt der entsprechenden Introns. Veränderte Nukleotide sind fett gedruckt.

	<i>ZmAsa1</i>		<i>ZmAsa2</i>	
Konsensus	AGGTAAGT	A/T-Gehalt	AGGTAAGT	A/T-Gehalt
Intron 1	CGGTG AGT	38,7 %	TCGTAC GT	47,3 %
Intron 2	TGGTG AGT	42,0 %	CGGTG AGC	57,6 %
Intron 3	TGGTAC AG	64,4 %	AGG TACTA	65,1 %
Intron 4	AGGTAT G C	71,7 %	GTG TAAGC	64,2 %
Intron 5	GTGTG AGT	66,6 %	AGGTAT AG	65,6 %
Intron 6	AGGT G ACT	71,7 %	AGGTAT AT	75,9 %
Intron 7	AGGTAT AG	73,6 %	AGGT CT GT	63,7 %
Intron 8	AGGT TC AT	70,2 %	CGGT TAGG	64,2 %
Intron 9	CAGTG AGT	75,4 %		
Intron 10	AGGTAA CT	64,3 %		

4.1.2 Vergleich verschiedener α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen

Aus mehreren Pflanzen wurden die Gene der α -Untereinheiten von Anthranilatsynthasen (ASAs) kloniert. Aus *Ruta graveolens* (*AS α 1* und 2), *Arabidopsis thaliana* (*ASA1* und 2) und *Oryza sativa* (*OASA1* und 2) wurden je zwei nicht-allelische Kopien für die α -Untereinheiten der Anthranilatsynthasen isoliert (Bohlmann *et al.*, 1995, Niyogi und Fink, 1992, Tozawa *et al.*, 2001). In Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde bis jetzt nur ein ASA-Gen isoliert, es gibt aber Hinweise auf mehrere nicht-allelische Kopien (*ASA2*, Song *et al.*, 1998). Auch in Mais liegen mit *ZmAsa1* und *ZmAsa2* zwei ASA-Gene vor. In den öffentlichen EST-Datenbanken wurden Sequenzinformationen für zwei nicht-allelische Kopien der ASAs gefunden, sowohl aus der cDNA-Bank wie auch aus der genomischen Bank wurden zwei Kopien isoliert. Dies spricht dafür, dass mit den zwei Genen *ZmAsa1* und *ZmAsa2* alle in Mais vorhandenen ASA-Gene isoliert wurden. Die Expression aller ASAs ist auf einem sehr geringen Level konstitutiv, bzw. auf bestimmte Pflanzenteile beschränkt. Jeweils eine der nicht-allelischen Kopien der ASAs kann durch Verwundung oder durch Stoffe, die die Pathogenabwehr auslösen, induziert werden. Je einem ASA-Gen kann hier also eine Aufgabe im Sekundärstoffwechsel zugeordnet werden (Bohlmann *et al.*, 1995, Niyogi und Fink, 1992, Tozawa *et al.*, 2001). Auch in Mais könnte diese Aufgabenverteilung bestehen. Während die Transkriptmenge von *ZmAsa1* in allen untersuchten Geweben vergleichbar war, war die Expression von *ZmAsa2* in der Übergangszone der 3 cm langen Wurzeln und in der Differenzierungszone der 3 und 12-15 cm langen Wurzeln höher als in den übrigen untersuchten Wurzelproben. In den Differenzierungszonen wurde auch die höchste Transkriptmenge für die DIMBOA-Biosynthesegene *Bx1* und *Bx3* gefunden (Abb. 10 und 11). Möglicherweise stellt *ZmASA2* also Vorstufen für den Sekundärmetabolismus bereit.

Bei einem Vergleich der kompletten Proteinsequenzen der pflanzlichen ASAs, und der Sequenzen aus *Saccharomyces cerevisiae* (TRP2) und *E. coli* (TRPE) spiegelt sich die enge Verwandtschaft zwischen den beiden monokotylen Pflanzen Reis und Mais wider (Abb. 23). Die ASAs dieser Pflanzen heben sich deutlich von denen der dikotylen Pflanzen und den Sequenzen von Hefe und *E. coli* ab. Dabei bilden *ZmASA1* und *OASA1*, ebenso wie *ZmASA2* und *OASA2* getrennte Zweige (Abb. 23b). Bei den dikotylen Pflanzen könnten *AS α 1* aus *R. graveolens* und *ASA1* aus *A. thaliana* sowie *AS α 2* und *ASA2* jeweils einen gemeinsamen Vorfahren besitzen (Abb. 23b). Interessanterweise bilden hier mit *AS α 1* und *ASA1* die induzierbaren Formen der ASAs eine Gruppe, hingegen sind *AS α 2* und *ASA2*

konstitutiv auf einem geringen Level exprimiert, ihnen wird eine Aufgabe in der Tryptophanbiosynthese zugeschrieben (Bohlmann *et al.*, 1995, Niyogi and Fink, 1992).

a

1	- - - - -	M A T A	S L A L S	- - - - -	L R L A P S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Zm
1	- - - - -	- - - - -	M E S L A A T	S V F A P S	S R V A V P	- - - - -	A A R A L V R A	- - - - -	Asa2Zm
1	- - - - -	- - - - -	M A S L V L S	- - - - -	L R I A R S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Os
1	- - - - -	- - - - -	M E S I A A A	A - T F T P S	R L A A R P A T P A A A A A P V R A	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Os
1	- - M S A A A T S	M Q S L K F S	- - - - -	- N R L V P	P - S R R L S P V P N N V T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Rg
1	- - M I T L N V E T	P P L T R S	Q L P S T F	R V S S A A S V N F N D R V A T S R	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Rg
1	M S S S M N V A T	M Q A L T F S	- - - - -	- R R L L P	- - - - -	- - - - -	- S V A	- - - - -	ASA1At
1	- - - - -	- M S A V S I S	A V K S D F	F T V E A I A V T H H R T P H P P H	- - - - -	- - - - -	- A T H	- - - - -	ASA2At
1	- - - - -	- M Q S L P I S	- - - - -	- Y R L F P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Nt
1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TRP2Hefe
1	- - - - -	- M Q T Q K P T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TrpEColi
16	S R P L S L R	- - - - -	R R G A A G V T	C R A T	- - - - -	T - - - -	A T F H	- - - - -	Asa1Zm
27	G T V V P T R R T	S S R S G T	S G V K C S A A	- - - - -	V T P Q	A S P V I S R	- - - - -	- - - - -	Asa2Zm
14	T P P L G L G G	G R F R G R R	G A V A C R A	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A T F Q	- - - - -	Asa1Os
31	R A A V A A G G	R R R T S R R	G G V R C S A G	- - - - -	- - - - -	K - P E	A S A V I N	- - - - -	Asa2Os
33	C N N L P K S A	A P V R T V K C C A S	S W N S	- - - - -	- - - - -	T I N G A A A	A T T N G	- - - - -	Asa1Rg
39	W R P N S L S L	T T S S Y R	L R T L K C A A S	- - - - -	- - - - -	A S T S	A S T S A S	- - - - -	Asa2Rg
25	S R Y L S S S S	S V T V T G Y S	G R S S A Y A P	- - - - -	- - - - -	S F R S I K C V S	- - - - -	- - - - -	ASA1At
32	F P S L R F P L S	L K S P P A T S L N L V A G S	K L L H F S R R L P S	I K C S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA2At
16	R K V L P	- - - - -	F A V I S R S S T S A L A L	- - - - -	- - - - -	R V R T L Q C R C	- - - - -	- - - - -	Asa2Nt
1	- - - - -	- - - - -	- M T A S I K I Q P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TRP2Hefe
8	L E L L T C E G A Y R D N P T	A L F H Q L C G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TrpEColi
40	- - - - -	- Q L D A V A V R E	- E E S R F R T A A A E G R	- - - - -	- N L L P L T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Zm
61	- - - - -	- S A A A A K A A V E E	- D K R R F F E A A A R G S G K G N L V P M W	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Zm
41	- - - - -	- Q L D A V A V R E	- E E S K F K A G A A E G C	- - - - -	- N I L P L K	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Os
63	- - - - -	- G S A A A R A A E E	- D R R R F F E A A E R G S G K G N L V P M W	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Os
67	A S A A S N G A S T T T T T Y V S	- D A T R F I D S S K R A	- - - - -	- N L V P L Y	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Rg
72	- - - - -	- P S P S P S L V D	- Q S A N F H E A S K K G	- - - - -	- N L I P L Y	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Rg
57	- - - - -	- V S P E A S I V S	- D T K K L A D A S K S T	- - - - -	- N L I P I Y	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA1At
71	- - - - -	- Y T P S L D L S E	E Q F T K F K K A S E K G	- - - - -	- N L V P L F	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA2At
45	- - - - -	- L H S S S L V M	- D E D R F I E A S K S G	- - - - -	- N L I P L H	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Nt
10	- - - - -	- - - - -	- D I D S - L K Q L Q Q Q N D D S S	- - - - -	- I N M Y P V Y	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TRP2Hefe
31	- - - - -	- - - - -	- D R P A T L L L E S A D I D S K D D L K	- - - - -	- S L L L V D	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TrpEColi
68	R C I F S D H L T P V L A Y R C L V K E D E R E	- A P S F L F E S V E Q G S E G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Zm
93	E C I V S D H L T P V L A Y R C L V P E D N V D	- A P S F L F E S V E Q G P Q G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Zm
68	R C I F S D H L T P V L A Y R C L V R E D D R E	- A P S F L F E S V E Q G S E G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Os
95	E C I V S D H L T P V L A Y R C L V P E D N M E	- T P S F L F E S V E Q G P E G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Os
102	R C I F A D H L T P V L A Y R C L V Q E D D K E	- T P S F L F E S V E P G - R I	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Rg
99	R C I F S D H L T P V L A Y R C L V K E D D R D	- A P S F L F E S V E P G S Q A	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Rg
84	R C I F S D Q L T P V L A Y R C L V K E D D R E	- A P S F L F E S V E P G S Q M	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA1At
99	R C V F S D H L T P I L A Y R C L V K E D D R D	- A P S F L F E S V E P G S Q S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA2At
71	K T I F S D H L T P V L A Y R C L V K E D D R E	- A P S F L F E S V E P G F R G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Nt
33	A Y L P S L D L T P H V A Y L K L A Q L N N P D R K E S F L L E S A K T N	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TRP2Hefe
57	S A L R I T A L G D T V T I Q A L S	- - G N G E A L L A L L D N A L P A G V E S	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TrpEColi
107	- T N V G R Y S V V G A Q P A M E V V A K A N H V T V M D H E M K S R R E H F V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Zm
132	T T N V G R Y S M V G A H P V M E I V A K D H K V T I M D H E K S Q V T E Q V V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Zm
107	- T N V G R Y S V V G A Q P A M E I V A K A N H V T V M D H K M K S R R E Q F A	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Os
134	T T N V G R Y S M V G A H P V M E V V A K E H K V T I M D H E K G K V T E Q V V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Os
140	- S T V G R Y S V V G A H P V M E V I A K D N M V T V M D H E K G S L V E E V V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Rg
138	- S S I G R Y S V V G A Q P A I E I V A K E N M V T I L D H E G Q R T E Q F V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Rg
123	- S S V G R Y S V V G A Q P A M E I V A K E N K V I V M D H N N E T M E E F V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA1At
138	- S N I G R Y S V V G A Q P T I E I V A K G N V V T V M D H G A S L R T E E E V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA2At
110	- S S V G R Y S V V G A Q P S M E I V A K E H N V T I L D H H T G K L T Q K T V	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Nt
70	- N E L D R Y S F I G I S P R K T I K T G	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TRP2Hefe
95	- E Q S P N C R V L R F P P V S P L L D E D A R	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TrpEColi
146	P D P M R I P R T I M E Q W N P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Zm
172	D D P M Q I P R T M M E G W H P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Zm
146	P D P M K I P R S I M E Q W N P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Os
174	D D P M Q I P R S M M E G W H P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Os
179	D D P M E I P R R I S E D W K P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa1Rg
177	E D P M D V P R R I M E G W K P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Rg
162	E D P M E I P R K I S E K W N P	D P Q L V Q D L P D A F C G G W V G F F S Y D T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA1At
177	D D P M M V P Q K I M E E W N P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	ASA2At
149	Q D P M T I P R S I S E G W K P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Asa2Nt
96	T D P L E I L E K E M S T F K V A	- E N V P G L P - K L S G G A I G Y I S Y D C	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TRP2Hefe
124	F D A F R L L Q N L L N V P K E	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	TrpEColi

Diskussion

184	V R Y V E T K K L P F S K A P H D D R N L P D I H L G L Y S D V I V F D H V E K	Asa1Zm
210	V R Y V E K K K L P F S S A P Q D D R N L P D V H L G L Y D D V L V F D N V E K	Asa2Zm
184	V R Y V E T K K L P F S N A P E D D R N L P D I H L G L Y N D I V V F D H V E K	Asa1Os
212	V R Y V E K K K L P F S G A P Q D D R N L P D V H L G L Y D D V L V F D N V E K	Asa2Os
217	V R Y V E K K K L P F S K A P Q D D R N L A D M H L G L Y N D V I V F D H V E K	Asa1Rg
215	V R Y V E K K K L P F S A P T D D R N L P D V H L G L Y D D V I V F D H V E K	Asa2Rg
202	V R Y V E K R K L P F S K A P E D D R N L P D M H L G L Y D D V V V F D H V E K	ASA1At
215	V R Y V E K K K L P F S N A P E D D R S L P D V N L G L Y D D V I V F D H V E K	ASA2At
187	V R Y V E N R K L P F L R A P E D D R N L A D I Q L G L Y E D V I V F D H V E K	Asa2Nt
134	V R Y F E P K T R - - - R P L K D V L R L P E A Y L M L C D T I I A P D N V F Q	TRP2Hefe
155	V A G F E D - - L P - - Q L S A E N - N C P D F C F Y L A E T L M V I D H Q K K	TrpEColi
224	K T H V I H W V R T D C Y R S V D E A Y E D G R N R L E A L L S R L H C L N V P	Asa1Zm
250	K V Y V I H W V N V D R H A S V E E A Y Q D G R S R L N M L L S K V H N S N V P	Asa2Zm
224	K T H V I H W V R V D C H E S V D E A Y E D G K N Q L E A L L S R L H S V N V P	Asa1Os
252	K V Y V I H W V N L D R H A T T E D A F Q D G K S R L N L L S K V H N S N V P	Asa2Os
257	K V Y V I H W V R L N Q Q S S E E K A Y A E G L E H L E R L V S R V Q D E N T P	Asa1Rg
255	K A F V I H W V R L D Q Y S S V A E A Y N D G M N R L E N L V S R V H D I V P P	Asa2Rg
242	K A Y V I H W I R L D G S L P Y E K A Y S N G M Q H L E N L V A K L H D I E P P	ASA1At
255	K A Y V I H W V R I D K D R S V E E N F R E G M N R L E S L T S R I Q D Q K P P	ASA2At
227	K A H V I H W V Q L D Q Y S S L P E A Y L D G K K R L E I L V S R V Q G I E S P	Asa2Nt
171	R F Q I I H N I N T N - E T S L E E G Y Q A A A Q I I T D I V S K L T D D S S P	TRP2Hefe
190	S T - - - - R I Q A S L F A P N E E E K Q R L T A R L N E L R Q Q L T E A A P P	TrpEColi
264	T L S S G S I K L N V E N F G P V M Q S T M S S E E Y K N I V V Q A K E H I L	Asa1Zm
290	T L S P G F V K L H T R K F G T P L N K S T M T S D E Y K N A V L Q A K E H I M	Asa2Zm
264	T L T A G S V K L N V G Q P F G S A L Q K S S M S R E D Y K K A V V Q A K E H I L	Asa1Os
292	K L S P G F V K L H T R Q F G T P L N K S T M T S D E Y K N A V M Q A K E H I M	Asa2Os
297	R L A P G S I D L H T G H F G P P L K K S N M T C E E Y K M A V L A A K E H I Q	Asa1Rg
295	K L R S G S I K L H T R H F G P K L E R S S M T S E A Y K E A V L E A K E H I L	Asa2Rg
282	K L A A G N V N L Q T R Q F G P S L D N S N V T C E E Y K E A V V K A K E H I L	ASA1At
295	K M P T G F I K L R T Q L F G P K L E K S T M T S E A Y K E A V V E A K E H I A	ASA2At
267	R L S P G S V D F C T H A F G P S L T K G N M T S E E Y K N A V L Q A K E H I L	Asa2Nt
210	I P Y P E Q P P I K L N Q T - - - F E S N V G K E G Y E N H V S T L K K H I K	TRP2Hefe
226	- L P - - - - V V S V P H M R - - - C E C N Q S D E E F G G V V R L L Q K A I R	TrpEColi
304	A G D I F Q V V L S Q R F E R R T F A D P F E I Y R A L R I V N P S P Y M A Y L	Asa1Zm
330	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T Y A N P F E V Y R A L R I V N P S P Y M A Y V	Asa2Zm
304	A G D I F Q V V L S Q R F E R R T F A D P F E V Y R A L R I V N P S P Y M A Y L	Asa1Os
332	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T Y A N P F E V Y R A L R I V N P S P Y M A Y V	Asa2Os
337	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T F A D P F E V Y R A L R V N P S P Y M T Y M	Asa1Rg
335	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T F A D P F E I Y R S L R I V N P S P Y M T Y L	Asa2Rg
322	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T F A D P F E V Y R A L R V N P S P Y M G Y L	ASA1At
335	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T F A D P F E I Y R A L R I V N P S P Y M A Y L	ASA2At
307	A G D I F Q I V L S Q R F E R R T F A D P F E V Y R A L R I V N P S P Y M T Y I	Asa2Nt
246	K G D I I Q G V P S Q R V A R P T S L H P P N I Y R H L R T V N P S P Y L F Y I	TRP2Hefe
258	A G E I F Q V V P S R R F S - L P C P S P L A A Y Y V L K K S N P S P Y M F F M	TrpEColi
344	Q A R G C I L V A S S P E - I L T R V - Q K R T I I N R P L A G T I R R G K T K	Asa1Zm
370	Q A R G C V L V A S S P E - I L T R V - S K G K I I N R P L A G T V R R G K T E	Asa2Zm
344	Q A R G C I L V A S S P E - I L T R V - E K R T I V N R P L A G T I R R G K S K	Asa1Os
372	Q A R G C V L V A S S P E - I L T R V - R K G K I I N R P L A G T V R R G K T E	Asa2Os
377	Q A R G C V L V A S S P E - I L T R V - K K N K I V N R P L A G T A R R G R T T	Asa1Rg
375	Q A R G C I L V A S S P E - I L T R V - K K R K I T N R P L A G T I R R G K T R	Asa2Rg
362	Q A R G C I L V A S S P E - I L T K V - K Q N K I V N R P L A G T S K R G K N E	ASA1At
375	Q V R G C I L V A S S P E - I L L R S - K N R K I T N R P L A G T V R R G K T P	ASA2At
347	Q A R G C I L V A S S P E - I L T R V - K K R R I V N R P L A G T S R R G K T P	Asa2Nt
286	D C L D F Q I I G A S P E - L L C K S D S K N R V I T H P I A G T V K R G A T T	TRP2Hefe
297	Q D N D F T L F G A S P E S S L K Y D A T S R Q I E I Y P I A G T R P R G R R A	TrpEColi
382	A E - - - - - D K T L E Q L L L S D E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	Asa1Zm
408	K E - - - - - D Q M Q E Q Q L L S D E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	Asa2Zm
382	A E - - - - - D K V L E Q L L L S D G K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	Asa1Os
410	K E - - - - - D E M Q E Q Q L L S D E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	Asa2Os
415	E E - - - - - D E M L E T Q L L K D A K Q C A E H V M L V D L G R N D V G K V	Asa1Rg
413	K E - - - - - D L V F E K E L L N D E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	Asa2Rg
400	V E - - - - - D K R L E K E L L E N E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	ASA1At
413	K E - - - - - D L M L E K E L L S D E K Q C A E H I M L V D L G R N D V G K V	ASA2At
385	D E - - - - - D V M L E M Q M L K D E K Q R A E H I M L V D L G R N D V G K V	Asa2Nt
325	E E - - - - - D D A L A D Q L R G S L K D R A E H V M L V D L A R N D I N R I	TRP2Hefe
337	D G S L D R D L D S R I E L E M R T D H K K E L S E H L M L V D L A R N D L A R I	TrpEColi
416	S K P G S V K V E N L M N I E R Y S H V M H I S S T V T G E L R D D L T C W D A	Asa1Zm
442	S K P G S V K V E K L M N I E R Y S H V M H I S S T V S G Q L D D H L T C S W D A	Asa2Zm
416	S K P G S V K V E K L M N V E R Y S H V M H I S S T V T G E L R D D L T C W D A	Asa1Os
444	S K P G S V K V E K L M N I E R Y S H V M H I S S T V S G E L D D H L T C S W D A	Asa2Os
449	S K S I G S V K V E K L M N V E R Y S H V M H I S S T V T G E L Q D N L S C W D A	Asa1Rg
447	S E P G S V K V E K L M N I E H Y S H V M H I S S T V T G E L D H L T S W D A	Asa2Rg
434	T K Y G S V K V E K L M N I E R Y S H V M H I S S T V T G E L Q D G L T C W D V	ASA1At
447	S K P G S V E V K K L K D I E W F S H V M H I S S T V V G E L D H L T S W D A	ASA2At
419	S K P G S V N V E K L M S V E R Y S H V M H I S S T V S G E L L D H L T C W D A	Asa2Nt
359	C D P L T T S V D K L L T I Q K F S H V Q H L V S Q V S G V L R P E K T R F D A	TRP2Hefe
377	C T P G S R Y V A D L T K V D R Y S Y V M H L V S R V V G E L R H D L D A L H A	TrpEColi

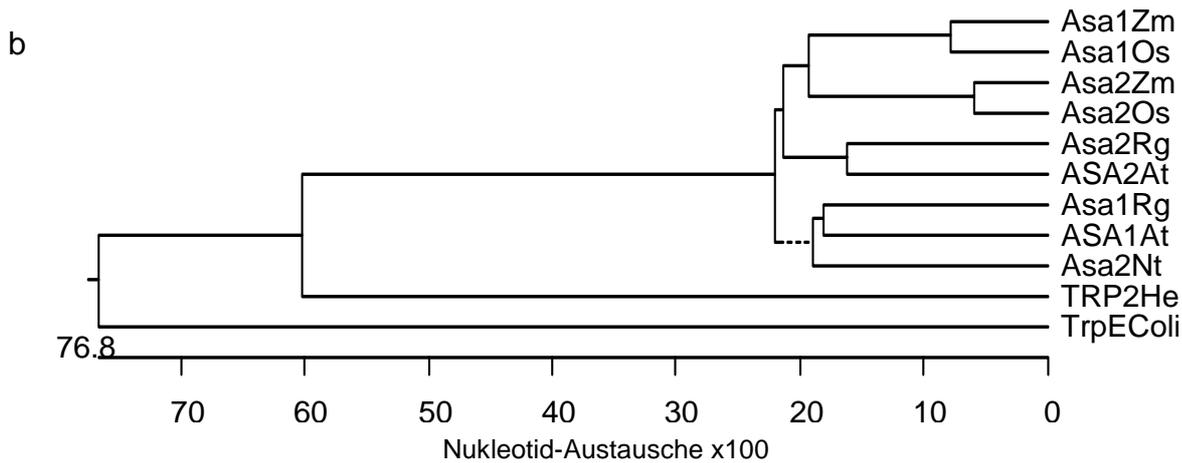
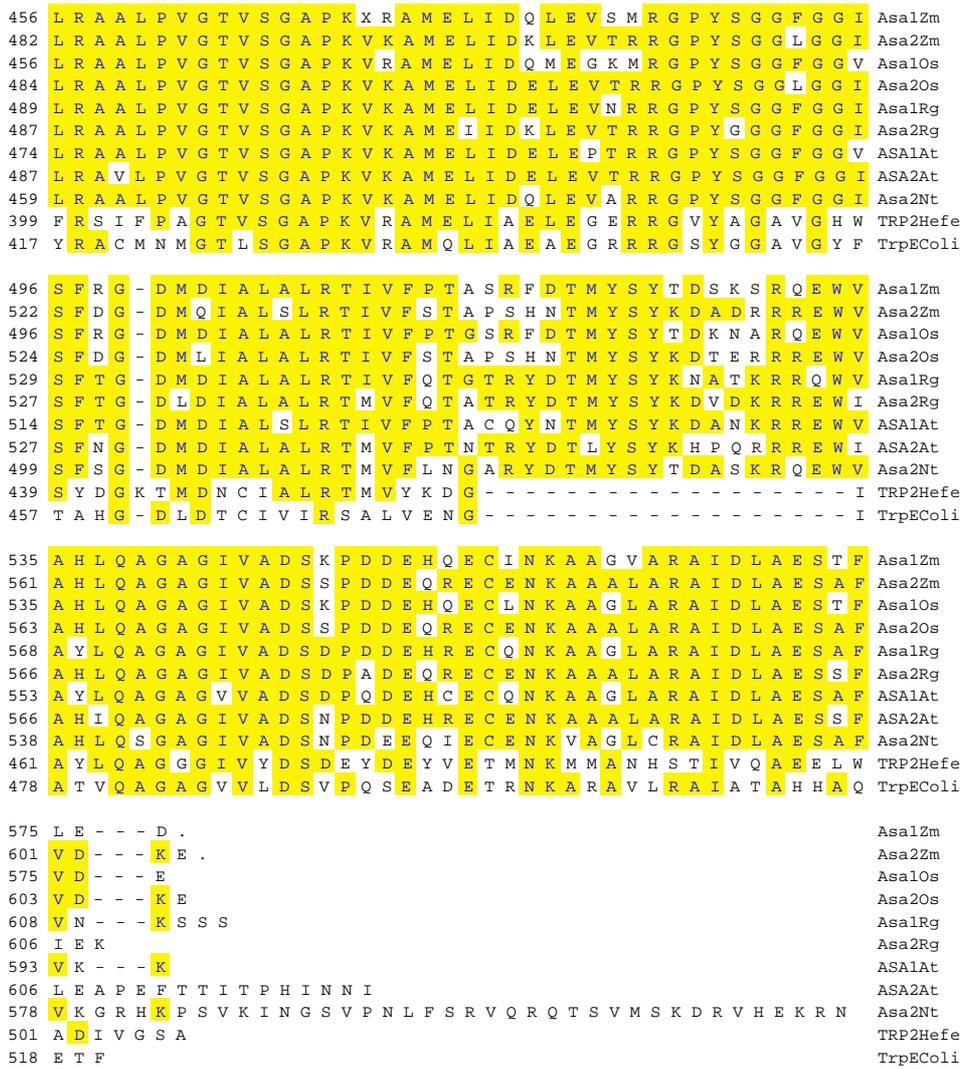


Abb. 23: **a:** Alignment verschiedener ASAs. Potentiell funktionelle Aminosäuren (siehe Text) sind umrandet, identische Aminosäuren sind grau unterlegt. **b:** Stammbaum, resultierend aus **a**. Zm: *Zea mays*, Os: *Oryza sativa*, Rg: *Ruta graveolens*, At: *Arabidopsis thaliana*, Nt: *Nicotiana tabacum*.

Alle pflanzlichen ASAs besitzen eine putative Plastidenlokalisierungssequenz und sind vermutlich, wie die meisten an der Tryptophanbiosynthese beteiligten Enzyme (Radwanski und Last, 1995), in Plastiden lokalisiert. Für AS α 1 und AS α 2 aus *Ruta graveolens* wurde die Lokalisierung in Chloroplasten mit Importexperimenten nachgewiesen (Bohlmann *et al.*, 1995). Bei Reis wurde eine Lokalisierung in den Chloroplasten durch Expression einer *gfp*-Fusion gezeigt (Tozawa *et al.*, 2001, Tozawa und Wakasa, nicht veröffentlicht). Die NH₂-Termini von ZmASA1 und ZmASA2 zeigen die gleiche Signatur wie die Reissequenz, es finden sich hier die indikativen Aminosäuren Ser, Thr, Lys und Arg und dieser Bereich ist zudem arm an sauren Aminosäuren, was typisch für ein chloroplasten-spezifisches Signalpeptid ist (Abb. 23a, Tozawa *et al.*, 2001). Eine Vorhersage mit dem Programm TargetP V1.0 (Emanuelsson *et al.*, 2000) für ZmASA1 gibt mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit eine Lokalisierung in den Mitochondrien oder Chloroplasten an. Nach der Vorhersage ist ZmASA2 mit hoher Wahrscheinlichkeit im Chloroplasten lokalisiert. Die intrazelluläre Lokalisation der Maisenzyme muss noch experimentell bestimmt werden.

ASAs werden häufig durch das Endprodukt Tryptophan gehemmt. In Hefe (*S. cerevisiae*) und *Salmonella typhimurium* sind einige essentielle Positionen und Aminosäuren für diese feed-back-Hemmung bekannt (Graf *et al.*, 1993, Caligiuri und Bauerle, 1991; Abb. 23a, die Elemente sind umrahmt). In höheren Pflanzen liegen Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Hemmung haben, in der Nähe dieser Bereiche (Song *et al.*, 1998). Zum Beispiel führt in OASA1 eine Mutation der Asparaginsäure zu Asparagin an Position 323 zum Verlust der feed-back-Hemmung und damit zu einem höheren Tryptophangehalt (Tozawa *et al.*, 2001). ZmASA2, nicht aber ZmASA1, besitzt an der entsprechenden Position ein Asparagin, könnte also nicht feed-back-inhibierbar sein. OASA2, das an der entsprechenden Position ebenfalls ein Asparagin besitzt, also nicht durch Tryptophan inhibierbar sein sollte, führt bei Überexpression in Reis nicht zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Tryptophan. Dies wäre zu erwarten, wenn es sich bei OASA2 um ein nicht feed-back-inhibiertes Enzym handeln würde (Tozawa *et al.*, 2001). Für die Anthranilatsynthasen von *R. graveolens* und *N. tabacum* sind ebenfalls Aminosäuresequenzen bekannt, die für die Hemmung durch Tryptophan essentiell sind. Diese befinden sich bei *R. graveolens* an Position 138 (Bohlmann *et al.*, 1996), bei *N. tabacum* an Position 107 und 108 (Song *et al.*, 1998). Bei *R. graveolens* kann aufgrund der jeweils gefundenen Sequenzen spekuliert werden, dass eine feed-back-hemmbar und eine nicht feed-back-inhibierte Form des Enzyms vorliegt. Die ASAs der monokotylen Pflanzen Mais und Reis besitzen an diesen Positionen nicht die für *R. graveolens* und *N. tabacum*

gefundene Signatur. Bei den verschiedenen Enzymen kann also aus der Aminosäuresequenz nicht eindeutig auf eine Hemmbarkeit durch Tryptophan geschlossen werden. In Mais ist eine Mutante bekannt, *bfl* (blue fluorescent-1), deren Anthranilatsynthase 3-40-mal aktiver ist und nicht mehr durch Tryptophan gehemmt wird (Singh und Widholm, 1975). Welche der beiden ASAs in Mais bei dieser Mutation betroffen ist und somit im nicht-mutierten Zustand durch Tryptophan gehemmt wird, ist nicht bekannt.

4.1.3 Expression von *ZmAsa1* und *ZmAsa2*

In der Expressionsanalyse war *ZmAsa2* stets geringfügig stärker exprimiert als *ZmAsa1*, etwa auf dem Niveau von *TSB*. Im Vergleich zu den geringen RNA-Mengen konnten die Proteine in den Western-Analysen in allen untersuchten Proben gut nachgewiesen werden. Gleiches gilt auch für *TSB*: in allen Geweben ist *TSB*-Protein vorhanden. Dies steht im Gegensatz zu *BX1*, das bei vergleichbaren Mengen RNA (z.B. in der 1 cm langen Primärwurzel) kein Signal in der Western-Analyse zeigt. Nur bei den sehr hohen RNA-Werten in den Differenzierungs-zonen war auch der Proteinnachweis möglich (Abb. 18). Aufgrund der verwendeten Kontrollproteinmengen und der Signalstärken in den Western-Analysen (Abb. 18) ist anzunehmen, dass die Antikörper für *BX1* und *BX3* effizienter sind als die von *ZmASA2* und *TSB*. Da trotzdem in allen untersuchten Proben *ZmASA2* und *TSB* nachweisbar waren, scheint die Translationseffizienz dieser mRNA-Spezies sehr hoch zu sein oder die Proteine der „house-keeping“-Gene *ZmAsa1*, *ZmAsa2* und *TSB* sind sehr stabil.

4.2 Techniken der Expressionsanalyse und ihre Grenzen

4.2.1 Quantitative PCR

Zur quantitativen Expressionsanalyse auf RNA Ebene wurde der Lightcycler der Firma Roche verwendet. Dieses Gerät bietet die Möglichkeit, die Konzentration geringster Mengen cDNA mit einer real time-PCR zu bestimmen. In den Experimenten war der Nachweis von 1 fg des jeweiligen Gens mit guter Reproduzierbarkeit möglich. Damit können rechnerisch Transkripte mit einer Abundanz von 4 ppm nachgewiesen werden (siehe Material und Methoden). Führt man eine RT-PCR durch, kann auf diese Weise die bei der RNA-Isolation vorhandene Transkriptmenge bestimmt werden. Kritisch für die Aussage ist die Genauigkeit der Bestimmung der zur cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Menge. Diese wurde auf denaturierenden Agarosegelen überprüft (siehe Material und Methoden). Im Pflanzengewebe enthaltene Stoffe können die Reverse-Transkriptase-Reaktion stören. Die Effizienz der cDNA-Synthese wurde

durch die Bestimmung der Transkriptmengen der cytosolischen Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDHC) für jede RNA-Präparation analysiert. Dieser Wert wurde zur Normierung innerhalb jeder Versuchsreihe verwendet. Die GAPDHC ist konstitutiv exprimiert und wurde bereits in Northern-Analysen als Mengenstandard eingesetzt.

4.2.2 *In situ*-Hybridisierungen

In situ-Hybridisierungen werden eingesetzt, um Transkripte qualitativ im Gewebe zu lokalisieren. Die Hybridisierung ist nur nachweisbar, wenn in einer Zelle eine kritische RNA-Menge überschritten wird. *Bx1* lag in der 1 cm langen Primärwurzel unter diesem Detektionslimit (Abb. 16). Da die quantitative PCR für dieses Gewebe gleichzeitig mittlere Mengen von spezifischer RNA nachweist, muss von einer gleichmäßigen Verteilung geringer *Bx1*-RNA-Mengen ausgegangen werden. Der *in situ*-Nachweis von *Bx1* im Spross zeigt, dass beim Nachweis dieses Transkripts keine prinzipielle Schwierigkeit vorhanden ist (Abb. 15). Die Lightcycleranalysen dieser Arbeit und ähnliche Untersuchungen mit ganzen Keimlingen verschiedener Maislinien (J. Brotherton, nicht veröffentlicht) zeigen, dass wohl generell mehr *Bx1*- als *Bx3*-Transkript vorhanden ist. Dennoch wird bei den *in situ*-Hybridisierungen mit dem P450-Gen *Bx3* ein stärkeres Signal erhalten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die verwendete Sonde auch an die Transkripte der anderen am DIMBOA-Biosyntheseweg beteiligten P450 Enzyme *Bx2*, *Bx4* und *Bx5* hybridisiert. Die Gesamtidentität der codierenden Sequenz von *Bx3* zu *Bx2* / *Bx4* und *Bx5* beträgt 55,7% / 65,4% und 65,5%. Einzelne Bereiche dieser Gene weisen allerdings 74% bis 84% Identität auf (Abb. 24). Es ist also vorstellbar, dass mit der Sonde für *Bx3* auch die Transkripte der anderen P450 Gene detektiert werden.

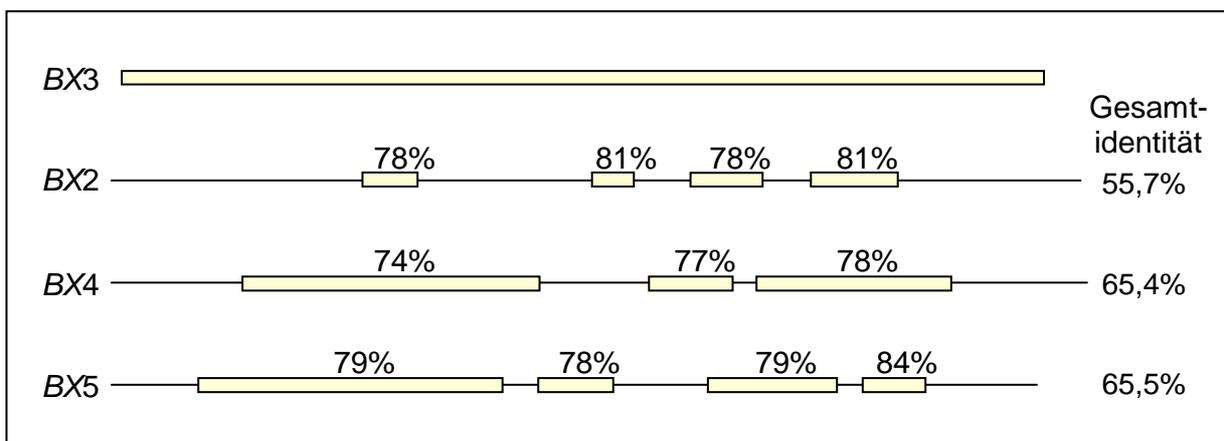


Abb. 24: Homologie innerhalb der vier P450-Gene *Bx2*-*Bx5* (% Identität). Die als Sonde verwendete *Bx3*-cDNA und *Bx2/4/5* weisen in verschiedenen Bereichen hohe Identität auf Nukleotidebene auf.

4.3 Die DIMBOA-Biosynthese: Verteilungsmuster der mRNA und Proteine der beteiligten Gene und des Endprodukts

Die DIMBOA-Synthese in der Entwicklung von Maiskeimlingen wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht. Bei diesen Analysen wurden die Keimlinge nur in Wurzel und Spross geteilt (Cambier *et al.*, 2000) oder die Experimente waren auf die oberirdischen Teile der Maispflanzen beschränkt (Argandoña *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurden Menge und Lokalisierung von DIMBOA in drei verschiedenen Entwicklungsstadien der Primärwurzel, 1 cm, 3 cm und 12-15 cm in Primärwurzeln von *Z. mays* untersucht. Die Bestimmung zeigt geringste relative DIMBOA-Mengen in der 1 cm langen Wurzel und höchste Mengen in der 3 cm langen Wurzel. Innerhalb der Wurzel findet sich die höchste DIMBOA-Konzentration in der Wurzelspitze. Diese Ergebnisse belegen, dass die DIMBOA-Biosynthese in der Wurzel mit der Keimung beginnt und bei Alterung der Wurzel reduziert wird. Die relativ höchste Konzentration von DIMBOA in der Wurzelspitze könnte darin begründet sein, dass dieses Gewebe den Schutz durch die Einlagerung des toxischen Sekundärmetaboliten besonders benötigt. Die Wurzelspitze ist besonders empfindlich und in der Erde vielen potentiellen Schädlingen ausgesetzt. DIMBOA wird aber auch im Exudat von Maiswurzeln gefunden (M. Schulz, persönliche Mitteilung). Alternativ kann daher spekuliert werden, dass hohe DIMBOA-Konzentrationen in der Wurzelspitze für diese Exudatbildung notwendig sind. Welche Teile der Wurzel DIMBOA-Exudate bilden, wurde allerdings bisher nicht bestimmt. Die Konzentrationen des Endprodukts konnten in dieser Arbeit durch die quantitativen und qualitativen Analysen den Protein- und Transkriptmengen der Biosynthesegene gegenübergestellt werden.

Eine Aussage über die gewebespezifische Verteilung der Transkripte war nur für die Wurzelspitze der 1 cm langen Wurzel und das Gen *Bx9*, mit Einschränkungen auch für das Gen *Bx3* möglich. *Bx9* konzentriert sich im Cortex der Wurzelspitze, nicht aber in der Rhizodermis, in den Leitbündeln und im Mark. Die Verteilung der *Bx9*-mRNA stimmt auffallend mit der in der Wurzelspitze gefundenen Verteilung des DIMBOA-Glucosids überein (Abb. 25). Signifikant ist auch der Unterschied zum Expressionsmuster von *Bx3* in der Wurzel. Das *Bx3*-Signal beschränkt sich in der Wurzelspitze auf einen kleinen Bereich innerhalb der meristematischen Zone und hier auf das Grundmeristem des Cortex und des Marks; in den Leitbündeln ist kein Transkript nachweisbar (Abb. 15 und 16). Dieser Befund stimmt mit früheren Arbeiten überein (Kliem, 1994, Frey *et al.*, 1995). Auch bei den *in situ*-Hybridisierungen am ganzen Keimling unterscheiden sich die Verteilung der Transkripte von *Bx1*

und *Bx3* gegenüber der Verteilung von *Bx9* (Abb. 15). Während *Bx1* und *Bx3* im Spross hauptsächlich in der Koleoptile lokalisieren, ist *Bx9* gleichmäßig über den gesamten Spross verteilt.

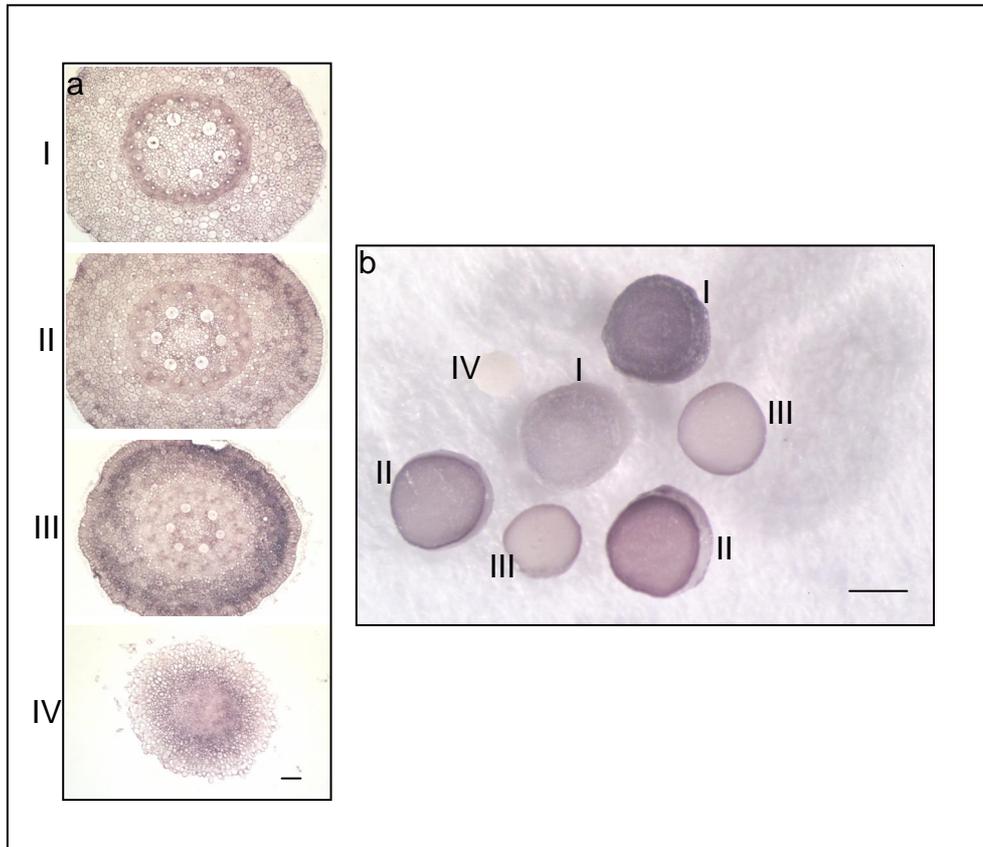


Abb. 25: Vergleich der *in situ*-Hybridisierungsergebnisse mit der *Bx9*-Sonde (a) und der DIMBOA-Färbung (b). a und b zeigen Querschnitte von 1 cm langen Primärwurzeln. Der Balken in a entspricht 75 μm , in b 500 μm . Vergleichbare Bereiche sind mit gleichen römischen Ziffern bezeichnet.

Für die längeren Wurzeln kann auf die Verteilung der spezifischen mRNA-Species nur aus der quantitativen Bestimmung der Transkripte geschlossen werden. Auch hier ergibt sich ein Unterschied zwischen der Verteilung der Transkripte der Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* und der DIMBOA-Biosynthesegene *Bx1* und *Bx3*. Die Transkriptmengen von *Bx8* und *Bx9* sind bei den 3 cm langen Wurzeln in der Übergangs- und Differenzierungszone ungefähr gleich hoch, wohingegen die Transkriptmengen von *Bx1* und *Bx3* in der Übergangszone wesentlich geringer sind als in der Differenzierungszone (Abb. 10). Die Transkripte und Proteine der Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* konnten auch in der Spitze der längeren Wurzeln deutlich nachgewiesen werden, entsprechendes war für die Gene der DIMBOA-Synthese *Bx1* und *Bx3* nicht möglich. Da die untersuchten Enzyme vergleichbare katalytische Kenndaten besitzen (Tabelle 9), steht in der Wurzelspitze eine Überkapazität an DI(M)BOA-Glucosyltransferasen zur Verfügung. Damit könnten die Glucosyltransferasen in diesem

Gewebe eine von der Biosynthese abweichende Funktion ausüben. In Experimenten mit transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* dazu in der Lage sind, in *Arabidopsis thaliana* exogen appliziertes DI(M)BOA zu entgiften (v. Rad *et al.*, 2001). Die Enzyme könnten also auch in *Z. mays* die Aufgabe besitzen, exogenes DIMBOA zu glucosylieren. Mit dieser Funktion ist auch die Verteilung der *Bx8/Bx9*-Transkripte im äußeren Bereich der 1 cm langen Wurzeln gut vereinbar.

Bei den quantitativen Analysen fällt die im Vergleich zu *Bx3* sehr hohe Transkript- und Proteinmenge von *Bx1* in den Differenzierungszonen auf. Im Gegensatz zu *BX3* kann *BX1* durch Western-Analysen nachgewiesen werden. Das *BX1*-Protein findet sich, wie die höchsten mRNA-Mengen von *Bx1*, in der Differenzierungszone (Abb. 18). Da die kinetischen Eigenschaften von *BX1* und *BX3* ähnlich sind (Tabelle 9), würde man gleiche Proteinmengen erwarten. Eine mögliche Erklärung für die relativ große Menge an *BX1* wäre, dass dieses Enzym eine weitere Aufgabe in einem anderen Stoffwechselweg besitzt und deswegen in größeren Mengen benötigt wird. Für die Auxinbiosynthese werden neben der Tryptophan-abhängigen Synthese mehrere Tryptophan-unabhängige Biosynthesewege postuliert (Ljung *et al.*, 2002). In Experimenten mit Zellextrakten aus Maiskeimlingen konnte Indol als Vorstufe in IAA eingebaut werden (Östin *et al.*, 1999). In Maiskörnern konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die natürliche Auxinbiosynthese nicht über Indol läuft (Glawischnig *et al.*, 2000). Allerdings könnte durch *BX1* produziertes, freies Indol über TSB in Tryptophan eingebaut und so in den Auxinbiosyntheseweg eingeschleust werden. Die Tatsache, dass die Maismutante *bx1bx1* (benzoxazineless) außer der fehlenden DIMBOA-Produktion keine weiteren Phänotypen zeigt (Melanson *et al.*, 1997), spricht allerdings nicht für diese Hypothese. Möglicherweise wird Indol in der Maiswurzel anderweitig verwendet.

Tabelle 9: Vergleich der kinetischen Eigenschaften von *BX1* für das Substrat IGP (Frey *et al.*, 1997), *BX3* für 2-Indolinon (Glawischnig, 1997), *BX8* und *BX9* für DIMBOA (v. Rad, 2000).

Enzym	<i>BX1</i>	<i>BX3</i>	<i>BX8</i>	<i>BX9</i>
K_M (μM)	13	10	81	71
k_{kat} (s^{-1})	2,8	1,9	22,7	11,6
k_{kat}/K_M ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0,21	0,19	0,28	0,16

4.4 Wird das DIMBOA-Glucosid transportiert?

Ein weiterer Unterschied zeigt sich bei einem Vergleich der Verteilung von Transkripten von Genen und Proteinen der DIMBOA-Biosynthese mit der Lokalisierung des DIMBOA-Glucosids. Die relativ höchste Transkriptmenge für *Bx1* wurde jeweils in der Differenzierungszone der 3 bzw. 12-15 cm langen Wurzel detektiert (Abb. 26). Auch das Protein BX1 konnte in den Western-Analysen nur in der Differenzierungszone nachgewiesen werden (Abb. 18). Das Endprodukt DIMBOA wird dagegen in höchster Konzentration in der Wurzelspitze gefunden, in der *Bx1* und auch *Bx3* kaum nachweisbar waren (Abb. 26, 10 und 11). Dies spricht dafür, dass Synthese- und Speicherort von DIMBOA nicht übereinstimmen, DIMBOA also transportiert wird. Da DIMBOA selbst autotoxisch wirkt, ist anzunehmen, dass das weniger giftige DIMBOA-Glucosid transportiert werden muss. Der Transport von ungiftigen Sekundärstoffwechselprodukten ist bei Pflanzen weit verbreitet. Beispiele sind die Biosynthesen von Vinblastin und Pyrrolizidinalkaloiden.

Das stark cytotoxische Vinblastin wird enzymatisch aus den ungiftigen Stoffen Vindolin und Catharanthin hergestellt (St-Pierre *et al.*, 1999). Die Vorstufen von diesen beiden Stoffen werden vermutlich in den Wurzeln und in der Epidermis der Stengel und Blätter synthetisiert. Anschließend werden die Vorstufen in die Milchröhrenzellen und Idioblasten der Blätter transportiert, wo die letzten Schritte der Vinblastinbiosynthese stattfinden (St-Pierre *et al.*, 1999). Für die kurze Transportstrecke zwischen Epidermis- und Milchröhrenzellen/Idioblasten wird ein interzellulärer Transport vorgeschlagen. Weitere Beispiele für den Transport von Sekundärmetaboliten sind die Nikotinalkaloide, die über das Xylem und Pyrrolizidinalkaloide (PAs), die über das Phloem transportiert werden (De Luca und St Pierre, 2000). Die Synthese der PAs wurde besonders gut in *Senecio*-Spezies untersucht (Ober und Hartmann, 2000). Senecionine-*N*-oxid, die Grundstruktur der Senecionin-Typ-PAs wird in Wurzeln synthetisiert, über das Phloem in den Spross transportiert und dort chemisch verändert (Ober und Hartmann, 2000, Moll *et al.*, 2002). Auch Glucosinolate werden in *Arabidopsis* über das Phloem in die Samen transportiert (Chen *et al.*, 2001).

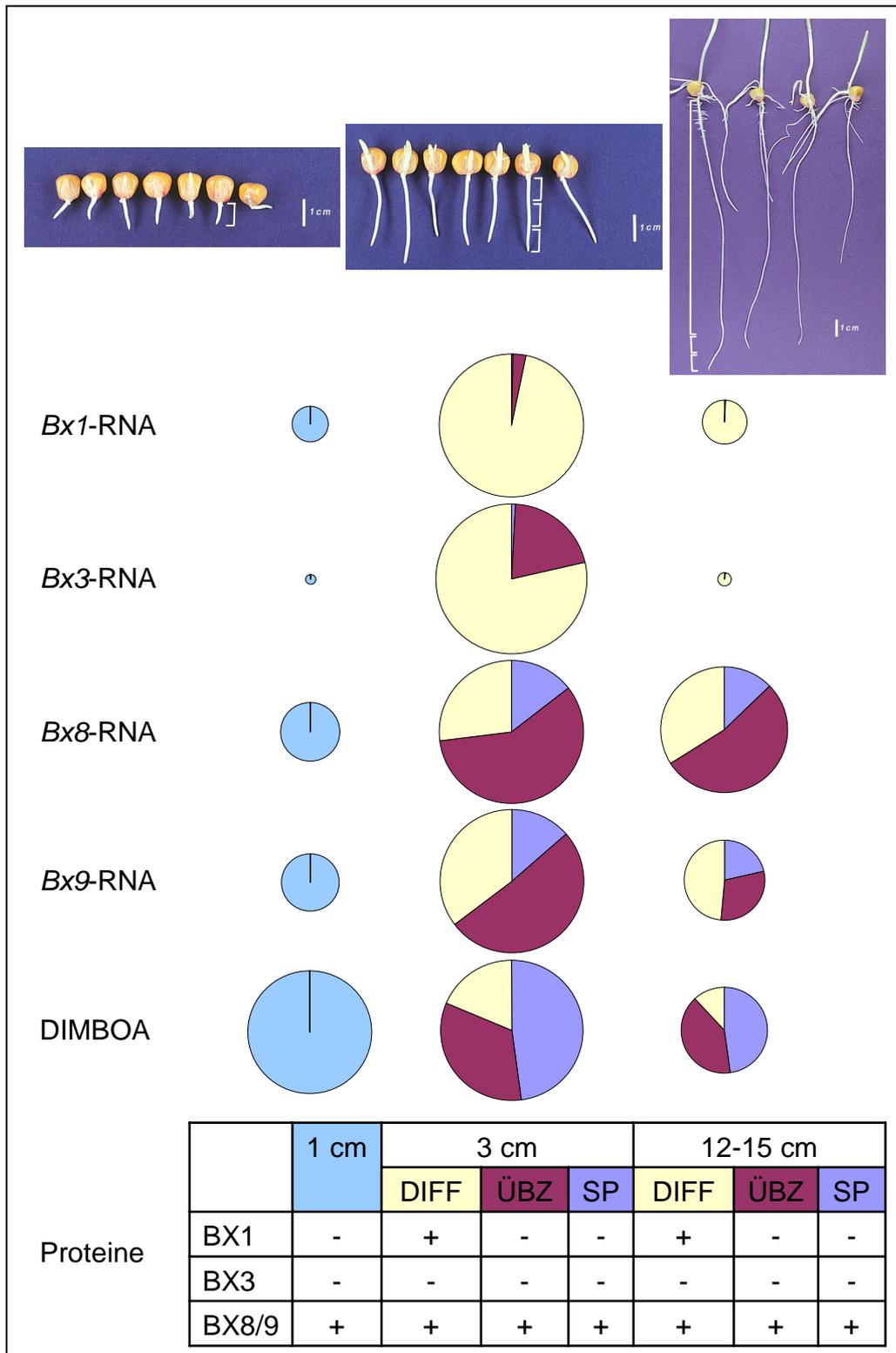


Abb. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse auf RNA-, Protein und Endproduktebene. Die Größen der Kreise für RNA/DIMBOA korrelieren mit den Gesamtmengen an Transkript/Endprodukt in 1, 3 und 12-15 cm langen Wurzeln. Die Verteilung der Gesamt-Transkriptmenge bzw. des Produkts auf die untersuchten Gewebe ist durch die Sektoren dargestellt: DIFFZ gelb, ÜBZ Violett, SP blau. Die 1 cm Wurzeln wurden in ihrer Gesamtheit analysiert (türkis). SP: Wurzelspitze, ÜBZ: Übergangszone, DIFFZ: Differenzierungszone. RNA: Einheit: (pg spez. RNA)/(pg GAPDHC-RNA); *Bx1*: 1 cm: 0,128, 3 cm: 0,502, 12-15 cm: 0,150; *Bx3*: 1 cm: 0,008, 3 cm: 0,110, 12-15 cm: 0,010; *Bx8*: 1 cm: 0,052, 3 cm: 0,124, 12-15 cm: 0,110; *Bx9*: 1 cm: 0,267, 3 cm: 0,654, 12-15 cm: 0,372; DIMBOA: Einheit: (nmol DIMBOA)/(mg Frischgewicht); 1 cm: 3,750, 3 cm: 4,361, 12-15 cm: 2,634;

Über weite Strecken erfolgt der Sekundärmetaboliten-Transport im Xylem oder Phloem. Im Xylem wird mit dem Transpirationsstrom von den Wurzeln zu den Orten der Transpiration transportiert. Deswegen kann ein Transport von gelösten Stoffen über das Xylem nur in einer Richtung, von den Wurzeln zu den Blättern erfolgen. Der Transport über das Phloem erfolgt immer vom Produktionsort zum Empfangsort (Buchanan, 2000). Ein Transport des DIMBOA-Glucosids von der Differenzierungszone zur Wurzelspitze würde also vermutlich über das Phloem oder über einen interzellulären Kurzstreckentransport stattfinden, zumal in Xylemexudaten von Maisblättern kein DIMBOA nachgewiesen werden konnte (Argandoña *et al.*, 1985). Der putative Transport des DIMBOA-Glucosids könnte durch radioaktiv markierte Produkte nachgewiesen werden. Vorstellbar ist, dass das DIMBOA-Glucosid in die Wurzelspitze transportiert wird, um als Aglucon ausgeschieden zu werden. Im Boden könnte das ausgeschiedene DIMBOA zum einen Schutz vor Pathogenen bieten und zum anderen allelopathisch auf andere Pflanzen wirken.

4.5 Das übereinstimmende Entwicklungsprogramm der Maiswurzeln

Unabhängig vom Ursprung der Wurzel im basalen Meristem (Primärwurzel), den embryonalen Nodien (Embryonalwurzeln) oder den Sprossnodien (Kronwurzeln) findet sich dasselbe charakteristische Transkriptmuster für die *Bx*-Gene der DIMBOA-Glucosid-Biosynthese und für die Gene *ZmAsa1*, *ZmAsa2* und *TSB* (Abb. 11). Lediglich *TSB* zeigt in allen Geweben konstante Transkriptmengen, die anderen untersuchten Gene weisen hier signifikante Unterschiede auf. Die Werte für *ZmAsa2*, *Bx8* und *Bx9* verändern sich zwischen Übergangszone und Differenzierungszone kaum und liegen generell über den in der Wurzelspitze gefundenen Werten. Besonders auffällig ist die zuvor diskutierte relativ hohe *Bx1*-Transkriptmenge in der Differenzierungszone, im ältesten und am stärksten differenzierten Gewebe der Wurzel. Es scheint also, dass sich die Wurzeln immer nach dem selben Programm entwickeln, unabhängig davon, aus welchem Organ sie gebildet werden.

Die Analysen der Seitenwurzelmutante *lrt1* zeigen, dass die relativ hohen Transkriptmengen von *Bx1* in der Differenzierungszone der 12-15 cm langen Wurzeln durch die Bildung der Seitenwurzeln nicht beeinflusst wird (Abb. 13). Bei der Seitenwurzelentwicklung in Mais werden ausdifferenzierte nicht-meristematische Perizykelzellen und manchmal auch Endodermiszellen zur Zellteilung und Bildung der Seitenwurzelprimordien angeregt. Dieser Prozess wird durch Auxin induziert (zusammengefasst in Hochholdiger *et al.*, 2001). Exogen an der Schnittfläche Wurzel/Hypokotyl appliziertes Auxin wird unter anderem auch in die

Differenzierungszone der Wurzel transportiert (Kerk und Feldmann, 1995). Neben dem Transport von Auxin wäre auch eine direkte Synthese des Pflanzenhormons in der Differenzierungszone denkbar. Postuliert man eine Beteiligung von durch BX1 produziertem Indol an der Auxinbiosynthese, wäre die nachgewiesene relativ hohe *Bx1*-Transkriptmenge als „Auslöser“ für die Seitenwurzelentwicklung erklärbar. Die *bx1bx1*-Mutante spricht allerdings gegen diese Hypothese.

5. Zusammenfassung

Die Benzoxazinone DIBOA und DIMBOA sind Sekundärmetabolite der generellen Pflanzenabwehr. Die DIMBOA-Biosynthese zweigt von der Tryptophan-Biosynthese ab und ist in *Zea mays* fast vollständig aufgeklärt. Die vorhandenen Informationen wurden in dieser Arbeit genutzt, um eine umfassende Expressionsanalyse durchzuführen. Auch Gene aus dem Primärstoffwechsel (Anthranilatsynthase, Tryptophansynthase) wurden in die Expressionsanalyse mit aufgenommen. Zunächst wurden die cDNAs und die genomischen Klone für die beiden Anthranilatsynthasen (*ZmAsa1*, *ZmAsa2*) isoliert.

Die Expression der Biosynthesegene wurde auf RNA-Ebene mit quantitativer PCR und *in situ*-Hybridisierungen, auf Proteinebene mit Westernanalysen untersucht. Zusätzlich wurde der DIMBOA-Gehalt der Gewebe bestimmt. Als Pflanzenmaterial dienten Primär-, Embryonal- und Kronwurzeln in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Z. mays*, die in Wurzelspitze, Übergangs- und Differenzierungszone unterteilt wurden.

Die RNA-Expressionsmuster gleichen sich in allen Wurzeltypen, dieses Muster ist also unabhängig davon, ob die untersuchte Wurzel aus embryonalem Gewebe oder aus Sprossnodien entstanden ist.

In den untersuchten Geweben ergeben sich für *TSB* und *ZmAsa1* keine Unterschiede auf Transkriptebene, dagegen nimmt die Transkriptmenge von *ZmAsa2* in der Übergangs- und Differenzierungszone zu. In der Westernanalyse wird eine gleichmäßige Ausprägung dieser Gene des Primärstoffwechsels detektiert. *Bx1*, das den DIMBOA-Biosyntheseweg eröffnet, ist sowohl auf RNA-, wie auch auf Proteinebene am stärksten in der Differenzierungszone exprimiert. *Bx3*, ein P450-Enzym des DIMBOA-Biosyntheseweges, ist stets schwächer exprimiert als *Bx1*. Dies könnte darauf hindeuten, dass *Bx1* Indol für weitere Biosynthesen bereitstellt. Die Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* zeigen höchste Expression in der Übergangs- und Differenzierungszone. Im Gegensatz zu *Bx1* und *Bx3* weist für *Bx8* und *Bx9* aber auch die Wurzelspitze signifikante Transkript- und Proteinmengen auf. Diese Wurzelspitzenexpression könnte notwendig sein, um eine Detoxifizierung exogenen DIMBOAs durch Glucosylierung zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu den DIMBOA-Biosynthesegenen ist die Konzentration von DIMBOA in der Wurzelspitze am höchsten. Vorstellbar wäre also ein Transport von DIMBOA-Glucosid von

der Differenzierungszone der Wurzeln zur Wurzelspitze. Dort könnte die Aufgabe darin bestehen, die empfindliche Wurzelspitze möglicherweise auch durch Ausscheidung von DIMBOA vor Schädigung durch Pathogene zu schützen.

6. Literaturverzeichnis

Argandoña, V. H. and Corcuera, L. J. (1985) Distribution of hydroxamic acids in *Zea mays* tissues. *Phytochemistry* **24**: 177-178.

Bailey, B. A. and Larson, R. L (1991) Maize microsomal benzoxazinone N-monooxygenase. *Plant Physiol.* **95**: 792-796.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* **7**: 1513-1523.

Bohlmann, J., De Luca, V., Eilert, U., Martin, W. (1995) Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase of *Ruta graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes. *Plant J.* **7**: 491-501.

Bohlmann, J., Lins, T., Martin, W. und Eilert, U. (1996) Anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: Duplicated AS α genes encode tryptophan-sensitive and tryptophane-insensitive isoenzymes specific to amino acid and alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol.* **111**: 507-514.

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. First edition, American Society of Plant Biologists.

Bullock, W. O., Fernandez, F. M. und Short, J. M. (1987) A high efficiency plasmid transforming red A Escherichia coli strain with beta galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376 – 379.

Caligiuri, M. G. and Bauerle, R. (1991) Identification of amino acid residues involved in feedback regulation of the anthranilate synthase complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **266**: 8328-8335.

Cambier, V., Hance, T., 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.

Chen, S., Petersen, B. L., Olsen, C. E., Schulz, A. and Halkier, B. A. (2001) Long distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**: 194-201.

Chester, N. and Marshak, D. (1993) Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m-reduction: A method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Analyt. Biochem.* **209**: 284-290.

Cicek, M. und Esen, A. (1998) Structure and expression of a dhurinase (beta-glucosidase) from sorghum. *Plant Physiol.* **116**: 1469-1478.

Collantes, H. G., Gianoli, E. und Niemeyer, H. M. (1998) Changes in growth and chemical defences upon defoliation in maize. *Phytochemistry* **49** (7): 1921-1923.

Crawford, I. P. (1989) Evolution of a biosynthetic pathway: the tryptophan paradigm. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 567-600.

Creighton, T. E., Yanofsky, C. (1966) Association of the alpha and beta-2 subunits of the tryptophan synthetase of *Escherichia coli*. J Biol. Chem. **241**: 980-990.

De Luca, A. and St-Pierre, B. (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis Trends in Plant Science **5** (4): 168-173.

Emanuelsson, E., Nielsen, H., Brunak, S. and v. Heinje, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal aminoacid sequence. J. Mol. Biol. **300**: 1005-1016.

Esen, A. (1992) Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) b-glucosidase. Plant Physiol. **98**: 174-182.

Feix, G., Hochholding, F. and Park, W. J. (2001) Maize root system and genetic analysis of its formation. In: Plant roots the hidden half, Third edition, Herausgeber: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. Marcel Dekker, Inc.: 239-248.

Frey, M., Reinike, J., Grant, S., Saedler, H. und Gierl, A. (1990) Excision of the En/Spm transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins. EMBO-J. **9**: 4937-5044.

Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., 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., Gierl, A. (1997) Analysis of chemical plant defense mechanism in grasses. Science **277**: 696-699.

Frey, M., Stettner, C., Pare, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H., Gierl, A. (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. PNAS **97**: 14801-14806.

Frey, M., Huber, K., Park, W. J., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R. B., Simmons, C. R., Yalpani, N., Gierl, A. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. Phytochemistry, in press.

Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poutska, A. and Muray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. **170**: 827-842.

Gierl, A. and Frey, M. (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. Planta **213**: 493-498.

Glawischnig, E. (1997) Biochemische und genetische Aufklärung der Biosynthese von Benzoxazinonen in *Zea mays*. Dissertation, Technische Universität München.

Glawischnig, E., Tomas, A., Eisenreich, W., Spittler, P., Bacher, A., and Gierl, A. (2000) Auxin biosynthesis in maize kernels. Plant Phys. **123**: 1109-1119.

Graf, R., Mehmman, B., Braus, H. G. (1993) Analysis of feedback resistant anthranilate synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriology **175**: 1061-1068.

Hartmann, T. (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol. Exp. Appl.* **80**: 177-188.

Hochholdinger, F. and Feix, G. (1998) Early post-embryonic root formation is specifically affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant Journal* **16** (2): 247-255.

Hochholdinger, F., Park, W. J. and Feix, G. H. (2001) Cooperative action of *SLR1* and *SLR2* is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiol.* **125**: 1529-1539.

Holton, T. A., Cornish E. C. (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, **7**: 1071-1083.

Huber, K. (2002) Isolierung und Charakterisierung einer Dioxygenase im DIMBOA-Biosyntheseweg von *Zea mays*. Diplomarbeit, Technische Universität München.

Ishikawa, H. and Evans, M. L. (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* **109**: 725-727.

Iwamura, H., Nakagawa, E. and Hirai, N. (1996) Localization of benzoxazinones that occur constitutively in wheat seedlings. *Z. Naturforsch.* **51c**: 807-812.

Kerk, N. M. and Feldmann, L. J. (1995) A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development* **121**: 2825-2833.

Kiesselbach, T. A. (1980) The structure and reproduction of corn. University of Nebraska Press, Lincoln and London.

Kisser, J. G. (1958) Die Ausscheidung von ätherischen Ölen und Harzen. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 10: Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe. Herausgeber: W. Ruhland.

Kliem, R. (1994) Untersuchung der Expression einer Cytochrom-P450-Genfamilie in *Zea mays*. Dissertation, Universität zu Köln.

Klun, J. A., Guthrie, W. D., Hallauer, A. R. und Russel, W. A. (1970) Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbreds. *Crop Sci.* **10**: 87-90.

Kozziel, M. G., Carozzi, N. B. and Desai, N. (1996) Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol. Biol.* **32** (1-2): 393-405.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D. and Chapple, C. (2000) Cloning of the *SNG1* Gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**: 1295-1306.

Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D. and Sandberg, G. (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **49**: 249-272.

Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**: 16-20.

Luehrsen, K. R. and Walbot, V. (1994) Addition of A- and U-rich sequence increases the splicing efficiency of a deleted form of a maize intron. *Plant Mol. Biol.* **24**: 449-463.

Melanson, D., Chilton, M.-D., Masters-Moore, D. and Chilton, S. W. (1997) A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of *bxbx* maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13345-13350.

Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T. und Ober, D. (2002) Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidin alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase *Plant Phys.* **130**: 47-57.

Murray, N. (1983) Phage Lambda and molecular cloning. In: Lambda II Herausgeber: Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W. and Weisberg, R. E. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: 395-432.

Niemeyer, H. M. (1988) Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* **27**: 3349-3358.

Niyogi, K. K. und Fink, G. R. (1992) Two anthranilate synthase genes in *Arabidopsis*: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *Plant Cell* **4**: 721-733.

Nultsch, W. (1991) Allgemeine Botanik. 9., neubearbeitete Ausgabe Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York.

Ober, D. and Hartmann, T. (2000) Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* **44**: 445-450.

Osborn, A. E. (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.

Östin, A., Ilic, N., Cohen, J. D. (1999) An in vitro system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Plant Phys.* **119** (1): 173-178.

Park, W. J., Schäfer, A., Prinsen, E., van Onckelen, H., Kang, B. G., Hertel, R. (2001) Auxin-induced elongation of short maize coleoptile segments is supported by 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Planta* **213**: 92-100.

Poulsen, C., Bongaerts, R. J. M., Verpoorte, R (1993) Purification and characterization of anthranilate synthase from *Catharanthus roseus*. *Eur. J. Biochem.* **212**: 431-440.

The QIAexpressionist (2001) A handbook for high-level expression and purification of 6x His-tagged proteins. QIAGEN.

- v. Rad, U. (2000) Isolierung und funktionelle Charakterisierung der UDP-Glucosyltransferasen *Bx8* und *Bx9* des DIMBOA Biosyntheseweges in *Zea mays*. Dissertation, Technische Universität München.
- v. Rad, U., Hüttl, R., Lottspeich, F., Gierl, A. und Frey, M. (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of bezoxazinoids in maize. *Plant Journal* **28**(6): 633-642.
- Radwanski, E. R., Last, R. L. (1995) Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* **7**: 921-934.
- Romero, R. M. und Roberts, M. F. (1996) Anthranilate synthase from *Ailanthus altissima* cell suspension cultures. *Phytochemistry* **41**: 395-402.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1987) Vectors for selective expressio of cloned DNAs by T7 RNA polymersae. *Gene* **56**: 125-135.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklein, S. and Coulsen, A. R (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M. und Gierl, A. (2000) Role of natural bezoxazinones in the survival strategy of plants. *International Review of Cytology* **198**: 319-343.
- Simcox, K und Weber, D. (1985) Location of the benzoxazinless (bx) Locus in maize by monosomic and B-A translocation analysis. *Crop Science* **25**, 827-830.
- Simpson, G. G. and Filipowicz, W. (1996) Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1-41.
- Singh, M. and Widholm, J. M. (1975) Study of a corn (*Zea mays* L.) mutant (blue fluorescent-1) which accumulates anthranilic acid and its beta-glucoside. *Biochem. Genet.* **13** (5-6): 357-367.
- Spiteller, P., Glawischnig, E., Gierl, A., Steglich, W. (2001) Studies on the biosynthesis of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) from 3-hydroxyindolin-2-one in *Zea mays*. *Phytochemistry* **57** (3): 373-376.
- 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 *Antherinum majus*, the protein shows homology to transcription factors. *EMBO-J.* **9**: 605-613.
- Song, H. S., Brotherton, J. E., Gonzales, R. A., Widholm, J. M. (1998) Tissue culture-specific expression of a naturally occuring tobacco feedback-insensitive anthranilate synthase. *Plant Physiol.* **117**: 533-543.
- Stettner, C. (1998) DIMBOA-Biosynthese in Mais: Isolierung und funktionelle Charakterisierung des *Bx1*-Gens. Dissertation, Technische Universität München.

St-Pierre, B., Vazquez, F. A., De Luca, V. (1999) Multicellular compartmentation of *Caharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, **11**: 887-900.

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.

The *Arabidopsis* genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-814.

Tozawa, Y., Hasegawa, H., Terakawa, T. und Wasaka, K. (2001) Characterization of rice anthranilate synthase α -subunit genes *OASA1* and *OASA2*. Tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback insensitive mutant of *OASA1*. *Plant Phys.* **126**: 1493-1506.

Vom Endt, D., Kijne, J. W., Memelink, J. (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulator? *Phytochemistry* **61**: 107-114.

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

Wu, H., Haig, T., Pratley, J., Lemerle, D. und An, M. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.) production and exudation of 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one. *Journal of Chemical Ecology* **27**(8): 1691-1700.

7. Anhang

Sequenz cDNA-Fragment *ZmAsa1*:

GAACGCGAGGCGCCAGCTTTCTCTTCGAGTCTGTTGAGCAGGGGTCCGAGGGCACCAATGTGGGGAGGTACAGCGTGGT
TGGGGCGCAGCCTGCTATGGAGGTGCTGGCCAAGGCTAACCATGTGACGGTCATGGACCATGAGATGAAGTCGAGGAGGG
AGCACTTCGTGCCTGATCCCATGAGGATCCCAGGACAATCATGGAGCAGTGGAACCCGAGATTGCTGACAGCCTCCCT
GATGCATTTTGTGGAGGATGGGTTGGATTCTTCTCATATGATACAGTGCCTTATGTTGAAACAAAGAAGCTTCCCTTCAG
TAAGGCACCACATGATGATAGGAACCTTCTGATATTCATTTAGGCCTCTATAGTGACGTCATTGTGTTGATCATGTTG
AAAAGAAAACACATGTTATTTCATTTGGGTGAGGACAGACTGCTATCGTTCTGTTGATGAAGCATATGAAGATGGAAGAAAT
CGGCTTGAAGCTTTGTTATCAAGATTACATTGCCTCAATGTCCCAACACTTCTTCTGGTTCTATAAACTCAATGTTGA
AACTTTGGCCCAGTAATGCAAAAATCAACGATGTCAAGCGAAGAATATAAAAATATCGTTGTCCAAAGCTAAAGAACACA
TCTTGGCCGGTGACATTTTCCAAGTTGTTTAAAGCCAGCGTTTGGAGAGACGGACATTGCGCCACCCCTTTGAAATCTAT
CGTGCATTGCGCATCGTAAATCCTAGTCCATATATGGCCTATCTACAGGCACGAGGTTGATTCTCGTGGCATCGAGTCC
TGAAATTTCTTACCCGGGTACAAAAGAGGACAATAATCAATCGTCCGCTTGCTGGAAACCATAAGAAGAGGCAAAACAAAAG
CAGAAGACAAAACCTTAGAACAAATGCTTTTGAAGTGTGAAAAGCAGTGTGCTGAACATATTATGCTAGTAGATCTTGGC
CGAAATGATGTTGGGAAGGTGTCCAACCAGGTTTCAGTAAAGGTAGAGAATTTGATGAATATCGAACGATATTCTCATGT
CATGCACATCAGTCAACAGTAACTGGAGAGCTACGCGATGATCTTACGTGTTGGGATGCGCTACGAGCCGATTGCCAG
TTGGAACCGTTAGTGGCGCTCCMAAGKTGAGAGCAATGGAGTTGATTGATCAGCTAGAAGTGAGTATGCGTGGSCCGTAT
AGTGGTGGCTTTGGAGGGATTCTCTTTCGCGGCGACATGGACATTGCACTGGCTCTTCGCACTATCGTCTTCCCACCCG
ATCTCGGTTTGATACCATGTACTCGTACACAGACAGTAAGTCCCAGCAGGAGTGGGTGGCTCACCTCCAGGCCGGAGCTG
GCATAGTTGCTGATAGCAAACCCGATGACGAGCACCAAGAGTGTATAAACAAGGCTGCAGGTGTTGCTCGTGCCATTGAC
CTTGTGTAATCTACATTTCTTGAAGACTAG

Sequenz cDNA-Fragment *ZmAsa2*:

TACCGCTGCCTCGTCAAGGAGGACGAACGCGAGGCGCCAGCTTTCTCTTCGAGTCTGTTGAGCAGGGGTCCGAGGGCAC
CAATGTGGGGAGGTACAGCGTGGTTGGGGCGCAGCCTGCTATGGAGGTGCTGGCCAAGGCTAACCATGTGACGGTCATGG
ACCATGAGATGAAGTCGAGGAGGAGCACTTCTGTCCTGATCCATGAGGATCCCAGGACAATCATGGAGCAGTGGAAC
CCGAGATTGCTGACAGCCTCCCTGATGCATTTTGTGGAGGATGGGTTGGATTCTTCTCATATGATACAGTGCCTTATGT
TGAAACAAAGAAGCTTCTTTTCAGTAAGGCACCACATGATGATAGGAACCTTCTGATATTCATTTAGGCCTCTATAGT
ACGTGATGTTGTTGATCATGTTGAAAAGAAAACACATGTTATTCATTGGGTGAGGACAGACTGCTATCGTTCTGTTGAT
GAAGCATATGAAGATGGAAGAAATCGGCTTGAAGCTTTGTTATCAAGATTACATTGCCTCAATGTCCCAACACTTCTTC
TGGTTCTATAAACTCAATGTTGAAAACCTTTGGCCCAGTAATGCAAAAATCAACGATGTCAAGCGAAGAATATAAAAATA
TCGTTGTCCAAGCTAAAGAACACATCTTGGCCGGTGACATTTTCCAAGTTGTTTAAAGCCAGCGTTTTGAGAGACGGACA
TTCGCCGACCCCTTTGAAATCTATCGTGCATTGCGCATCGTAAATCCTAGTCCATATATGGCCTATCTACAGGCACGAGG
TTGTATTCTCGTGGCATCGAGTCTGAAATCTTACCCGGGTACAAAAGAGGACAATAATCAATCGTCCGCTTGTGGAA
CCATAAGAAGAGGCAAAACAAAAGCAGAAGACAAAACCTTAGAACAAATGCTTTTGAAGTGTGAAAAGCAGTGTGCTGAA
CATATTATGCTAGTAGATCTTGGCCGAAATGATGTTGGGAAGGTGTCCAACCAGGTTTCAGTAAAGGTAGAGAATTTGAT
GAATATCGAACGATATTCTCATGTCATGCACATCAGCTCAACAGTAACTGGAGAGCTACGCGATGATCTTACGTGTTGGG
ATGCGCTACGAGCCGATTGCCAGTTGGAACCGTTAGTGGCGCTCCMAAGKTGAGAGCAATGGAGTTGATTGATCAGCTA
GAAGTGAGTATGCGTGGSCCGTATAGTGGTGGCTTTGGAGGGATTTCTCTTTCGCGGCGACATGGACATTGCACCTGGCTCT
TCGCACTATCGTCTTCCCACCCGATCTCGGTTTGATACCATGTACTCGTACACAGACAGTAAGTCCCAGCAGGAGTGGG
TGCTCACCTCCAGGCCGGAGCTGGCATAGTTGCTGATAGCAAACCCGATGACGAGCACCAAGAGTGTATAAACAAGGCT
GCAGGTGTTGCTCGTGCCATTGACCTTGTGCTGAATCTACATTTCTTGAAGACTAG

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Alfons Gierl für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Ebenso möchte ich Frau Dr. Monika Frey für ihre große Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Hilfestellungen, viele konstruktive Vorschläge und die Möglichkeit bedanken, jederzeit mit ihr die Arbeit zu diskutieren.

Großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen im Labor: Meinen Laborbanknachbarn Richard Münch, Uta von Rad, Uli Genschel, Karin Huber und vor allem Annette Martin, mit der ich das letzte Jahr an einer Laborbank verbringen durfte und die nicht nur fachlich immer eine große Hilfe war! Bei Woong June Park möchte ich mich bedanken für seine große Hilfsbereitschaft und seine Einführung in die „Wurzelwelt“, bei Regina Hüttl für die vielen Sequenzierungen und den TSB-Antikörper. Dem „Rest“ aus dem Labor, Oksana Kortés, Sebastian Grün, Erich Glawischnig, Verena Kriechbaumer, Thilo Fischer und Rafal Jonczyk möchte ich für die gute Stimmung im Labor danken.

Auch allen anderen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die guten fachlichen und auch manchmal fachfreien Gespräche danken, vor allem Christine Schäfer (für die viele schöne Zeit), Gerti Spielbauer, Sabine Mehrl, Uli Genschel, Ramon Torres, Peter Dobos und Hedi Kellner.

Meinen Praktikanten möchte ich auch danken. Oliver Rossmann für die erfolgreiche Klonierung des Expressionskonstruktes und Peter Weber für alle Tips und Tricks in Bezug auf Photoshop, Fotografieren, Mikroskopieren und für seine geduldige Mithilfe bei Computerproblemen.

Auch bei Jürgen Schmitz und dem MPI für Züchtungsforschung in Köln möchte ich mich für die Einführung in die *in situ*-Hybridisierungen bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem Mann Elmar und bei meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihren Rat, ihre Hilfe und ihre Geduld bedanken.

Lebenslauf

Name: Karolin Schmäzlin, geb. Stahl

Geburtstag: 25.07.1974

Geburtsort: Offenbach am Main

Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1980-1984: Grundschule in München

1984-1993: Ludwigsgymnasium München, Abitur

1993-1998: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München; Diplom

1999-2002: Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Genetik der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr. Alfons Gierl