

**Charakterisierung der Histonacetyltransferase  
GCN5 und des Adaptorproteins Ada2 in  
*Zea mays* L. und *Arabidopsis thaliana* L.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Marcus Riehl**

aus Schwalmstadt

Köln 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Francesco Salamini angefertigt.

Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. R. D. Thompson

Prof. Dr. M. Hülskamp

Tag der Disputation: 6. Mai 2002

“Hoffnung ist die Vorfriede auf den nächsten Tag.“

unbekannter Verfasser

für

**Kerstin**

<b>Inhaltsangabe</b>	1
<b>1. Einleitung</b>	6
1.1. Transkriptionelle Coaktivatoren	6
1.2. Histon-Acetylierung	8
1.3. Die Transkriptions-Coaktivatoren <i>Ada2</i> und <i>GCN5</i>	11
1.4. Die GCN5-verwandte N-Acetyltransferasen – Superfamilie (GNAT)	13
1.5. Die Histonacetyltransferase GCN5	13
1.5.1. Die Histonacetyltransferase- (HAT) Domäne	15
1.5.2. Die Bromodomäne	15
1.6. Das transkriptionelle Adaptorprotein <i>Ada2</i>	16
1.7. Regulation der Genexpression im Maisendosperm durch den Transkriptionsfaktor <i>Opaque-2</i>	18
1.8. Die Funktion der sauren Aktivierungsdomäne	19
1.9. Insertionsmutagenese und Reverse Genetik	21
1.10. Ziele der Arbeit	22
<b>2. Material</b>	23
2.1. Abkürzungen	23
2.2. Pflanzenmaterial	25
2.3. Bakterien und Hefestämme	25
2.4. Vektoren	26
2.5. Chemikalien und Enzyme	26
2.6. Puffer und Lösungen	27
2.7. Nährmedien	28
2.8. Verwendete Kits	30
2.9. Verwendete Primer	30
2.10. Radioisotope	31
<b>3. Methoden</b>	32
3.1. Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial	32
3.2. Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	32
3.3. Isolierung von DNA aus $\lambda$ -Bakteriophagen	32

3.4. DNA Isolierung aus Hefe	33
3.5. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	33
3.6. Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA	33
3.7. DNA und RNA Konzentrationsbestimmung	34
3.8. Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel	34
3.9. DNA Extraktion aus Agarosegelen	35
3.10. Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien	35
3.11. Transformation von Bakterien	35
3.11.1. Chemische Transformation (CaCl <sub>2</sub> – Methode)	35
3.11.2. Elektroporation	35
3.12. Amplifikation von DNA mittels PCR (polymerase chain reaction)	36
3.13. 5' RACE (Rapid Amplifying of cDNA Ends)	36
3.14. Durchsuchung einer genomischen Phagen-DNA-Bank (Plaquehybridisierung)	37
3.15. "Primer Extension"-Analyse	37
3.16. Sequenzierung von ssDNA	37
3.17. DNA Transfer auf Hybond Filter (Southern Blot)	38
3.18. RNA Transfer auf Hybond Filter (Northern Blot)	38
3.19. "Stripping" der Membranen zur Wiederverwendung	39
3.20. Markierung von Nukleinsäuren mit Radioisotopen	39
3.21. Hefe Transformationen	39
3.21.1. Hefe Transformation für das Two-Hybrid System	39
3.21.2. Hefe Transformation mit hoher Effizienz	40
3.22. LacZ – Test	40
3.23. Two – Hybrid – System	40
3.24. Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E.coli</i>	41
3.25. Auftrennung von Proteinen	42
3.25.1. Auftrennung von Proteinen durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)	42
3.25.2. Auftrennung von Proteinen durch Acid-Urea-Triton (AUT) Polyacrylamidgelelektrophorese	42
3.26. Proteinfärbungen	43
3.26.1. Coomassie Brilliant Blue – Färbung	43
3.26.2. Ponceau – S – Färbung	43
3.27. Protein Transfer auf Nitrozellulose (Western Blot)	43
3.27.1. Tank – Elektroblot von Proteinen	43
3.27.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Antikörpern	44
3.27.3. Nachweis von Proteinen mit dem ECL Immunodetektionsverfahren	44
3.28. <i>In vitro</i> GST Pull-Down Assay	44

3.29. Isolierung von Nucleosomen aus Mais-Schößlingen	45
3.30. Isolierung von Histonen aus Nucleosomen	45
3.31. <i>In vitro</i> Acetylierung von Histonen	46
3.32. Fluorographie – Nachweis radioaktiv markierter Proteine	46
3.33. Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten	46
3.33.1. Isolierung von Protoplasten aus <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. SR1	46
3.33.2. Isolierung von Protoplasten aus <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. BY2	47
3.33.3. Transfektion von Tabak-Protoplasten für GFP-Fusionen	47
3.33.4. Transfektion von Tabak-Protoplasten für GUS-Fusionen	47
3.33.5. Fluorometrische $\beta$ –Glukuronidaseaktivitätsbestimmung	48
3.34. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
<b>4. Ergebnisse</b>	49
4.1. Charakterisierung von <i>ZmGCN5</i>	49
4.1.1. Northern Blot Analyse von <i>ZmGCN5</i>	49
4.1.2. Untersuchung der Expression von <i>ZmGCN5</i> mittels Einzelzellen-PCR verschiedener Zelltypen	50
4.1.3. Überprüfung der Histonacetylierung von Nucleosomen und Histonen durch <i>ZmGCN5</i>	51
4.1.4. Identifizierung der Lysin-Reste in Histon H4, die durch <i>ZmGCN5</i> acetyliert werden	53
4.1.5. <i>ZmGCN5</i> kommt auch in Mais in Komplexen vor	55
4.1.6. In Nuclei ist <i>ZmGCN5</i> vorhanden, nicht aber HAT-B	56
4.1.7. Kernlokalisierung von <i>ZmGCN5</i>	57
4.2. Charakterisierung von <i>ZmAda2</i>	58
4.2.1. Northern Blot Analyse von <i>ZmAda2</i>	58
4.2.2. Isolierung eines <i>Ada2</i> -homologen Transkripts aus Mais Pollen	59
4.2.2.1. Screening einer cDNA Bank aus Mais Pollen	60
4.2.2.2. Identifizierung des N-Terminus des <i>ZmAda2</i> -Pollen Transkripts	61
4.2.3. Kernlokalisierung von <i>ZmAda2</i> und <i>ZmAda2</i> -Pollen	62
4.2.4. Charakterisierung von <i>ZmAda2</i> -Proteinen in verschiedenen Geweben	63
4.2.5. Einfluß von <i>ZmGCN5</i> , <i>ZmAda2</i> und <i>ZmAda2</i> -Pollen auf die Transaktivierung des <i>B32</i> -Promotors mit <i>O2</i>	64
4.2.6. Interaktionsstudie <i>ZmGCN5</i> – <i>ZmAda2</i> und <i>ZmGCN5</i> – <i>ZmAda2</i> -Pollen	66
4.2.7. <i>In vitro</i> Interaktion zwischen <i>ZmGCN5</i> und <i>ZmAda2</i>	68
4.2.8. Southern Blot Analyse von <i>ZmAda2</i>	70

4.2.9. Isolierung verschiedener genomischer <i>ZmAda2</i> Klone zur Identifizierung der Sequenzen	71
4.2.10. Genomische Lokalisation von <i>ZmAda2</i>	72
4.2.11. Untersuchung der Expression von <i>ZmAda2</i> mittels Einzelzellen-PCR verschiedener Zelltypen	74
4.3. Isolierung und Charakterisierung von <i>AtHAT</i>	76
4.3.1. Expression der <i>AtHAT</i> mRNA in verschiedenen Geweben	77
4.3.2. Genomische Organisation des <i>AtHAT</i> Lokus	78
4.3.3. HAT-Aktivität von <i>AtHAT</i> und <i>AtHAT1</i> im Vergleich zu <i>ZmGCN5</i>	78
4.4. Isolierung und Charakterisierung von <i>AtAda2</i>	80
4.4.1. Northern Blot Analyse von <i>AtAda2b</i>	81
4.4.2. Southern Blot Analyse von <i>AtAda2</i>	82
4.5. Charakterisierung transgener Arabidopsis Pflanzen	84
4.5.1. Screening nach T-DNA Insertionslinien von <i>AtGCN5</i> und <i>AtAda2</i>	84
4.5.2. Analyse von <i>AtGCN5</i> T-DNA Arabidopsislinien	85
4.5.3. PCR Analyse der <i>AtGCN5</i> T-DNA Insertionslinien	87
4.5.4. Western Blot Analyse der <i>AtGCN5</i> T-DNA Insertionslinien	89
4.5.5. Analyse der <i>AtAda2a</i> T-DNA Arabidopsislinien	90
4.5.6. PCR Analyse der <i>AtAda2a</i> T-DNA Insertionslinien	92
<b>5. Diskussion</b>	<b>93</b>
5.1. Charakterisierung der HAT-Aktivität von <i>ZmGCN5</i>	94
5.2. Vorkommen von <i>ZmGCN5</i> in Proteinkomplexen	95
5.3. Isolierung von <i>ZmAda2</i> -Pollen	95
5.4. Charakterisierung der Genaktivierung von <i>ZmGCN5</i> , <i>ZmAda2</i> und <i>ZmAda2</i> -Pollen	98
5.5. Interaktionsstudien zwischen <i>ZmGCN5</i> und <i>ZmAda2</i> / <i>ZmAda2</i> -Pollen	99
5.6. Isolierung von <i>AtGCN5</i>	100
5.7. Vergleich der HAT-Aktivität von <i>AtGCN5</i> , <i>AtHAT</i> und <i>AtHAT1</i>	101
5.8. Isolierung von <i>AtAda2a</i> und <i>AtAda2b</i>	101
5.9. Charakterisierung von <i>AtAda2a</i> und <i>AtAda2b</i>	102
5.10. Analyse transgener <i>AtGCN5</i> und <i>AtAda2</i> Pflanzen	103
5.11. Charakterisierung der <i>AtGCN5</i> T-DNA Pflanzen	104
5.12. Charakterisierung der <i>AtAda2a</i> T-DNA Pflanzen	105
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>106</b>



---

<b>7. Literaturverzeichnis</b>	108
<b>8. Anhang</b>	120
8.1 Aminosäuresequenz von ZmAda2-Pollen	120
Danksagung	121
Erklärung	122
Veröffentlichungen	123
Abstract	124
Lebenslauf	125

# 1. Einleitung

## 1.1. Transkriptionelle Coaktivatoren

Ein Gen ist ein DNA-Abschnitt, der die Information zur Herstellung eines Proteins trägt. Ein Gen besteht aus einem regulatorischen Bereich (Promotor) und einem kodierenden Bereich. Damit aus dem Gen allerdings ein Protein wird, muß die DNA zuvor in RNA umgeschrieben werden. Die RNA-Synthese wird als Transkription bezeichnet und von speziellen Enzymen, den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, durchgeführt. Die Startstelle für die Transkription ist mit dem Promotor exakt definiert.

Zur geordneten Durchführung der Transkription reichen die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen allerdings nicht aus. Zusätzliche Proteine, die sogenannten Transkriptionsfaktoren, sind hierzu unerlässlich. Sie binden mit hoher Spezifität an die jeweils passenden Stellen im Promotor. Neben den Transkriptionsfaktoren ist eine zweite Gruppe von Proteinen nötig, die als Adaptoren oder Coaktivatoren bezeichnet werden (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990; Pugh and Tjian, 1990). Diese Cofaktoren erleichtern durch Unterstützung der Interaktion zwischen Transkriptionsaktivatoren und der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie, die Transkription (Lewin, 1990; Ptashne and Gann, 1990; Roeder, 1991; Gill and Tjian, 1992). Der genaue Wirkungsmechanismus kann hierbei innerhalb der Gruppe dieser Faktoren variieren.

Die ersten Coaktivatoren wurden als TATA Box Bindeproteine (TBP)-assoziiierende Faktoren (TAF's) identifiziert. Diese TAF's werden für die *in vitro* Transkriptions-Aktivierung benötigt (Dymlacht et al., 1991). Andere Cofaktoren (z.B. das CREB Bindeprotein-CBP) interagieren mit spezifischen Aktivatoren und potenzieren somit die Aktivierung *in vivo* (Chrivia et al., 1993; Kwok et al., 1994).

Die meisten Transkriptions-Coaktivatoren existieren als große Komplexe mit einer Größe bis zu mehreren tausend Dalton und spielen eine Rolle in der Chromatinorganisation. Coaktivatoren können in zwei Gruppen aufgeteilt werden.

- Coaktivatoren, die mit Komponenten der RNA Polymerase II Transkriptionsmaschinerie interagieren oder selber ein Teil dieser Maschinerie darstellen.
- Chromatin-assoziierte Coaktivatoren

Die Verpackung der DNA als Chromatin spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation. Etwa 146 Basenpaare werden in  $1\frac{3}{4}$  Windungen um das Histon-Oktamer (mit jeweils zwei zentral gelegenen Molekülen H3 und H4 und den flankierenden Dimeren der Histone H2A und H2B) gewickelt (Arents et al., 1991). Diese "Kern-Histone" bestehen aus einer hoch strukturierten C-terminalen Domäne, die für Histon-Histon Interaktionen sowie die Formierung der Nucleosomen zuständig ist und einer geladenen, jedoch strukturell unstrukturierten N-terminalen Schwanz-Domäne. Diese N-terminalen Enden können verschiedenartig modifiziert werden und dienen der DNA-Histon und Histon-Histon Interaktion im Nucleosom, sowie der Bindung von nicht-Histon Proteinen (Luger and Richmond, 1998; Hansen et al., 1998). Linkerhistone (z.B. Histon H1) und weitere Chromatin-assoziierte Proteine (z.B. Mitglieder der high-mobility group (HMG) und silent information regulator (SIR) – Proteine) sorgen für eine weitere Verpackung der DNA vom Zustand des aktiv transkribierten Euchromatins in den Zustand des stark kondensierten und somit inaktiven Heterochromatins (Hecht et al., 1995; Grunstein, 1998). Euchromatin wird während der Interphase des Zellzyklus entpackt und kodiert für die meisten, zellulären Proteine. Heterochromatin bleibt auch während der Interphase verpackt, ist nicht aktiv und enthält viele repetitive Elemente. Euchromatin kann an allen Lysinen (Lys) des Histons H4 (Lys5, Lys8, Lys12, Lys16) acetyliert werden, wohingegen das bei Heterochromatin nicht vorkommt (Clarke et al., 1993; O'Neill and Turner, 1995).

Innerhalb der Chromatin-assoziierten Coaktivatoren kann man zwei weitere Gruppen unterscheiden:

### **1. ATP abhängige Nucleosomen-modifizierende Komplexe**

Zu dieser Gruppe zählen Komplexe, die die Energie aus der Hydrolyse von ATP dazu nutzen, die Chromatinstrukturen zu reorganisieren, indem sie die Histon-DNA Kontakte destabilisieren und somit lösen (Kingston and Narlikar, 1999; Kornberg and Lorch, 1999). Ein typisches Beispiel dieser Art sind die SWI/SNF Komplexe (mating type switching/sucrose non fermenting), die zuerst in Hefe identifiziert wurden (Peterson and Tamkun, 1995).

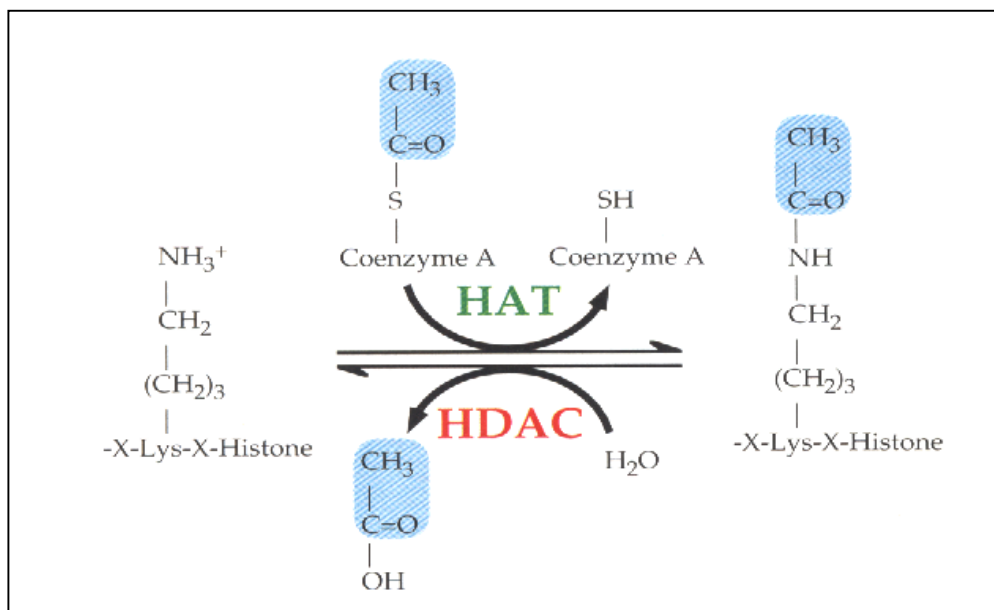
### **2. Enzyme, die die N-terminalen Enden der Histone modifizieren**

Im Nucleosom können 28 Positionen der N-terminalen Lysine reversibel modifiziert werden. Zur Gruppe der Enzyme, die diese Positionen modifizieren zählen die Histon-acetyltransferasen, -deacetylasen, -kinasen, -phosphatasen und -methyltransferasen. Weitere Modifikationsmöglichkeiten sind Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung (Bradbury, 1992).

## 1.2. Histon-Acetylierung

Viele transkriptionelle Coaktivatoren sind in großen Proteinkomplexen organisiert, bei denen Untereinheiten Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität oder Histondeacetylase (HDAC)-Aktivität aufweisen. Die erste Verbindung von transkriptionellen Coaktivatoren mit HAT-Aktivität wurde durch die Isolierung des HAT A Proteins p55 aus dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila* (Brownell et al., 1996) hergestellt. Dieses p55 zeigt eine hohe Homologie zum Transkriptions-Coaktivator *GCN5* aus Hefe (Georgakopoulos and Thireos, 1992). Inzwischen sind zahlreiche weitere Coaktivatoren mit HAT-Aktivität isoliert und charakterisiert worden. Hierzu zählen die beiden ähnlichen Proteine CREB-Bindeprotein (CBP) und p300 (Goodman and Smolik, 2000), die Coaktivatorfamilie p160 (SRC-1, TIF2 und pCIP) (Glass and Rosenfeld, 2000) und die TFIID Untereinheit TAF250 (Mizzen et al., 1996).

Bei der Histonacetylierung handelt es sich um einen reversiblen Vorgang. Histondeacetylasen führen die gegenläufige Reaktion zu den Histonacetyltransferasen durch. Kernhistone werden im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen nicht N-terminal an der  $\alpha$ -NH $_3^+$  Gruppe acetyliert, sondern an der  $\epsilon$ -NH $_3^+$  Gruppe der Lysin Reste im N-Terminus (Abb. 1.2.1.).



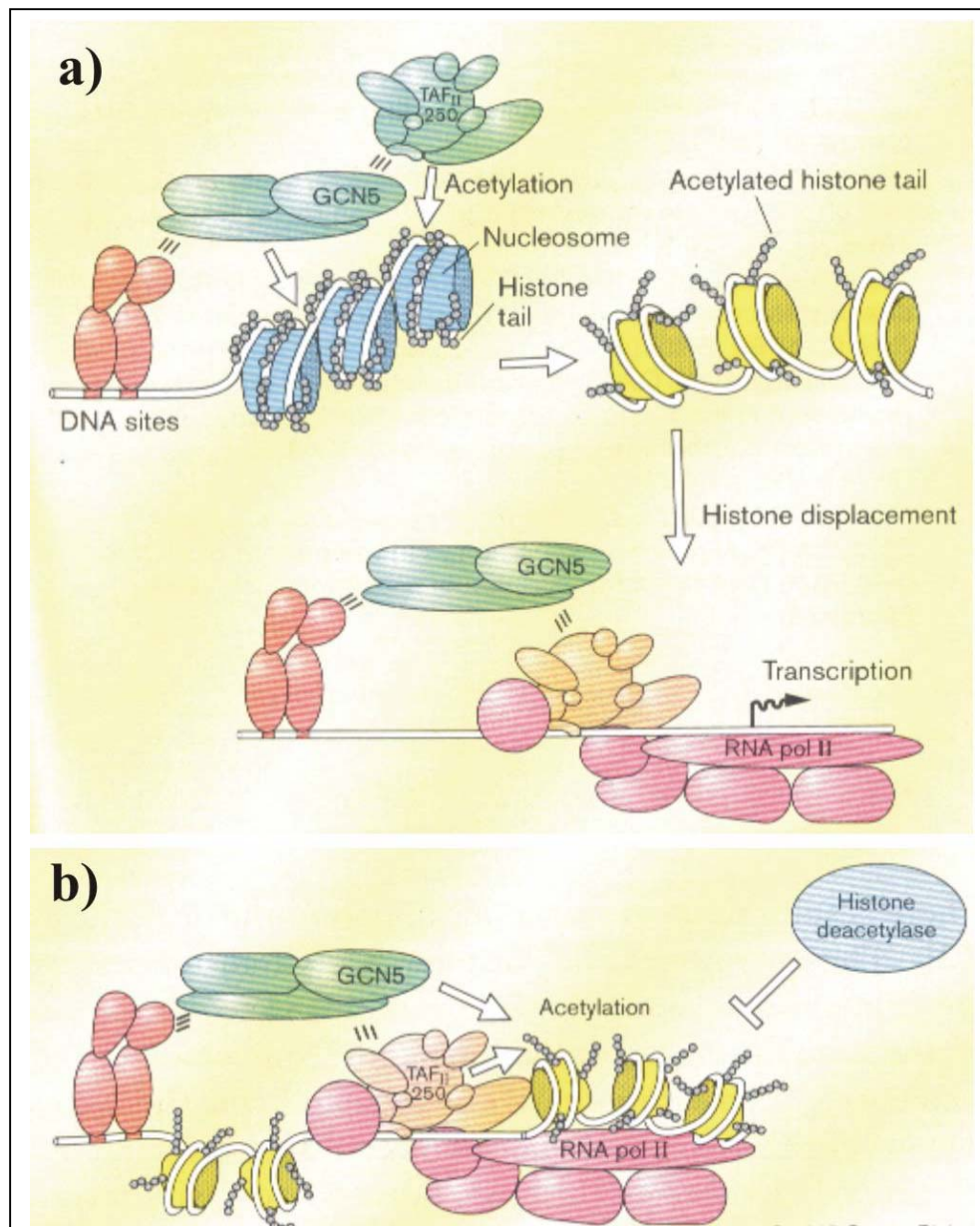
**Abb. 1.2.1. : Das Zusammenspiel von Histon Acetyltransferasen (HAT) und Histon Deacetylasen (HDAC).** Jeweils die  $\epsilon$ -NH $_3^+$  Gruppe der Lysin Reste im N-Terminus der Kernhistone wird acetyliert / deacetyliert. Nach (Kuo and Allis, 1998).

Die Acetylierung der N-terminalen Regionen der Histone verändert die Ladung und hat somit einen Einfluß auf die transkriptionelle Regulation (Wade et al., 1997) und die Chromatinorganisation (Kaufman, 1996; Roth and Allis, 1996). Weiterhin wurde gezeigt, daß diese N-terminalen Regionen mit Repressorproteinen interagieren, bei der Positionierung von Nucleosomen mitwirken, für die Organisation von Proteinkomplexen verantwortlich sind -die eine Rolle im Chromatinsilencing spielen- (Roth et al., 1992; Hecht et al., 1995) und eine zentrale Rolle in der Kondensation von Chromosomen einnehmen (de la Barre et al., 2000).

Hyperacetylierte Histone interagieren bevorzugt mit transkriptionell aktiven Domänen, Hypoacetylierte Histone hingegen findet man an Stellen der DNA, wo Repressoren oder Silencer in die Transkription eingreifen. Aufgrund dieser und weiterer Daten wird der Acetylierung von Histonen eine Rolle in der Transkriptionsaktivierung zugesprochen (Bannister and Miska, 2000; Cheung et al., 2000; Kouzarides, 2000).

Histonacetyltransferasen (HAT's) können in zwei Gruppen (A und B) unterteilt werden (Brownell et al., 1996). HAT's vom Typ A kommen im Kern vor und acetylieren bevorzugt Histone in Nucleosomen, die mit der Transkriptions-Aktivierung in Zusammenhang stehen. Typ B HAT's kommen im Cytoplasma vor und acetylieren neu syntetisierte Histone vor der Chromatin Verpackung und während der DNA Replikation. Weiterhin wird eine Rolle der neu synthetisierten Histonen beim Transport vom Cytoplasma in den Kern diskutiert, die dort zur Verpackung der replizierten DNA benötigt werden (Ruiz-Carrillo et al., 1975; Allis et al., 1985).

Für das Zusammenspiel von Histon- Acetylasen und Deacetylasen werden verschiedene Modelle diskutiert (Abb. 1.2.2.).



**Abb. 1.2.2. : Modelle der Funktion von Coaktivatoren im Zusammenspiel mit Acetylierung und Deacetylierung.** In Modell a) wird davon ausgegangen, daß Histon-Acetylierung und Deacetylierung nacheinander ablaufen, in Modell b) denkt man an eine kontinuierliche Wechselwirkung zwischen Acetylierung und Deacetylierung. Verändert nach (Wade et al., 1997).

Histonacetyltransferasen sind allerdings nicht nur in der Lage, Histone zu acetylieren. Inzwischen sind zahlreiche weitere Substrate identifiziert worden, unter anderem die transkriptionellen Aktivatoren E2F1 (Martinez-Balbas et al., 2000), p53 (Gu and Roeder, 1997), EKLF (Zhang and Bieker, 1998), GATA1 (Boyes et al., 1998; Hung et al., 1999), andere Coaktivatoren wie ACTR (Chen et al., 1999), basale Transkriptionsfaktoren wie

TFIIE $\beta$ , TFIIF (Imhof et al., 1997), strukturelle Proteine wie Tubulin (MacRae, 1997), Polyamine (Pollard et al., 1999) und die Importin- $\alpha$ -Familie, die in den nukleären Import involviert ist (Bannister et al., 2000).

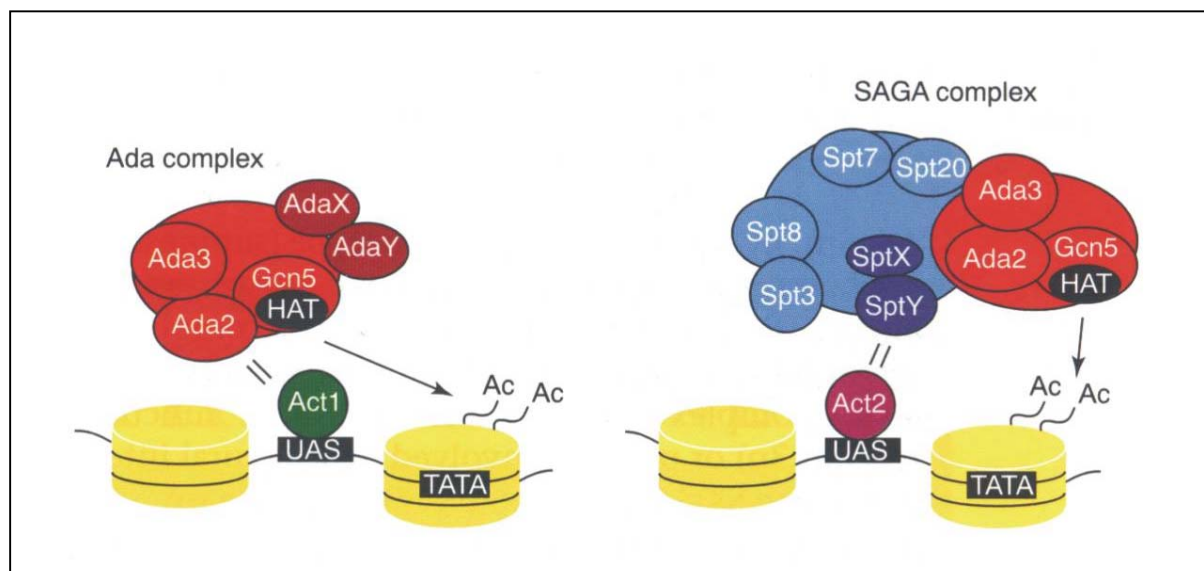
### 1.3. Die Transkriptions-Coaktivatoren *Ada2* und *GCN5*

Die Identifizierung dieser Transkriptionsmechanismen steht im Mittelpunkt der Forschung dieses Bereichs. Ein Aspekt der Untersuchungen ist die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen den Faktoren, die an die UAS (upstream activating sequence) binden und dem RNA-PolymeraseII Komplex (mit den TAF-Faktoren), der an die TATA-Box bindet. Zwischen diesen beiden Komplexen vermitteln Transkriptionsfaktoren.

Die Transkriptions-Aktivierung durch die RNA Polymerase II benötigt eine Vielzahl verschiedener Proteine und regulatorischer Elemente (Tjian and Maniatis, 1994). Die Faktoren der Transkriptionsmaschinerie erkennen den Kern Promotor mit der TATA-Box und den Initiationsstellen. Diese Komplexe beinhalten die RNA Polymerase II, sowie weitere Faktoren (TFIIA, TFIIB, TFIIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH), die für die Initiation und Elongation des Transkriptes zuständig sind (Zawel et al., 1993; Buratowski, 1994). Die Transkriptions-Aktivatoren binden an spezifische DNA-Sequenzen "upstream" des Kern Promotors (Ptashne, 1986; Goodrich et al., 1996) und erhöhen somit die Transkriptionsrate.

*GCN5* und *Ada2* wurden als Untereinheiten in mehreren Multiproteinkomplexen identifiziert. Die zwei am besten untersuchten Komplexe in Hefe weisen eine Größe von 0.8 (Ada) und 1.8 MDa (SAGA-*Spt*, *Ada*, *GCN5* Acetyltransferase) (Grant et al., 1997; Pollard and Peterson, 1997; Saleh et al., 1997) auf, in denen GCN5 jeweils HAT Aktivität zeigt (Abb. 1.3.). Der 1.8 MDa Komplex beinhaltet neben den Ada Proteinen (GCN5, Ada1, Ada2, Ada3 und Ada5) eine zweite Gruppe von Gen Produkten. Hierbei handelt es sich um Proteine der Spt Familie (Spt3, Spt7, Spt8 und Spt20) (Grant et al., 1997), die eine größere Rolle als *GCN5* und *Ada2* in der Transkriptions-Aktivierung spielen, sowie teilweise direkt mit den TATA Bindeproteinen interagieren (Eisenmann et al., 1992). Die Spt Proteine (in Hefe) wurden als Suppressoren eines Transkriptions-Initiations Defektes isoliert, die durch Promotor Insertion des Transposons Ty entstanden. Nach der Entdeckung, daß *Ada5* und *Spt20* identisch sind, wird angenommen, daß die Ada und Spt Proteine im gleichen physiologischen Umfeld funktionieren. Aufgrund dieser Untersuchungen wird daraus geschlossen, daß funktionell mit Hilfe dieses großen Komplexes die saure Aktivierungsdomäne (durch *Ada2*) mit den TATA Bindeproteinen (Spt's) verknüpft wird. Desweiteren werden durch die HAT Aktivität die Nucleosomen modifiziert, was zu einer

Stabilisierung der Bindung zwischen den Aktivatoren und den TATA-Bindeproteinen an der DNA-Matrize führt. Später konnte nachgewiesen werden, daß saure Aktivatoren tatsächlich mit einem aufgereinigten, nativen SAGA Komplex interagieren und daß an GAL4-VP16-gebundene Nucleosomen ein Ziel für die Acetylierung und eine Steigerung der Transkription mit Hilfe des SAGA Komplexes darstellen (Utley et al., 1998). Desweiteren konnten im SAGA Komplex eine Reihe von TATA Bindeprotein – assoziierenden Faktoren - TAF<sub>II</sub>'s (TAF<sub>II</sub>90, TAF<sub>II</sub>68/61, TAF<sub>II</sub>60, TAF<sub>II</sub>25/23 und TAF<sub>II</sub>20/17) identifiziert werden (Grant et al., 1998a). Diese Ergebnisse zeigen die Rolle verschiedener TAF<sub>II</sub> Proteine bei der Genregulation auf dem Stand der Chromatinmodifikation, die sich von der des TFIID Komplexes unterscheiden. Den anderen Komponenten des Komplexes konnte bis jetzt noch keine Funktion zugeordnet werden.



**Abb. 1.3. : Modelle des Ada- und SAGA Komplexes.** Im Gegensatz zu früheren Modellen konnte gezeigt werden, daß es sich bei Ada und SAGA um zwei unabhängig voneinander arbeitende Komplexe handelt. Verändert nach (Grant et al., 1998b).

Zusätzlich zu den bisher bekannten Ada und SAGA Komplexen konnten in Hefe noch zwei weitere HAT Komplexe (NuA3 und NuA4) identifiziert werden, die vor allem die Histone H3 und H4 acetylieren (Eberharter et al., 1998).

Weiterhin wurde festgestellt, daß der Ada2 / GCN5 Komplex mit den NOT Proteinen interagiert (Benson et al., 1998). Sie dienen als negative Transkriptions-Regulatoren verschiedener Gene, unter anderem von HIS3. Bei dem Versuch, Mutanten zu isolieren, die zu verstärkter Transkriptions-Aktivierung eines veränderten GCN4 Proteins (mit einer defekten Aktivierungsdomäne) führen, wurden die NOT Gene in Hefe isoliert (Collart and Struhl, 1993; Collart and Struhl, 1994).



## 1.4. Die GCN5-verwandte N-Acetyltransferasen – Superfamilie (GNAT)

Zu dieser Gruppe zählen über 140 Proteine, die den Transfer einer Acetylgruppe vom Acetyl Coenzym A zur  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Gruppe der Lysin-Reste im N-Terminus der Kernhistone katalysieren (Abb. 1.4.). Definiert ist die GNAT-Superfamilie durch die Anordnung der Sequenzmotive der HAT-Domäne (C,D,A,B) vom N-Terminus zum C-Terminus. Hierbei ist das C-Motiv nur in Mitgliedern dieser Superfamilie, nicht aber in anderen HAT Proteinen vorhanden.

HAT	Organismus	Transkriptions Funktion	in vivo HAT Aktivität	Histonspezifität	Komplex
Hat1	mehrere	keine (HAT-B)	ja	H4	Hefe HAT-B, HAT-A3
GCN5	mehrere	Coaktivator	ja	H3/H4	Hefe ADA, SAGA Mensch GCN5, STAGA
PCAF	mehrere	Coaktivator	ja	H3/H4	Mensch PCAF
Elp3	Hefe	Transkriptionselongation	ja	nicht bekannt	Elongator
Hpa2	Hefe	nicht bekannt	ja	H3/H4	

**Abb. 1.4. : Die wichtigsten Mitglieder der GNAT-Superfamilie.**

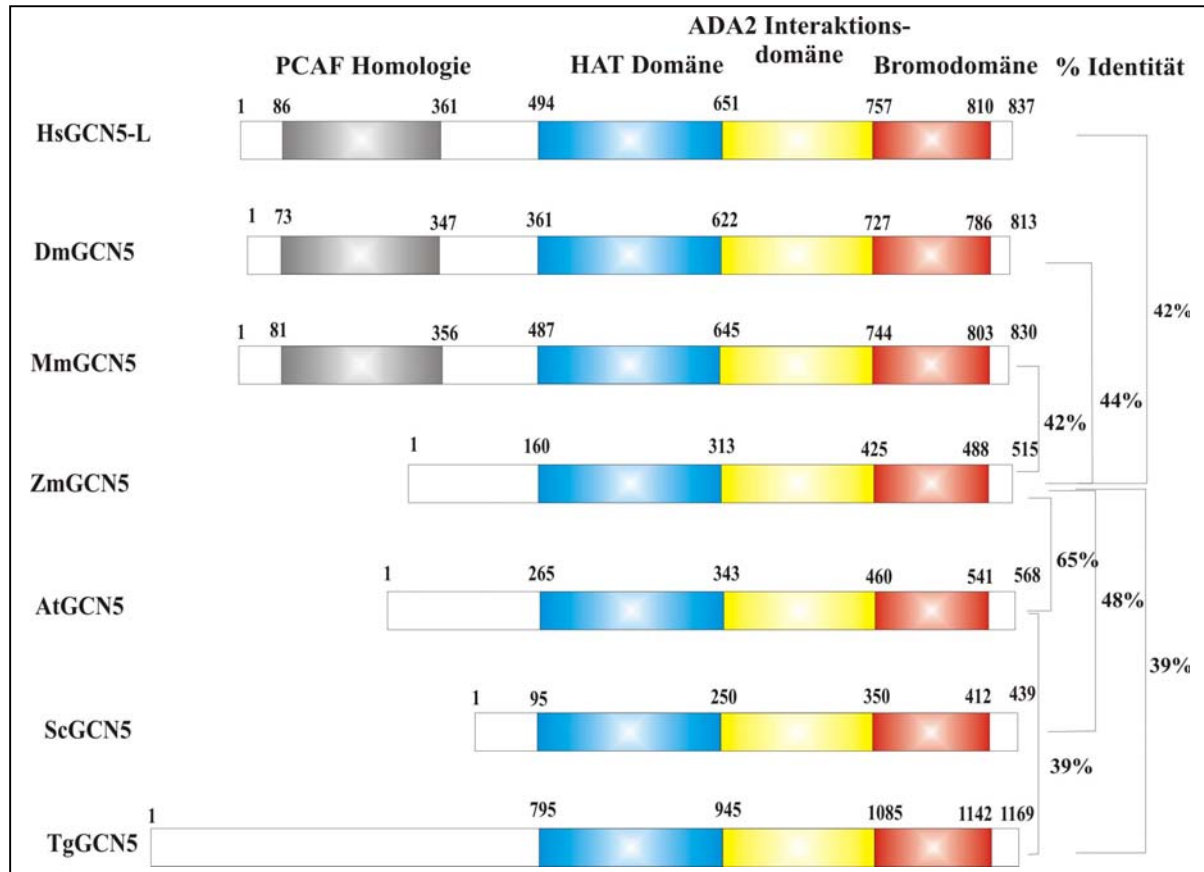
## 1.5. Die Histonacetyltransferase GCN5

Zu den am besten untersuchten Proteinen innerhalb der N-Acetyltransferasen zählt die Gruppe der GCN5 (general control nonderepressible-5)-verwandten Proteine.

Bei dem Versuch Proteine aus Hefe zu isolieren, die mit dem Aktivator GCN4 (Georgakopoulos and Thireos, 1992) oder der Aktivierungsdomäne VP16 des Herpes Simplex Virus (Marcus et al., 1994) interagieren, wurde GCN5, als Teil eines Proteinkomplexes, mit Hilfe eines genetischen "Screens" identifiziert (Berger et al., 1992; Georgakopoulos and Thireos, 1992). Eine Überexpression von VP16 in Hefe führte zur Hemmung des Wachstums und reduzierter transkriptioneller Aktivierung, was durch Mutationen in GCN5 (Berger et al., 1992) unterdrückt wurde.

Die Entdeckung, daß GCN5 Histon-Acetyl-Transferase (HAT) Aktivität besitzt (Brownell et al., 1996), führte zu der Annahme, daß zumindest ein Teil der Funktion dieses Komplexes die Acetylierung der N-Termini von Kernhistonen sei. Das führte zu dem Schluß, daß es somit zu einer Konformationsänderung der Chromatinstruktur und dadurch zur Transkription kommen

könnte (Lee et al., 1993; Garcia-Ramirez et al., 1995). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die *in vivo* HAT Aktivität von GCN5 für die Transkriptions Aktivierung durch diesen Komplexes benötigt wird (Kuo et al., 1998; Wang et al., 1998) und daß die Aktivität mit der Acetylierung des Chromatins im Promotorbereich des Gens korreliert (Kuo and Allis, 1998).



**Abb. 1.5. : Vergleich der Domänenstruktur innerhalb der GCN5 Familie.** Alle Familienmitglieder besitzen eine HAT-Domäne, eine Ada2-Interaktionsdomäne und eine Bromodomäne. Die GCN5 Proteine von Mensch, Drosophila und Maus weisen zusätzlich eine PCAF Homologie auf. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Identitäten im Vergleich zu ZmGCN5 auf Aminosäureebene angegeben. Acc. Nr.: HsGCN5-L = AF029777, DmGCN5 = AF029776, MmGCN5 = AF254441, ZmGCN5 = AJ428540, AtGCN5 = AF338768, ScGCN5 = Q03330, TgGCN5 = AF197953.

Drei Domänen (HAT-Domäne, Ada2 Interaktionsdomäne und Bromodomäne) liegen in allen Mitgliedern der GCN5 Familie sehr hoch konserviert vor (Abb. 1.5.). Im menschlichen GCN5, Mäuse GCN5, wie auch im Drosophila GCN5 kann noch eine zusätzliche PCAF (p300/CBP assoziierender Faktor) Homologie gezeigt werden (Smith et al., 1998). PCAF zeigt wie auch GCN5 HAT Aktivität (Ogryzko et al., 1996). Die mRNA von GCN5 aus Mäusen und dem Menschen wird alternativ “gespliced“, so daß hier jeweils zwei Formen

auftreten, von denen die kürzere nur freie Histone acetylieren kann, die längere jedoch auch in der Lage ist, Histone im Nucleosom zu acetylieren (Yang et al., 1996; Xu et al., 1998). Die längeren N-terminalen Domänen der GCN5 Proteine von Mais, Arabidopsis und Taxoplasma zeigen keine Homologie zum PCAF-Protein.

### 1.5.1. Die Histonacetyltransferase- (HAT) Domäne

Die HAT Domäne von *GCN5* zeigt die charakteristischen Sequenzmotive (C,D,A,B) der GNAT-Superfamilie. *GCN5* ist ausschließlich im Nucleosom in der Lage, die Histone H2B, H3 und H4 *in vitro* zu acetylieren (Yang et al., 1996; Grant et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist in Bakterien überproduziertes *GCN5*, sowie ein aufgereinigter Komplex aus *GCN5*, *Ada2* und *Ada3*, nicht in der Lage, ein Substrat aus Nucleosomen zu acetylieren, sondern nur freie Kernhistone (Grant et al., 1997). Das weist darauf hin, daß die HAT Aktivität von *GCN5 in vivo* durch andere Komponenten des Komplexes reguliert wird (Syntichaki and Thireos, 1998). Neueren Untersuchungen nach kann *GCN5* unter entsprechenden Salzbedingungen Nucleosomen acetylieren (Tse et al., 1998), was allerdings später von anderen Gruppen nicht bestätigt werden konnte (Balasubramanian et al., 2001).

Neueste Ergebnisse zeigen, daß der N-Terminus der HAT-Domäne mit Nucleosomen interagiert (Sternier et al., 2002). Die interagierende Region konnte auf zwei  $\alpha$ -Helices, ein  $\beta$ -Faltblatt und die konservierten Aminosäurereste KE-YD eingegrenzt werden. Ob diese Interaktion direkt, oder über ein weiteres Protein (wie z.B. TafII68) funktioniert, konnte noch nicht geklärt werden.

Weiterhin können in *GCN5* eine *Ada2* Interaktionsdomäne, die für die Interaktion mit *Ada2* notwendig ist, sowie eine Bromodomäne identifiziert werden.

### 1.5.2. Die Bromodomäne

Die erste Bromodomäne wurde im Brahma Protein von *Drosophila melanogaster* identifiziert (Tamkun et al., 1992). Bis heute wurden mehr als 40 Proteine mit einer Bromodomäne isoliert. Das Vorhandensein einer Bromodomäne weist in den meisten Fällen auf eine Funktion des Proteins in der Regulation der Chromatinstruktur hin (Kouzarides, 2000). Hierbei handelt es sich um eine ~110 Aminosäuren lange Domäne, die vier durch Schleifen getrennte Helices (Z-A-B-C) und eine hydrophobe Tasche aufweist. Zur Identifizierung der Funktion der Bromodomäne wurden verschiedene Deletionsstudien durchgeführt, die allerdings zu keinen großen Funktionsänderungen des Proteins führten (Marcus et al., 1994;

Elfring et al., 1998; Sterner et al., 1999). Da Bromodomänenproteine meist in Komplexen vorkommen, wurde von einer Rolle in der Protein-Protein Interaktion ausgegangen. Später wurde gezeigt, daß die hydrophobe Tasche spezifisch mit einem acetylierten Lysin eines N-terminalen Histon H4 Peptides interagiert (Dhalluin et al., 1999). Während die meisten Proteine mit einer Bromodomäne nur ein solches Motiv aufweisen, trägt die TFIID Untereinheit TAF250 zwei tandemartig hintereinander angeordnete Bromodomänen. Diese Domänen erkennen gleichzeitig zwei voneinander entfernt liegende acetylierte Lysine des Histons H4. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Bromodomäne zuerst die acetylierten Histonden erkennt und bindet um weitere Acetylierungen zu ermöglichen (Jacobson et al., 2000).

## 1.6. Das transkriptionelle Adaptorprotein Ada2

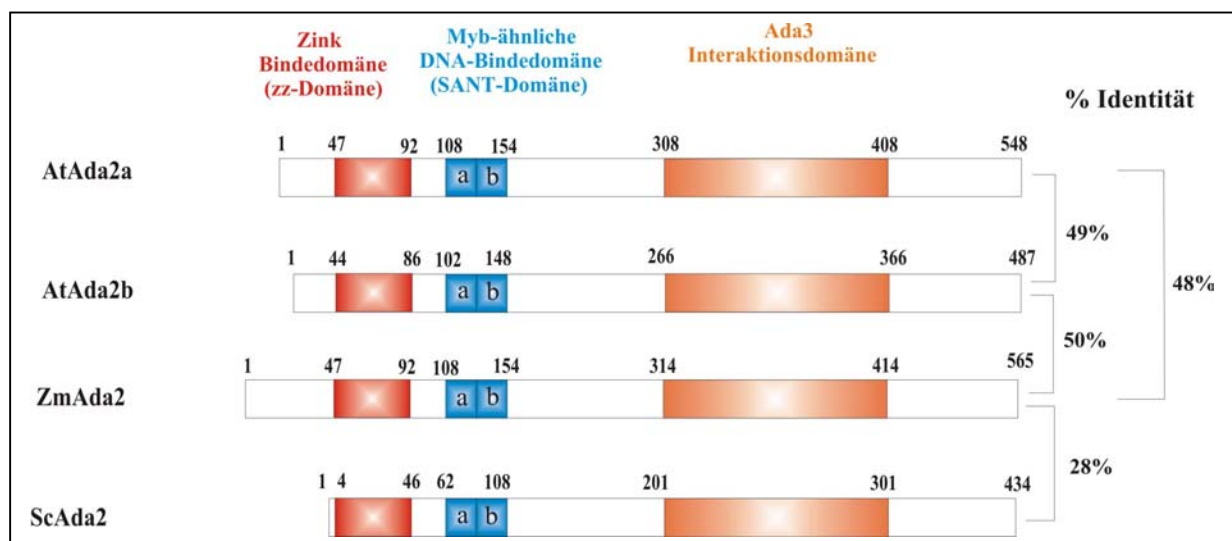
Ada2 (altered/defective activation) wurde wie auch GCN5 in einem genetischen "Screen" isoliert, bei dem nach Interaktionspartner des Aktivators GCN4 (Georgakopoulos and Thireos, 1992) oder der Aktivierungsdomäne VP16 des Herpes Simplex Virus (Marcus et al., 1994) gesucht wurde. Die Interaktion zwischen GCN4 und Ada2, Ada3 und dem Holoenzym der RNA PolymeraseII beruht auf sieben Abschnitten hydrophober Aminosäurereste in der Aktivierungsdomäne von GCN4 (Drysdale et al., 1998). Gleichzeitig mit Ada2 (Berger et al., 1992) wurden Ada3 (Pina et al., 1993), Ada4 (Marcus et al., 1994) und Ada5 (Marcus et al., 1996; Roberts and Winston, 1996) isoliert. Es stellte sich heraus, daß es sich bei Ada4 und GCN5 ebenso um das gleiche Protein handelt wie bei Ada5 und Spt20 (Supressor of transcription). Hefen, bei denen Ada2 deletiert wurde, zeigen ein verlangsamtes Wachstum und eine Resistenz gegenüber GAL4-VP16, was darauf hinweist, daß Ada2 nicht essentiell ist (Berger et al., 1992). Genetische und biochemische Untersuchungen zeigten anschließend, daß GCN5 und Ada2 *in vitro* und *in vivo* miteinander interagieren und daß diese Faktoren mit Hilfe weiterer Aktivatoren (mit sauren Domänen) bei der Transkriptions-Aktivierung vermitteln (Georgakopoulos and Thireos, 1992; Marcus et al., 1994; Horiuchi et al., 1995; Candau and Berger, 1996). Es wird angenommen, daß die Faktoren dieses Komplexes durch eine physikalische Interaktion, zwischen Ada2 und der Aktivierungsdomäne, in die Nähe des Promotors gebracht werden (Silverman et al., 1994; Barlev et al., 1995).

Transkriptionelle Adaptoren findet man in Eukaryoten von der Hefe bis zum Menschen. Sie werden für die vollständige Funktion vieler Aktivatoren mit saurer Domäne (wie VP16 und GCN4) benötigt. Zwei Domänen von Ada2 (eine N-terminale und eine zentrale Domäne) werden für die *in vivo* Funktion benötigt (Abb. 1.6.). Durch Immunopräzipitations-Experimente fand man heraus, daß die N-terminale Domäne für die Interaktion mit GCN5

zuständig ist und die zentrale Domäne für die Interaktion mit Ada3 benötigt wird (Candau and Berger, 1996). Die N-terminale Domäne kann in eine Zink-Bindedomäne (mit zwei Zinkfingern, bestehend aus sechs konservierten Cystein-Resten und zwei flankierenden Histidin-Resten) und eine Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne unterteilt werden. Die Myb-ähnliche Bindedomäne wird in neueren Untersuchungen auch als SANT-Domäne (wird in *Swi3*, *Ada2*, dem Co-Repressor *NCoR*, *TFIIIB* und *ISWI* gefunden) bezeichnet (Aasland et al., 1996).

SANT-homologe Domänen zeigen DNA-Bindung, die genaue Funktion der SANT-Domäne ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Neuere Untersuchungen konnten nachweisen, daß SANT-Domänen sowohl an Histonacetyltransferasen (HAT), als auch an Histondeacetylasen (HDAC) binden (Guenther et al., 2001; You et al., 2001) und desweiteren HDAC's aktivieren (Guenther et al., 2001), was auf eine Rolle in der Chromatinmodifikation hindeutet. Anhand von Mutationsanalysen konnte man die SANT-Domäne in zwei Subdomänen (SANT-a und SANT-b) unterteilen (Sterner et al., 2002). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß die SANT-a Domäne eine Rolle in der Bindung von Histonen im Nucleosom und damit auch der Histondeacetylierung spielt. Desweiteren ist diese Domäne für die volle HAT-Aktivität innerhalb des SAGA Komplexes unerlässlich. Die SANT-b Domäne könnte für eine spezifische Interaktion mit der Histonacetyltransferase GCN5 verantwortlich sein. Auch eine Interaktion mit Histondeacetylasen wird diskutiert.

Desweiteren konnte eine kryptische Aktivierungsdomäne im N-terminus von *Ada2* identifiziert werden (Candau et al., 1996). Die Wirkungsweise der N-terminalen Aktivierungsdomäne könnte auf der Aktivität der basalen Transkriptionsmaschinerie (durch Protein-Protein Interaktionen mit basalen Faktoren, anderen Adaptoren im Komplex und/oder TBP assoziierten Faktoren) beruhen (Reese et al., 1994).



**Abb. 1.6. : Vergleich der Domänenstruktur verschiedener Ada2 Proteine.** Alle Proteine besitzen eine Zink-Bindedomäne, eine Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne und eine Ada3-Interaktionsdomäne. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Identitäten im Vergleich zu ZmAda2 auf Aminosäureebene angegeben. Acc. Nr.: AtAda2a = AAK31319, AtAda2b = AAK31320, ZmAda2 = AJ430205, ScAda2 = Q02336 .

Im Gegensatz zu allen anderen Organismen, in denen jeweils ein Ada2 Protein vorhanden ist, wurden in *Arabidopsis thaliana* zwei Homologe Ada2-Gene (Ada2a und Ada2b) isoliert. Die Identität der beiden Proteine auf Proteinebene liegt bei 49% (Stockinger et al., 2001). Die Domänen im Alignment wurden aufgrund der Vorhersage von Pfam 6.6 (<http://pfam.wustl.edu/index.html>) eingezeichnet. Die Identitäten der Proteine wurden mit dem Computerprogramm NCBI BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>) ermittelt.

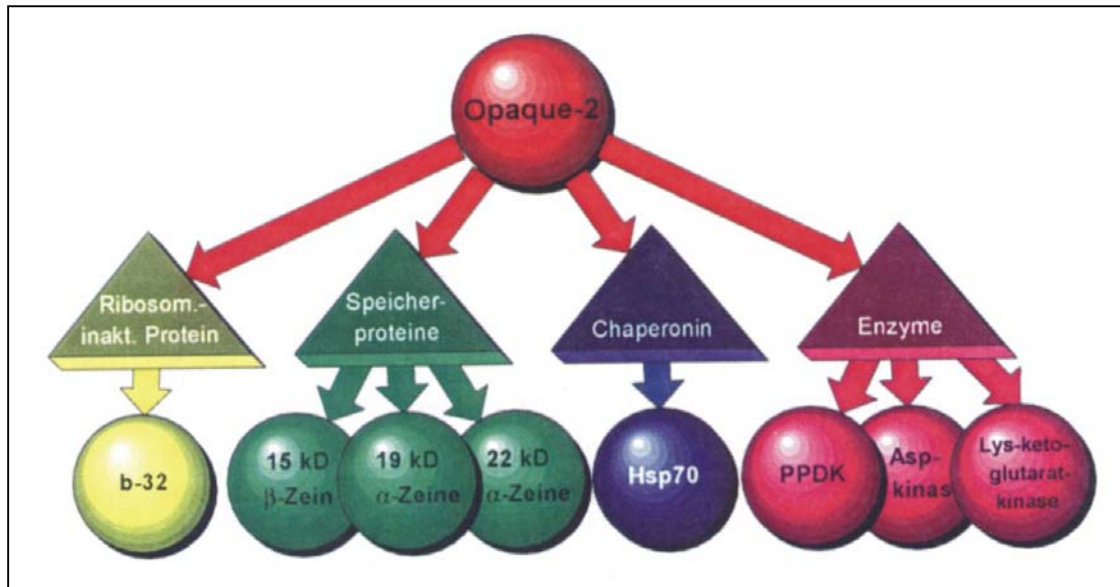
### **1.7. Regulation der Genexpression im Maisendosperm durch den Transkriptionsfaktor Opaque-2**

Als Modellsystem zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivierung bei Pflanzen wurde das Endosperm von *Zea mays* ausgewählt. Das Endosperm ist ein komplexes, triploides Gewebe, das sich im Zentrum der Getreide-Karyopse befindet. Es wird zur Ernährung des Embryos benötigt. Das Endosperm besteht aus verschiedenen Geweben, die alle eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation aufweisen. Die Endospermentwicklung kann in vier Phasen (Coenocytische Phase, Zellularisierung, Differenzierung und Reifephase) unterteilt werden (Olsen et al., 1992). In der Reifephase der Endospermentwicklung kommt es zu einer starken Vermehrung von Zellen, die für die Speicherung von Nährstoffen benötigt werden. Einer der Hauptregulatoren während der Reifephase der Endospermentwicklung ist der Transkriptionsfaktor Opaque-2.

Der Transkriptionsfaktor Opaque-2 (O2) wurde aus *Zea mays* durch Transposon Mutagenese (Transposon tagging) mittels der beiden mobilen Elemente Spm (Schmidt et al., 1987) und Ac (Motto et al., 1988) identifiziert und anschließend isoliert (Hartings et al., 1989). O2 ist auf Chromosom 7 plaziert. Die Sequenz kodiert für ein Haupttranskript, sowie drei offene Leseraster, deren Proteine noch nicht nachgewiesen sind. Das große Transkript zeigt deutliche Homologien zur Klasse der basische Region-Leucine-Zipper (bZIP) Transkriptionsfaktoren (Neuberg et al., 1989; Vinson et al., 1989). Mit Hilfe des bZIP Motivs sind diese Proteine in der Lage, Homo- und Heterodimere auszubilden (Landschulz et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988; Agre et al., 1989; Kouzarides and Ziff, 1989). Zwei Kernlokalisierungs-Signale konnten außerdem identifiziert werden (Varagona et al., 1992).

Die Genregulation von Opaque-2 wird durch sequenzspezifische Bindung der Zielgene erreicht (Schmidt et al., 1990; Lohmer et al., 1991). Eine ganze Reihe von Genen kann durch Opaque-2 reguliert werden (Abb. 1.7.). Hierzu zählen b-32 (Lohmer et al., 1991), das eine

Homologie zu den Ribosomen Inaktivierungs-Proteinen vom Typ I zeigt (Maddaloni et al., 1991), die Speicherproteine 19 und 22 kDa  $\alpha$ -Zeine und das 15 kDa  $\beta$ -Zein, das Chaperonin Hsp70, sowie die Enzyme PPKK, Aspartatkinase und Lysinketoglutarat-Kinase. Bei den 22 kDa  $\alpha$ -Zeinen handelt es sich um die am häufigsten vorkommenden Endosperm Speicherproteine im Mais (Kodrzycki et al., 1989; Schmidt et al., 1990).



**Abb. 1.7. : Faktoren, die durch Opaque-2 reguliert werden.** Aus (Feix and Quayle, 1993).

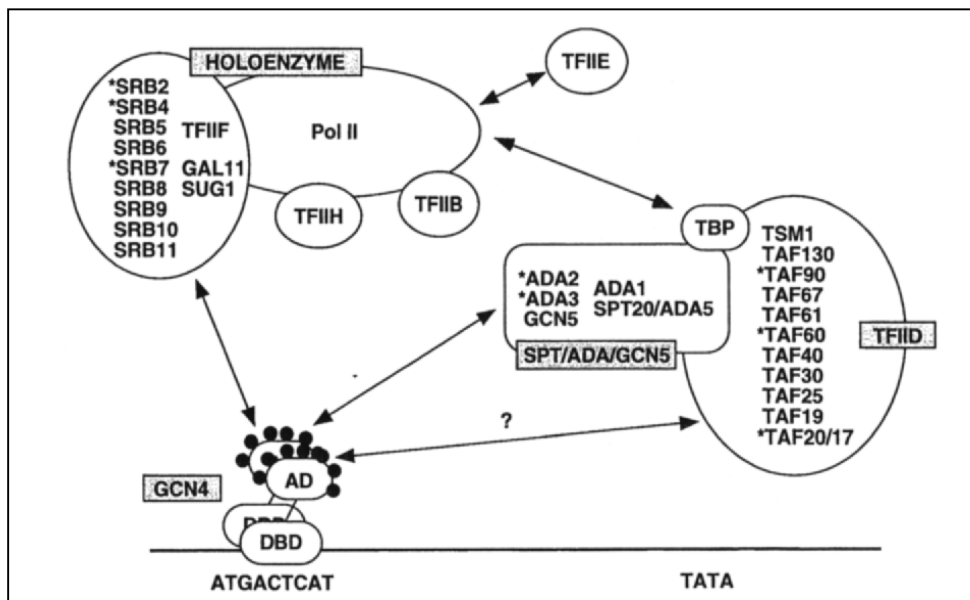
In der Promotorregion von O<sub>2</sub> konnten mehrere Bindungsstellen für b-32 identifiziert werden (Schmidt et al., 1990; Lohmer, 1992). Diese Untersuchungen führten zu der Annahme, daß Opaque-2 verschiedene Sequenzmotive binden kann, wobei allerdings eine Präferenz *in vitro* für A- und G-Boxelemente besteht (Izawa et al., 1993). Weitere Untersuchungen ergaben, daß O<sub>2</sub> tatsächlich mit der Konsensussequenz 5'- G(A/T)TGAPyPuTGPu -3' an verschiedene Sequenzmotive binden kann (Lohmer et al., 1991). Desweiteren wurde in O<sub>2</sub> eine saure Aktivierungsdomäne identifiziert (Schmitz et al., 1997).

## 1.8. Die Funktion der sauren Aktivierungsdomäne

Innerhalb der Transkriptionsfaktoren treten immer wieder Domänen auf, die für die Interaktion mit anderen Proteinen im Initiationskomplex verantwortlich zu sein scheinen. Hierzu gehören saure-, glutaminreiche- oder prolinreiche-Domänen (Mitchell and Tjian, 1989). Proteine, bei denen zuerst eine saure Aktivierungsdomäne gefunden wurde, sind Gal4 (Ma and Ptashne, 1987) und GCN4 (Hope and Struhl, 1986) aus Hefe. Saure

Aktivierungsdomänen können die Transkription sowohl aktivieren, als auch reprimieren (Mitchell and Tjian, 1989). Der Transaktivierungsmechanismus der sauren Domänen scheint sehr konserviert zu sein. Im O<sub>2</sub>-Protein wurde eine saure Aktivierungsdomäne mit einer Länge von 44 Aminosäuren nahe des N-Terminus festgestellt. Deren Transaktivierungsrate hängt von der Distanz des bZIP-Motivs zur Aktivierungsdomäne ab (Schmitz et al., 1997). Der Transaktivierungsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, beruht aber voraussichtlich auf einer direkten oder indirekten Interaktion der RNA Polymerase II mit der TATA-Box (Vashee and Kodadek, 1995).

Die saure Aktivierungsdomäne von GCN4 interagiert *in vitro* sowohl direkt mit dem RNA Polymerase II Holoenzym, als auch indirekt mit dem TFIID-Komplex über einen Ada2-GCN5 Komplex in Hefe (Abb. 1.8.) (Drysdale et al., 1998).



**Abb. 1.8. : Modell der *in vitro* Interaktion von GCN4 mit dem RNA Polymerase II Holoenzym, TFIID und einem Ada2-GCN5 Komplex in Hefe.** In der Abbildung sind drei mögliche Interaktionen von GCN4 mit dem RNA Polymerase II Holoenzym dargestellt. Die direkte Interaktion mit dem Holoenzym, sowie die Interaktion mittels des Ada2-GCN5 Komplexes konnte bereits nachgewiesen werden. Die dritte Möglichkeit (eine Interaktion über den TFIID-Komplex) ist bislang allerdings reine Spekulation. Ob der Ada2-GCN5 Komplex (wie in dieser Abbildung dargestellt) tatsächlich ein Teil des TFIID-Komplexes ist, ist noch nicht nachgewiesen. Nach (Drysdale et al., 1998).



## 1.9. Insertionsmutagenese und Reverse Genetik

Bei der Insertionsmutagenese werden mobile genetische Elemente (sog. Transposons) und die T-DNA des Ti-Plasmids (Tumor-induzierenden Plasmids) des Wurzelhalsgallen-Erregers *Agrobacterium tumefaciens* in das Genom von Pflanzen inseriert, wodurch Mutanten erzeugt werden, die funktionelle Defekte aufweisen können (Azpiroz-Leehan and Feldmann, 1997). Durch den Einbau eines DNA-Fragments wird die Gensequenz an der Integrationsstelle unterbrochen, was zu einem Verlust der Genfunktion führt. Grundsätzlich wird bei diesem Vorgang nicht nur die Gensequenz unterbrochen, sondern auch die Insertionsstelle molekular „markiert“, da die Sequenz des verwendeten Insertionselements bekannt ist (Weigel et al., 2000). Die Isolierung von Mutanten aus Gen-Tagging Experimenten erfolgt über die Identifizierung des Phänotyps. Die Isolierung der mutagenisierten Gensequenz erfolgt über die bekannte DNA-Sequenz des verwendeten Insertionselements (Schulz B, 1995; Dilkes and Feldmann, 1998).

Mit Hilfe von Genmarkierungs-Experimenten (Gen-tagging) kann nach der Isolierung der phänotypisch veränderten Mutante, die betroffene Gensequenz identifiziert und isoliert werden, da das Insertionselement mit seiner bekannten DNA-Sequenz als molekularer Marker der Insertionsstelle dient. Für diese Methode werden keine weiteren Kenntnisse über die Sequenz des zu isolierenden Gens benötigt. *Arabidopsis thaliana* verfügt laut Annotation der genomischen Komplettssequenz über etwa 25.000 Gene. Zur Zeit sind mehrere 100.000 Insertionslinien erhältlich. Daher wird die Identifizierung einer Insertionslinie für jedes Gen noch eine geraume Zeit in Anspruch nehmen.

Eine weitere Methode basiert auf dem, zum Gen-tagging entgegengesetzten, Ansatz. Bei der “Reversen Genetik” wird, ausgehend von einer bekannten Sequenz eines bestimmten Gens, mit Hilfe der PCR (Polymerase Kettenreaktion) die Insertionsstelle der T-DNA identifiziert (Baumann E, 1998). Mittels eines genspezifischen- und eines T-DNA spezifischen Primers können mehrere tausend Insertionslinien gleichzeitig nach einer Insertion in dem untersuchten Gen gescreent werden. Bei positiven Signalen in der PCR kann über das Screenen von “Subpools“ die korrespondierende Pflanze identifiziert und anschließend charakterisiert werden.

Mit Hilfe beider Methoden dürfte sich die Zeit bis zur Isolierung einer Mutante für jedes Gen in *Arabidopsis* deutlich reduzieren. Anhand der, am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* gewonnenen Daten, können zusätzlich Rückschlüsse auf andere, wissenschaftlich und wirtschaftlich interessante Pflanzen geschlossen werden.

## 1.10. Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Transkriptionsregulation spielt die Chromatinorganisation eine entscheidende Rolle (Allfrey et al., 1964). In großen Proteinkomplexen sind Histonacetyltransferasen in der Lage, Chromatin so zu modifizieren, daß die DNA von der Transkriptionsmaschinerie abgelesen werden kann. Die zwei Hauptkomponenten dieser Komplexe, die Histonacetyltransferase GCN5 und das Adaptorprotein Ada2, sind in Hefe und dem menschlichen System (Grant et al., 1997; Pollard and Peterson, 1997; Saleh et al., 1997) weitgehend charakterisiert, in Pflanzen ist allerdings noch wenig bekannt.

Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der Histonacetyltransferase GCN5 und des Adaptorproteins Ada2 in Pflanzen genauer charakterisiert werden. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den bisher gewonnenen Daten, die vor allem in Hefe, dem Menschen und in *Taxoplasma* gewonnen wurden, sollen analysiert werden. Hierzu wurden die Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (L.) und *Zea mays* (L.) gewählt.

Im Mais steht die Charakterisierung und Spezifizierung der HAT-Aktivität von ZmGCN5 im Vordergrund. Nachdem abweichend von anderen Ergebnissen in Hefe gezeigt werden konnte, daß isoliertes GCN5 sowohl verschiedene Lysine einzelner Histone acetyliert, als auch Nucleosomen unter speziellen Salzbedingungen (Tse et al., 1998), sollen die entsprechenden Daten in Pflanzen gewonnen werden. Primäre Ergebnisse zeigten im Southern-Blot, daß es sich bei *ZmAda2* um eine kleine Genfamilie mit etwa 4-5 Genkopien handelt. Von besonderem Interesse ist hierbei ein kleineres *ZmAda2* Transkript das im Gegensatz zu dem, in anderen Geweben vorhandenen großen Transkript, nur in Pollen nachgewiesen werden konnte. Da zu Beginn dieser Arbeit *Ada2* in den anderen Spezies nur als Gen mit nur einer Kopie bekannt ist, könnte die Charakterisierung dieser kleinen Genfamilie und insbesondere des kleineren Transkripts im Maispollen neue Erkenntnisse erbringen.

In *Arabidopsis* sind zu Beginn dieser Arbeit keine Veröffentlichungen über *GCN5* und *Ada2* bekannt. Anhand von Datenbanksequenzen sollen beide Gene isoliert und charakterisiert werden. Hier sollen die in Mais gewonnenen Ergebnisse zum Vergleich herangezogen werden.

Ein entscheidender Punkt für die Aufklärung der biologischen Rolle von *GCN5* und *Ada2* in Mais und *Arabidopsis* könnte hierbei anhand von Knockout-Mutanten in *Arabidopsis* erfolgen. Neben der Herstellung von sense und antisense Linien besteht die Möglichkeit, der Suche nach Mutanten in einer *Arabidopsis* T-DNA Population (Burkhard Schulz; MPI für Züchtungsforschung Köln) sowie einer En-tagging-Population (ZIGIA; MPI für Züchtungsforschung Köln).

## 2. Material

Puffer und Lösungen wurden mit doppelt demineralisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert, RNA-Puffer und Lösungen mit doppelt demineralisiertem DEPC Wasser. Auf gleiche Art und Weise ist mit den verwendeten Glasgeräte und Pipettenspitzen verfahren worden.

### 2.1 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaar(e)
Bidest H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Bovineserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Cpm	Count per minute (Zählpulse pro Minute)
d	Tag
DAP	Tage nach der Bestäubung ( <u>d</u> ays <u>a</u> fter <u>p</u> ollination)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukeotidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
x g	Gravitationskonstante (980 cm/s)

GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LiOAc	Lithiumacetat
M	Mol
mA	Milliampere
MES	4-Morpholin Ethansulfonsäure
min	Minute(n)
mmol	Millimolar
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
4-MUG	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide
NaOAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel – Elektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pg	Pikogramm
pM	Pikomol
PIPES	1,4-Piperazin-N,N'-2-ethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Triton X-100	Octylphenylpoly(ethylenglycoether) <sub>n</sub>
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
ÜN	Über Nacht
V	Volt
%[v/v]	Volumenprozent
%[w/v]	Gewichtsprozent
µg	Mikrogramm
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
X-gluc	β-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-gluronic acid cyclohexyl ammonium salt

## 2.2 Pflanzenmaterial

*Zea mays* L. cv. A69Y

*Zea mays* L. cv. A188

*Zea mays* L. cv. B73

*Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia

*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1

*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2

## 2.3 Bakterien und Hefestämme

XL1-Blue MRF <sup>+</sup>	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F <sup>+</sup> proAB, lac1 <sup>q</sup> ZΔM15Tn10(Tet <sup>r</sup> )] (Stratagene)
DH 10 B	F <sup>+</sup> , mcrA, Δ(mvr-hsd RMS-mcrBC), φ80dlacZ,ΔM15,ΔlacX74,deoRrecA1,endA1,eraD139, Δ(ara,leu)7697galU,galkλ <sup>-</sup> rpsL,nupG (GIBCO-BRL)
BL 21 (DE 3)	<i>E.coli</i> B F <sup>-</sup> dcm omp T hsdS (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ (DE3)(Stratagene)
XL0LR	Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F <sup>+</sup> proAB, lac1 <sup>q</sup> ZΔM15Tn10(Tet <sup>r</sup> )] Su <sup>-</sup>

	(nonsuppressing), $\lambda^R$ (lambda resistant)
	(Stratagene)
LBA-4404	Sm <sup>r</sup> , (Rif <sup>r</sup> )
	(Hoekema <i>et al.</i> , 1983)
YRG-2	Mata $\alpha$ , ura 3-52, his 3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112gal4-542, gal80-538, LYS ::IAS <sub>GAL1</sub> -TATA <sub>GAL1</sub> -HIS3, URA3 ::Uas <sub>GAL4</sub> 17mers(x3)-TATA <sub>CYC1</sub> -lacZ
	(Stratagene)

## 2.4 Vektoren

pBluescript II SK+/-	(Stratagene), (Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992)
pRT100/pRT101	(Töpfer <i>et al.</i> , 1987)
pGEM-Teasy	(Promega), (Robles, 1994)
HybriZap <sup>®</sup> -2.1	(Stratagene), (Fields and Song, 1989)
pAD-GAL4 -2.1 phagemid	(Stratagene), (Fields and Song, 1989)
pBD-GAL4 Cam phagemid	(Stratagene), (Fields and Song, 1989)
PhExAssist <sup>™</sup> Helper Phage	(Stratagene), (Short <i>et al.</i> , 1988)
pGEX4T-2	(Pharmacia Biotech), (Smith and Johnson, 1988)
pGFP JS	(Sheen <i>et al.</i> , 1995)
pBIN19	(Clontech), (Bevan, 1984)

## 2.5 Chemikalien und Enzyme

Es wurden nur Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Beckman (München), Biomol (Ilvesheim) und Riedel de Haen (Hannover) eingesetzt. Nährmedienzusätze stammten von den Firmen GIBCO BRL (Neu-Isenburg) und DIFCO (Detroit, USA). Es wurden Enzyme der Firmen Boehringer (Mannheim), GIBCO BRL (Neu-Isenburg), Stratagene (Heidelberg), New England Biolabs (Schwalbach) und Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig) eingesetzt.

## 2.6 Puffer und Lösungen

1 x TE:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA*
10 x TAE :	400 mM Tris-Acetat, 200 mM Natriumacetat, 20mM EDTA, pH 8,2
10 x TBE :	1 M Tris-HCl, pH 8,3, 1 M Natriumborat, 20 mM EDTA
1 x TTBS :	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,05% Tween 20
10x MEN:	41,9g/l Mops pH 7, 4,1g/l NaOAc, 20ml/l 0,5M EDTA
100x Denhardts:	2%[w/v] Ficole, 2%[w/v] Polyvinylpyrrolidon – 360, 2%[w/v] BSA Fr.V
20x SETS:	3M NaCl, 20mM EDTA, 0,6M Tris-HCl pH 8, 11mM tetra-Sodiumpyrophosphat
20x SSC:	3M NaCl, 300mM Natriumcitrat pH 7.0
ESB:	2%[w/v] SDS, 80mM Tris-HCl pH 6.8, 10%[w/v] Glycerol, 1,5%[w/v] DTT
PLATE:	50%[w/v] PEG 4000, 10%[w/v] 1M LiOAc, 1%[w/v] 1M Tris pH 7.5, 0,2%[w/v]0,5M EDTA
10 x Elektrophoresepuffer für Proteingele:	3,028%[w/v] Tris, 14,4%[w/v] Glycin, 1%[w/v] SDS
SDS-Lämmli-Probenpuffer:	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10%[v/v] Glycerol, 2%[w/v] SDS, 5%[v/v] $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,1%[w/v] Bromphenolblau
10 x DNA-Ladepuffer:	10 x TAE, 50%[v/v] Glycerin, 0,5%[w/v] Bromphenolblau, 0,5%[w/v] Xylencyanol FF

RNA-Puffer I-IV:	I: 0,1M NaCl, 0,05M Tris-HCl, pH 9.0, 0,01M EDTA, 2% SDS, 0,2% Proteinase K II : 0,4M NaCl, 0,01M Tris-HCl, pH 7.5, 0,2% SDS III: 0,1M NaCl, 0,02M Tris-HCl, pH 7.5, 0,01% SDS IV: 0,01M Tris-HCl, pH 7.5
SM-Puffer:	50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM NaCl, 8mM MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 0,01%[w/v] Gelatine*
K3-Lösung:	4,3g/l MS, 0,4M Saccharose, 100mg/l Inosit, 250mg/l Xylose, 1ml/l Vitamine, pH 5.8
W5-Lösung:	154mM NaCl, 125mM CaCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 5mM Glucose, pH 5.8
MaMg-Lösung:	450mM Mannitol, 15mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1%[w/v] MES, pH 5.8

\*: Die gekennzeichneten Puffer wurden 30 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

## 2.7 Nährmedien

LB-Medium:	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 10g/l NaCl; mit 5 M NaOH auf pH 7,0 einstellen; für feste Medien zusätzlich 15g/l Agar Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.
2 x YT-Medium:	10g/l Bacto-Trypton, 10g/l Bacto-Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 2,5g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
NZ-Medium:	10g/l NZ-Amin, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 2g/l MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 1g/l Pepton, 15g/l Agar
NZ-Topagar:	NZ-Medium mit 10 mM MgCl <sub>2</sub> und 6g/l Agarose
SD-Medium:	6,7g/l Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren, nach dem Autoklavieren wurden 100 ml der 10x Aminosäurelösung (ASL) und 40 ml einer 50%tigen Glucoselösung zugegeben, für feste Medien zusätzlich 15g/l Agar.



- SM-Medium: 5,8 g/l NaCl, 2 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 6,05 g/l Tris, 5 ml/l 2% Gelatine, pH 7.5
- YPD-Medium: 20 g/l Pepton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, nach dem Autoklavieren wurde 40 ml einer 50%tigen Glucoselösung zugegeben, für feste Medien zusätzlich 15g/l Agar.
- Selektivmedium: IPTG wird dem Medium in einer Endkonzentration von 1 mM, Ampicillin (Bakterien) von 100µg/ml bzw. Chloramphenicol von 30 µg/ml und X-Gal von 0,02%[w/v] zugegeben.
- Selektivmedium: Zur Selektion der Plasmide, oder einer putativen Interaktion wurden die (Hefen) entsprechenden Aminosäuren nicht hinzugefügt. Bei selbstaktivierenden Konstrukten wurden zusätzlich verschiedene Konzentrationen von 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT) dem Medium zugegeben.
- X-Gal Medium: 3,5g/l Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren, 50 ml/l (1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/100 mM KCL pH 7,0); 10g/l Agar; und nach dem Autoklavieren 5ml/l 100 mM MgSO<sub>4</sub>; 500µl 1 M DTT; 2,5 ml X-Gal (20 mg/ml) und 50 ml/l 10 x Dropout.
- 10x Dropout:
- |                      |         |             |         |
|----------------------|---------|-------------|---------|
| L-Isoleucin          | 0,3g/l  | L- Valine   | 1,5 g/l |
| L-Adenine Hemisulfat | 0,2 g/l | L-Arginin   | 0,2g/l  |
| L-Histidin           | 0,2g/l  | L-Leucin    | 1,0g/l  |
| L-Lysin              | 0,3g/l  | L-Methionin | 0,2g/l  |
| L-Phenylalanin       | 0,5g/l  | L-Threonin  | 2,0g/l  |
| L-Tryptophan         | 0,2g/l  | L-Tyrosin   | 0,3g/l  |
| L-Uracil             | 0,3g/l  |             |         |
- MS-Medium: 4,3g/l MS, 1% Saccharose, 0,1g/l Myoinositol, 1ml/l Vitamine, 8g/l Agar, (Arabidopsis, Tabak) pH 5,6 - 5,8

Alle Medien wurden für 30 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

## 2.8 Verwendete Kits

Folgende Kits wurden verwendet: QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN Plasmid Maxi Kit, QIAGEN Lambda Midi Kit, Qiaquick PCR Purification Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, Oligotex mRNA Kit (alle QIAGEN, Hilden), Perfect RNA Maxi Kit (Eppendorf), GeneRacer™ Kit (Invitrogen), T7 Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio USA), RediprimeII Kit und ECL Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig), TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega), HybriZAP®-2.1 Two-Hybrid Library System (Stratagene).

## 2.9 Verwendete Primer

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5' → 3'
G1	PCR-Analyse	GCG CCC CGG GAT GGA CTC TCA CTC TTC CCA C
G2	PCR-Analyse	CCT ATG GAA TGC AAA ATT GAT CCA AAG C
G3	PCR-Analyse	GTA TTT CCT CAA CTT TGA TAA TCT TTC
G4	PCR-Analyse	CGG CCC GGG CAC TGA CGT TCC ATA AAT TCC CC
G5	PCR-Analyse	CGG CCC GGG CGA GCA CAG CTG CGC AAG G
G6	PCR-Analyse	CGG CCC GGG CGC CTT GCA GCA CAT CCC C
G7	PCR-Analyse	CGG CCC GGG GGT TAT GTG ATT TTC ATC AGA AAC
Uni	Klonierung	ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG
Rev	Klonierung	ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG
Universal	Sequenzierung	GTA AAA CGA CGG CCA GT
Revers	Sequenzierung	CAG GAA ACA GCT ATG AC
PAD1 new	Sequenzierung	GAT ACC CCA CCA AAC CCA A
pAD3	Sequenzierung	CAG TAT CTA AGA TTC ATA GAT CTC
ZmGCN5fwd	Klonierung	GCG CGG CCA TGG ACG GCC TCG TGG CGC CGT
ZmGCN5rev	Klonierung	GCG CGG GCT CTT CGC TCT TGG TTG AGA GTT G
ZmAda2fwd	Klonierung	ATG GGG CGG TCG CGA GGG
ZmAda2rev	Klonierung	CTG TTG CCT GGA GAG CTG AC
G 917	PCR-Analyse	AGA TGG CAA GGG TAC ATT AAA G
G 1515	PCR-Analyse	CCA TGA ATT CGA AGA AGT TTT CAA GCC GTG TC
A 1	PCR-Analyse	ATG GGG CGG TCG CGA GGG
A 880	PCR-Analyse	GGC ATC ATT ATC ATA CTC TGG G
ZmAda2-Pofwd	Klonierung	GCG CCT CGA GAT GGC TAA AGT GCA GGG TGA AAG
ZmAda2RACE0	Primer Extension	CCA GGC AAC AGT GAA GTC CC

ZmAda2RACE1	Primer Extension	CCA CCT TGA CCC TGG AGG GAG AAA ATG G
poly t	5' RACE	CCCGGGAAGCTTAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT
A1	PCR-Analyse	CCA TTT GGA CTG GAA TGT AGA CAC GTC GA
A2	PCR-Analyse	CTT ACT ACC AAC ATG GTC TGC AAC TTC
A3	PCR-Analyse	GCG CCC CGG GAT GGG TCG TTC GAA ACT AGC
A4	PCR-Analyse	GCG CCC CGG GTG TTG AGT CAC CTA TTC CC
Nested P	5' RACE	CCCGGGAAGCTTAAGC
Oligo d(T)	5' RACE	GACCACGCGTATCGATGTCGAC ( T ) <sub>16</sub> V
Anchor P	5' RACE	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

## 2.10 Radioisotope

Die eingesetzten, mit  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  und  $^3\text{H}$  markierten Radioisotope, wurden von Amersham (Braunschweig) geliefert.

### 3. Methoden

Molekularbiologische Arbeiten wurden, soweit nicht anderweitig angegeben, nach den von (Sambrook et al., 1989) beschriebenen Methoden durchgeführt.

#### 3.1 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial wurde nach (Edwards et al., 1991) durchgeführt. Hierbei wurde das Pflanzenmaterial maceriert, in Extraktionspuffer aufgenommen, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Isopropanol gefällt, zentrifugiert und das Pellet in TE Puffer aufgenommen. Die DNA kann bei 4°C gelagert werden.

#### 3.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Plasmid DNA wurde mit Hilfe der folgenden QIAGEN Kits durchgeführt: QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm überprüft und die isolierte Plasmid DNA bei -20°C gelagert.

#### 3.3 Isolierung von DNA aus $\lambda$ -Bakteriophagen

Die DNA wurde aus den  $\lambda$ -Bakteriophagen nach (Sambrook et al., 1989) isoliert. Hierzu wurde ein einzelner Bakteriophagen-Plaques aus einer NZ-Topagaroseplatte ausgestochen und in 1ml SM-Puffer gegeben. Nach Zugabe eines Tropfens Chloroform wurde der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei 4°C inkubiert, um die Phagenpartikel aus der Topagarose diffundieren zu lassen. Parallel wurden Bakterien des Stammes XLI-BlueMRF' in NZ-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 herangezogen, pelletiert und anschließend in 10mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen. 100µl der Phagensuspension wurden zu 100µl der Bakterien in MgSO<sub>4</sub> gegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von ca. 3ml 48°C warmer NZ-Topagarose wurde die Bakteriensuspension auf frisch hergestellte 90mm NZ- Agarose-Platten gegossen und nach Erstarrung der NZ-Topagarose invertiert sowie über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 3ml SM-Puffer wurden die Phagenpartikel durch zweistündiges Schwenken bei Raumtemperatur aus der Topagarose eluiert und durch eine zehnminütige Zentrifugation bei

4000x g und 4°C von Bakteriendebris gereinigt. Der Überstand wurde mit SM-Puffer gewaschen und mit 5% Chloroform versetzt. Die präzipitierten Phagen wurden durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 4000x g und 4°C gewonnen. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAGEN Lambda Midi Kits (QIAGEN) isoliert, bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm überprüft und die isolierte Plasmid DNA bei -20°C gelagert.

### 3.4 DNA Isolierung aus Hefe

Die DNA wurde nach (Hoffman and Winston, 1987) isoliert. Eine Einzelkolonie Hefe wurde in SD-Medium bei 30°C ÜN hochgezogen und davon 1,4 ml in ein Eppendorf Gefäß überführt, kurz abzentrifugiert und der Überstand bis auf 50 – 100µl abgegossen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und mit 0,2ml (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris (pH 8) 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA), 0,2ml Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1), sowie 0,3g acid-washed glass beads (Sigma) versetzt, 2 min gevortext und 5 min zentrifugiert. 1-5µl des Überstandes können zur Transformation in *E.coli* verwendet werden.

### 3.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden 5g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff mit Quarzsand etwa 30min gemörsert und anschließend in 20ml RNA-Puffer I (+ 8mg Proteinase K ; + 61,6 mg Dithiothreitol) 1h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach 10min Zentrifugation bei 4000x g wurde dreimal mit 0,7 Volumen Phenol / Chloroform und einmal mit 0,7 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol extrahiert, zwischen den Schritten jeweils 10min bei 4000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,8 Volumen 10M LiCl 1 – 3 h auf Eis gefällt und anschließend 30min bei 8500x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5ml 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 400µl TE / SDS aufgenommen. Menge und Reinheit der RNA wurden durch OD - Messung (260 + 280nm) bestimmt und Aliquots der RNA bei -70°C gelagert.

### 3.6 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA

#### 3.6.1 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit Oligo Cellulose

Die Isolierung der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde nach (Bartels and Thompson, 1983) durchgeführt. Zur Gewinnung der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden 5g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff

mit Quarzsand etwa 30min gemörsert und anschließend in 20ml RNA-Puffer I (+ 8mg Proteinase K ; + 61,6 mg Dithiothreitol) 1h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach 10min Zentrifugation mit 4000x g wurde dreimal mit 0,7 Volumen Phenol / Chloroform und einmal mit 0,7 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol extrahiert, zwischen den Schritten jeweils 10min mit 4000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1/10 Volumen 4M NaCl und 0,05g Oligo-dT-Cellulose 15min vorsichtig bei RT auf einem Roller inkubiert. Die Cellulose wurde 3min mit 6000x g zentrifugiert, dreimal mit 50ml RNA-Puffer II , sowie dreimal mit 50ml RNA-Puffer III gewaschen, in 2ml Eppendorf Caps umgefüllt und 5x mit 0,5ml RNA-Puffer IV (55°C) eluiert. Die RNA wurde mit 1/20 Vol. 4M NaCl und 2,5Vol. EtOH bei -70°C gefällt. Menge und Reinheit der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden durch OD - Messung (260 + 280nm) bestimmt und Aliquots der RNA bei -70°C gelagert.

### 3.7 DNA und RNA Konzentrationsbestimmung

#### DNA-Konzentration:

$$\frac{OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \text{DNA Gehalt in } \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Berechnung des Verdünnungsfaktors : 4µl Probe + 700µl H<sub>2</sub>O = Verdünnungsfaktor 175

#### RNA-Konzentration:

$$\frac{OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} = \text{RNA Gehalt in } \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Berechnung des Verdünnungsfaktors : 4µl Probe + 700µl H<sub>2</sub>O = Verdünnungsfaktor 175

### 3.8 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Die Auftrennung von DNA und RNA wurde nach (Southern and Roizes, 1974) durchgeführt. Die Konzentration des Agarosegels richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, wobei kleinere Fragmente in höher-prozentigen Gelen analysiert wurden. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1xTAE gelöst, auf 60°C abgekühlt und in Gelbetten gegossen. Als Laufpuffer diente 1xTAE. Die DNA- und RNA-Proben wurden mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und bei konstant 100 mA Stromstärke aufgetrennt. Als Größenstandart diente eine 1 Kb DNA Ladder (GIBCO BRL) und gegebenenfalls zur Ermittlung der Konzentration eine Low DNA Mass™ Ladder (GIBCO BRL). Nach der Elektrophorese

wurden die Nukleinsäuren 15 min in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1xTAE inkubiert, auf einem UV-Transilluminator analysiert und zur Dokumentation fotografiert.

### **3.9 DNA Extraktion aus Agarosegelen**

Die DNA Extraktion erfolgt nach QIAEX II Gel Extraction Kit von QIAGEN. Hierbei wurde die DNA an QIAEX II gebunden und konnte so, nachdem die Agarose entfernt worden war, eluiert werden.

### **3.10 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien**

Mit einer sterilen Impföse wurde eine Einzelkolonie XL1-blue MRF<sup>c</sup> (Stratagene) in 10 ml LB-Medium mit Tetracyclin (12,5µg /ml in 50% Ethanol) angeimpft. Die Bakterien wurden ÜN bei 37°C geschüttelt. Mit dieser ÜN Kultur wurden 500 ml LB-tet angeimpft, die etwa 4 h bei 37°C schüttelten (bis die OD<sub>600</sub> etwa 0,8 - 1 betrug). Der Ansatz wurde 15 min mit 4000 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 ml kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen. In vier weiteren Waschschritten verringerte man das Volumen jeweils um die Hälfte. Anschließend wurde das Pellet mit 10 ml 10% Glycerin gewaschen und in 2ml 10% Glycerin aufgenommen. Aliquots zu je 40 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

### **3.11 Transformation von Bakterien**

#### **3.11.1 Chemische Transformation (CaCl<sub>2</sub> – Methode)**

Die chemisch kompetenten Zellen wurden 30 min auf Eis aufgetaut. Dazu wurden 2 µl Ligation (max. 100 ng DNA) gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Es folgten 90 sec Hitzeschock bei 42°C und Zugabe von 500 µl LB-Medium. Nach einer Inkubation von 2min auf Eis wurden die Zellen 45 min bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend 200 µl auf LB Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Kolonien wuchsen ÜN bei 37°C.

#### **3.11.2 Elektroporation**

Zu 40µl elektrokompenten Zellen gab man 1µl Ligationsansatz. Etwa 5 sec lang wurde ein Spannungsimpuls von 1,6 kV gegeben, der es der DNA ermöglichte, in die Bakterien einzudringen. Sofort wurden 500 µl LB zugegeben und 45 min auf einem Rotationsschüttler

bei 37°C inkubiert. 200 µl (unverdünnt + 1/10 Verdünnung) wurden auf LB Platten (Antibiotikum, X-Gal, IPTG) ausgestrichen und ÜN auf 37°C gestellt.

### 3.12 Amplifikation von DNA mittels PCR (polymerase chain reaction)

Ein Standard-PCR-Ansatz enthielt:

- 1-5 ng Matrizen-DNA
- 5 µl 10 x PCR-Puffer (GIBCO BRL)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 100 µM dNTP's
- 0,5 pmol/µl 5'-primer
- 0,5 pmol/µl 3'-primer
- 2,5U *Taq* - DNA-Polymerase (GIBCO BRL)
- x µl H<sub>2</sub>O
- in einem Gesamtvolumen von 50 µl

Zur Klonierungen in Expressionsvektoren wurde *PlatinumPfx*-DNA-Polymerase (Gibco BRL) eingesetzt, da sie eine geringere Fehlereinbaurrate besitzt als *Taq*-DNA-Polymerase. Zur Überprüfung von Transformationen wurden PCR-Reaktionen auch mit einzelnen Bakterienkolonien durchgeführt. Hierzu wurde eine Bakterien-Einzelkolonie von der Nährmedium-Platte mit einer Pipettenspitze direkt in einen PCR-Ansatz mit dem Reaktionsmix überimpft. Die Amplifikation wurde in einem UNO-Thermoblock der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Zahl der Zyklen, die Dauer der einzelnen Schritte (DNA-Denaturierung, Primer-Annealing, DNA-Synthesephase) wurden jeweils der zu amplifizierenden DNA angepaßt. Die spezifische Annealing-Temperatur der eingesetzten Primer wurde wie folgt berechnet:

$$T_m = (G + C) \cdot 4^\circ\text{C} + (A + T) \cdot 2^\circ\text{C} \quad T_m = \text{Schmelztemperatur}$$

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

$$T_a = \text{Annealing-Temperatur}$$

### 3.13 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die RACE Reaktion wurde nach dem GeneRacer™ Kit (Invitrogen)-Protokoll durchgeführt.



### 3.14 "Primer Extension"-Analyse

Die "Primer Extension"-Analyse stellt eine sehr effiziente Methode zur exakten Bestimmung des 5'-Terminus einer gesuchten mRNA dar (Jones, 1994). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß ein 5'-endmarkierter Primer, der aus der DNA-Sequenz der ersten (bis zu 200) Nukleotide des Transkriptes abgeleitet wurde und zur mRNA komplementär ist an diese hybridisiert und durch eine Reverse Transkriptase (RT) bis zum 5'-Ende der mRNA verlängert wird. Mit dem gleichen Primer wird auch eine Sequenzierungsreaktion (Sanger et al., 1977) der DNA durchgeführt. Durch Vergleich der Fragmentgrößen des erhaltenen cDNA-Fragments mit den bei der Sequenzierungsreaktion erhaltenen DNA-Fragmenten kann dann das 5'-Ende der mRNA und somit der Transkriptionsstartpunkt exakt bestimmt werden. Die Primer Extension Reaktion wurde nach den Angaben in Current Protocols in Molecular Biology Online (UNIT 4.8 Primer Extension, [http://www3.interscience.wiley.com:8097/tserver.dll?command=doGetDoc&sUI=&database=CP&useScheme=WIS\\_Framed.Scheme&getDoc=cp\\_toc\\_fs.html](http://www3.interscience.wiley.com:8097/tserver.dll?command=doGetDoc&sUI=&database=CP&useScheme=WIS_Framed.Scheme&getDoc=cp_toc_fs.html)) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit 20µg Pollen RNA aus Mais mit den Primern ZmAda2RACE0 und ZmAda2RACE1.

### 3.15 Sequenzierung von ssDNA

Die Sequenzierung von ssDNA erfolgte nach dem als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichneten Verfahren (Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierungsreaktion wurden die für die "Primer-Extension"-Reaktion beschriebenen Primern ZmAda2RACE0 und ZmAda2RACE1 eingesetzt. Als DNA diente die ZmAda2 cDNA. Die Sequenzierung wurde mit dem T7 Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio USA) exakt nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 3.16 Durchsuchung einer genomischen Phagen-DNA-Bank (Plauehybridisierung)

Eine Bank von  $\lambda$ -Phagen mit genomischen DNAs aus *Zea mays* (Stratagene) wurde mittels Plauehybridisierung nach Phagenklonen durchsucht, die zur eingesetzten Sonde homologe Inserts tragen. Die Kultur der Phagen und des Bakterienstammes XLI-BlueMRF' erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Nach Inkubation der plattierten Phagen über Nacht bei 37°C wurde ein Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schnell, Dassel) eine Minute aufgelegt und mit der Plauesseite nach oben anschließend für drei bis fünf Minuten in Denaturierungslösung (1,5M NaCl; 0,5M NaOH) inkubiert. Nach weiteren drei bis fünf Minuten in Neutralisationslösung (1,5M NaCl; 1M

Tris-HCl pH 7.5) wurden die Filter eine Minute in 20xSSC gewaschen, anschließend für zwei Minuten im "Stratalinker" (Stratagene, Heidelberg) mit UV-Licht fixiert. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten nach dem Protokoll des Southern Blots (siehe Abschnitt 3.17).

### 3.17 DNA Transfer auf Hybond Filter (Southern Blot)

Der DNA Transfer auf Hybond-N Membran (Amersham) erfolgte nach (Southern, 1975). Nach dem Restriktionsverdau und anschließender Auftrennung der DNA im Agarosegel, wurde das Gel 2 x 15 min in 0,1M HCL, 2 x 15 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) und 2 x 15 min in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 1M Tris-HCl pH 8) auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Über Nacht wurde die DNA in 20x SSC mittels Kapillartransfer auf Hybond-N Nylon Membran geblottet, 2 min mit Hilfe eines UV Crosslinkers (Stratagene) immobilisiert und anschließend noch 2 h bei 80°C im Vakuum gebacken.

Um eine möglichst hohe Stringenz zu erreichen, wurde die Praehybridisierung (10%[w/v] 100x Denhardts, 20%[w/v] 20x SETS, 1%[w/v] Dextran Sulfat, 1%[w/v] 10% SDS und 0,5%[w/v] SS-DNA (10mg/ml)) für 4 h bei 65°C durchgeführt. Nach dem Labeling wurde ÜN bei 65°C hybridisiert (10%[w/v] 100x Denhardts, 20%[w/v] 20x SETS, 10%[w/v] Dextran Sulfat, 1%[w/v] 10% SDS und 0,1%[w/v] SS-DNA (10mg/ml)). Die Filter wurden anschließend 2 x 15 min mit 2 x SSC, 0,1% SDS und 2 x 30 min mit 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen.

Die Filter wurden in Frischhaltefolie eingewickelt und auf Röntgenfilm (Kodak) exponiert.

### 3.18 RNA Transfer auf Hybond Filter (Northern Blot)

Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde mit 2 Volumen RNA Ladepuffer (10%[w/v] 10x MEN, 17,5%[w/v] Formaldehyd, 50%[w/v] deionisiertem Formamid und 10%[w/v] Bromphenolblau) gemischt, 10 min auf 65°C erhitzt und im denaturierenden Agarosegel (1,5%[w/v] Agarose, 20%[w/v] Formaldehyd, 13%[w/v] 10x MEN), um die Bildung von Sekundärstrukturen zu unterdrücken, bei 100 V für etwa 5 h in Laufpuffer (0,5x MEN) aufgetrennt. Als Größenstandart diente eine 0,24 – 9,5 Kb RNA Leiter (GIBCO). Über Nacht wurde die DNA in 20x SSC mittels Kapillartransfer auf Hybond-N Nylon Membran (Amersham) geblottet, 2 min mit Hilfe eines UV Crosslinkers immobilisiert und anschließend noch 2 h bei 80°C im Vakuum gebacken. Die Praehybridisierung (25%[w/v] 20x SSC, 50%[w/v] deionisiertes

Formamid, 1%[w/v] 100x Denhardts, 1%[w/v] 10% SDS, 10%[w/v] 0,1M PIPES pH 6.8) erfolgte 2 h bei 42°C. Nach Zugabe der, mit Radioisotopen markierten Probe, wurde ÜN bei 45°C hybridisiert. Die Filter wurden einmal in 2x SSC, 0,1% SDS bei 45°C und dreimal in 2x SSC, 0,1% SDS bei 65°C je etwa 10 min gewaschen, in Frischhaltefolie eingewickelt und auf Röntgenfilm (Kodak) mit Trimax T16 Verstärkerfolie (3M, Neuss) oder auf einem Phosphorscreen (Molecular Dynamics, Krefeld) exponiert.

### **3.19 “Stripping“ der Membranen zur Wiederverwendung**

Um die Membranen mehrfach benutzen zu können, wurden sie zweimal bei 80°C in 0,1%[w/v] SDS gewaschen um die DNA Sonden zu entfernen. Nach der Hybridisierung mußten die Filter stets feucht gehalten werden.

### **3.20 Markierung von Nukleinsäuren mit Radioisotopen**

Die Markierung der DNA mittels Random Prime Labeling erfolgte mit dem RediprimeII Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig). Hierzu wurde die DNA denaturiert, mit Reagenz-Mix und 50µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP versetzt. Nach Zugabe von T7 DNA Polymerase wurde kurz abzentrifugiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt und konnte nach fünf Minütigem Erhitzen auf 100°C zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

### **3.21 Hefe Transformationen**

Die unten beschriebene (3.21.1) Hefe Transformation für das Two-Hybrid System und weitere Transformations - Methoden sind unter folgender Internetadresse veröffentlicht : [http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human\\_genetics/gietz/Trafo.html](http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human_genetics/gietz/Trafo.html)

#### **3.21.1 Hefe Transformation für das Two-Hybrid System**

Eine Einzelkolonie der Hefe wurde in SD-Medium (+10x Dropout ; +50% Glucose) angeimpft und bei 30°C etwa 21 h geschüttelt, bis die OD<sub>600</sub> = 1 entsprach. Zu 10 ml dieser Kultur wurden 40 ml YPD Medium gegeben und bei 30°C erneut 5 h geschüttelt, bis wiederum eine OD<sub>600</sub> = 1 erreicht war. Nach 5 min Zentrifugation mit 4100 x g wurde das Pellet in 25 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Zugabe von 2,4 ml 45%

PEG, 360µl 1M LiOAc, 50µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), 50µg Plasmid DNA und 450µl H<sub>2</sub>O wurde kurz gevortext, 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend 28 min bei 42°C ein Hitzeschock durchgeführt, bei dem jeweils im Abstand von 5 min die Hefe kurz geschüttelt wurde. Die transformierten Hefen wurden 5 min mit 4100 x g zentrifugiert, das Pellet in 10 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 500µl pro 15 cm Petrischale auf Selektiv-SD Medium ausplattiert. Zur Effizienzkontrolle der Transformation wurden eine 1/10, sowie eine 1/100 Verdünnung ausplattiert. Die Hefen wuchsen innerhalb von 3 – 7 Tagen bei 30°C.

### 3.21.2 Hefe Transformation mit hoher Effizienz

Eine Einzelkolonie der Hefe wurde in 50ml YPD Medium bei 30°C ÜN hochgezogen, am nächsten Morgen 1/10 in 50ml YPD verdünnt, 5 min mit 3000 x g zentrifugiert, das Pellet in 25 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut 5 min mit 3000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 2,4 ml 50% PEG, 360µl 1M LiOAc, 250µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), 0,5 - 1µg Plasmid DNA und 350µl H<sub>2</sub>O wurde stark gevortext, 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend 30 min bei 42°C ein Hitzeschock durchgeführt, bei dem jeweils im Abstand von 5 min die Hefe kurz geschüttelt wurde. Die transformierten Hefen wurden kurz abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 100µl auf Selektiv-SD Medium Platten ausplattiert.

### 3.22 LacZ – Test

Um die Interaktion von Proteinen im Two-Hybrid System zu verifizieren, wurde der LacZ – Test durchgeführt. Hierbei wurde auf die zu untersuchende Hefeplatte für etwa 3min ein Filter (Protran Ba 85, Schleicher & Schuell) aufgelegt, wieder abgezogen und mit der Hefeseite nach oben auf eine Hefe X-Gal Medium Platte gelegt. Je nach Stärke der Interaktion trat die Blaufärbung der Hefen innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde bis zu einer Woche auf.

### 3.23 Two – Hybrid – System

Um die Interaktion zweier Proteine *in vivo* nachzuweisen, wurde ein Two-Hybrid Screen mit dem HybriZAP<sup>®</sup>-2.1 Two-Hybrid Library System (Stratagene) durchgeführt. Hierzu wurde zuerst das zu untersuchende Protein in den Vektor mit der GAL4-Bindedomäne (pBD-GAL4 Cam) kloniert. Um den Background so gering wie möglich zu halten, wurde dieses Konstrukt zusammen mit dem leeren Vektor der Transkriptions-Aktivierungsdomäne (pAD-GAL4-2.1) in Hefe (YRG-2) transformiert und auf SD-Mediumplatten mit verschiedenen Konzentrationen an 3AT ausplattiert. 3AT ist ein Enzymhemmer im Histidin-Stoffwechsel.

Die SD-Platten mit der höchsten Konzentration an 3AT, auf denen noch Kolonien wuchsen, konnten für den eigentlichen Screen verwendet werden. Mit Hilfe der SD-Platten wurde die Selektion durchgeführt. Der pAD-GAL4-2.1 Vektor enthielt einen selektierbaren Marker für Leucin, der pBD-GAL4 Cam Vektor einen selektierbaren Marker für Tryptophan. Desweiteren verfügte der YRG-2 Hefestamm über je ein Reportergen für LacZ und Histidin. Somit hatte man vier Marker zur Verfügung, mit deren Hilfe die Selektion erfolgte. Als nächstes wurden die Kontrollen des Systems in Hefe transformiert und auf den entsprechenden Minimalmedium-Platten ausplattiert. Mit einem anschließenden LacZ-Test konnten die entsprechenden Ergebnisse verifiziert werden. Als nächstes wurde durch eine Testplattierung der Phagentiter der Helferphagen bestimmt, mit deren Hilfe die cDNA Bank aus dem HybriZAP<sup>®</sup>-2.1 Two-Hybrid Vektor in den pAD-GAL4-2.1-Vektor ausgeschnitten wurde (mass excision). Nach einer erneuten Titerbestimmung wurde die ausgeschnittene cDNA-Bank jetzt amplifiziert und die DNA isoliert. Beide Vektoren (pBD-GAL Cam mit dem zu untersuchenden Protein und pAD-GAL4-2.1 mit der DNA der amplifizierten cDNA-Bank) wurden in Hefe transformiert und auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und der vorher ermittelten Menge an 3AT überimpft. Mit den auf diesen Platten gewachsenen Kolonien wurde ein LacZ-Test durchgeführt. Bei den sich blau färbenden Kolonien sollte es sich um die positiven Klone handeln, die mit dem eingesetzten Protein interagieren. Um diese Interaktion zu verifizieren und falsch-positive Klone auszuschließen, wurde die DNA aus diesen Kolonien isoliert und in Bakterien transformiert. Hier wurde mit Hilfe von PCR und Restriktionsverdau das Insert im Vektor überprüft. Handelte es sich bei dem Insert um das gewünschte Produkt, wurde die DNA isoliert und zum einen mit dem leeren pBD-GAL4 Cam - Vektor, zum anderen mit dem pBD-GAL4 Cam - Vektor samt eingesetztem Protein, wieder in Hefe transformiert und auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und der vorher ermittelten Menge an 3AT überimpft. Bei der Transformation mit dem leeren pBD-GAL Cam - Vektor sollten keine Kolonien wachsen, da ja hier der Interaktionspartner fehlte. Die Kolonien der Transformation mit dem pBD-GAL4 Cam - Vektor samt eingesetztem Protein wurden mit dem LacZ-Test untersucht. Bei den sich hierbei blau färbenden Kolonien handelte es sich um die wirklich interagierenden Klone. Die DNA wurde isoliert und sequenziert. Anhand von Datenbankvergleichen konnten weitere Aussagen getroffen werden.

### **3.24 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E.coli***

Die Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus pGEX-Stämmen wurde nach (Smith and Johnson, 1988) leicht verändert.

Eine 50ml Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes wurde in LB Amp angeimpft und am nächsten Morgen in 450 ml LB Amp überimpft. Nach 1,5 – 2 Stunden Inkubation auf einem Rotationsschüttler bei 37°C war eine  $OD_{600}$  von etwa 0,6 erreicht. 1 ml Probe wurde entnommen, abzentrifugiert und das Pellet aufbewahrt. Die 500 ml Kultur wurde mit 5ml 0,1M IPTG für 3 – 5 Stunden bei 37°C induziert. Erneut wurde 1 ml Probe entnommen, abzentrifugiert und das Pellet aufbewahrt. Die große Kultur wurde 10 min mit 4000x g bei 4°C zentrifugiert, das Pellet in 9ml MTBS resuspendiert, 10 mg Lysozym zugeben, 15 min auf Eis inkubiert, 3 x 15 sec sonifiziert und 15 min mit 12000 x g bei 4°C pelletiert. Zum Überstand wurde 1ml gequollene Glutathione-Agarose (Sigma) gegeben, 30 min bei 4°C auf einem Roller inkubiert und dann 1 min mit 1000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Probe aufbewahrt. Die Glutathione-Beads wurden 5x mit 2 ml MTBS gewaschen und anschließend 2x in Tris pH8, 50 mM reduced Glutathione (Sigma) eluiert. Die verschiedenen Proben, sowie das Eluat, welches das saubere Protein enthielt, wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Protein wurde bei –70°C gelagert.

### **3.25 Auftrennung von Proteinen**

#### **3.25.1 Auftrennung von Proteinen durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen im denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgte nach (Laemmli, 1970). Je nach Molekulargewicht der Proteine wurden verschiedene Anteile von Acrylamid im Trenngel verwendet. Zumeist wurde ein 10%iges Trenngel (10%[w/v] Acrylamid, 0,1%[w/v] SDS, 0,1%[w/v] APS, 0,04%[w/v] TEMED, 0,375 M Tris, pH 8,8) und ein 4%iges Sammelgel (4%[w/v] Acrylamid, 0,1%[w/v] SDS, 0,05%[w/v] APS, 0,1%[w/v] TEMED, 0,125 M Tris, pH 6,8) mit einer Dicke von 1,5mm verwendet. Als Laufpuffer wurde 0,3%[w/v] Tris, 1,4%[w/v] Glycin, 0,1%[w/v] SDS eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proteine für 3 min auf 100°C erhitzt, anschließend kurz abzentrifugiert und der Überstand aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 Volt. Anschließend konnten die Proteine angefärbt oder geblottet werden.

#### **3.25.2 Auftrennung von Proteinen durch Acid-Urea-Triton-X-100 (AUT)**

##### **Polyacrylamidgelelektrophorese**

Das Protokoll der AUT-Gele wurde nach (Thiriet and Albert, 1995) verändert. Das Trenngel (8M Harnstoff, 12%[w/v] Acrylamid (30%[w/v] Acrylamid / 0,8%[w/v] bis-Acrylamid), 5%[w/v] Essigsäure, 0,5%[w/v] TEMED, 0,06%[w/v] APS, 6mM Triton-X-100) wurde vor

der Zugabe von TEMED und Triton-X-100 entgast. Nach der Polymerisierung wurde das Sammelgel (3M Harnstoff, 12%[w/v] Acrylamid (30%[w/v] Acrylamid / 1,6%[w/v] bis-Acrylamid), 5%[w/v] Essigsäure, 0,5%[w/v] TEMED, 0,1%[w/v] APS, 6mM Triton-X-100) gegossen. Die Proben wurden in Ladepuffer (3M Harnstoff, 5%[w/v] Essigsäure, 4%[w/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und im Gel in Laufpuffer (1,4%[w/v] Glycin, 1,3%[w/v] Essigsäure) bei 30mA aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine geblottet.

## **3.26 Proteinfärbungen**

### **3.26.1 Coomassie Brilliant Blue - Färbung**

Proteine können mit Coomassie Brilliant Blau Färbelösung (0,25 % [w/v] Coomassie Brilliant Blau R 250; 50 % [v/v] Methanol und 7 % [v/v] Essigsäure) im Polyacrylamidgel angefärbt werden (modifiziert nach Weber and Osborn, 1969). Das Gel wurde für etwa 20 min in die Färbelösung und anschließend für mehrere Stunden zusammen mit einem Stück Filterpapier oder einem kleinen Schwamm, der die Farbe besser aufnahm, in die Entfärbelösung (40 % [v/v] Methanol; 7 % [v/v] Essigsäure) gelegt.

### **3.26.2 Ponceau – S – Färbung**

Auf Nitrozellulosemembranen geblottete Proteine konnten mit Hilfe der Ponceau-S-Färbung (Salinovich and Montelaro, 1986) sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde die Membran nach dem Blotten für etwa 15 min in der Ponceau-S-Färbelösung (0,5 % Ponceau-S; 3 % TCA) unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O einige Minuten wieder entfärbt. Die Membran konnte jetzt fotografiert, mit H<sub>2</sub>O weiter entfärbt und für den Immunologischen-Nachweis der Proteine verwendet werden.

## **3.27 Protein Transfer auf Nitrozellulose (Western Blot)**

Der Protein Transfer auf Nitrozellulose wurde nach (Towbin et al., 1979) und (Burnette, 1981) verändert.

### **3.27.1 Tank – Elektroblot von Proteinen**

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden auf Protran Nitrozellulose (Schleicher & Schuell, 0,45  $\mu$ m) im kontinuierlichen Puffersystem übertragen. Auf eine Lochplatte wurden luftblasenfrei je ein Fließpapier, drei Gel-Blotting-Papiere (Schleicher &

Schuell ), das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, drei Gel Blotting Papiere, ein Fließpapier und die obere Lochplatte gelegt. Die Nitrozellulosemembran zeigte zur Anode. Der zusammengesetzte Blot wurde in die mit Blotpuffer gefüllte Wanne gegeben und bei 4 °C für mindestens 3 h bei 400 mA geblottet.

### **3.27.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Antikörpern**

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran für 1h unter Schütteln in 50 ml Blocklösung gegeben. Hierbei wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. In der, mit dem ersten Antikörper versetzten Blocklösung wurde der Filter für ca. 3 Stunden inkubiert, anschließend 2 x 15 min in TTBS gewaschen und in der mit dem zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, versetzten Blocklösung für eine weitere Stunde geschüttelt. Danach wurde der Filter 5 x in TTBS gewaschen.

### **3.27.3 Nachweis von Proteinen mit dem ECL Immunodetektionsverfahren**

Das ECL Immunodetektionsverfahren (nach Amersham Pharmacia, modifiziert) basiert auf Chemolumineszenz. Der an Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper wurde an den primären Antikörper gebunden. Es entsteht ein chemolumineszierendes Produkt durch die Peroxidase katalysierte Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid. Damit kann das, durch den primären Antikörper erkannte Protein auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran in einem Gemisch (1:1) der Komponenten 1 und 2 für eine Minute geschwenkt, auf Whatmann Papier abgetupft, in Folie eingewickelt und für einen Zeitraum von 10 Sekunden bis zu 1,5 h (je nach Antikörper) auf einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert.

## **3.28 *In vitro* GST Pull-Down Assay**

Der *in vitro* Pull-Down Assay wurde nach (Goldstein et al., 1999) verändert. Glutathione-Agarose (Sigma) wurde in Bindepuffer (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1%[w/v] NP40 (Igepal Ca-630, Sigma) für 1Stunde bei 4°C äquibriert. 20µl der Agarose-Beads wurden dann mit etwa 10µg GST-Fusionsprotein für 30min bei 4°C auf einem Roller inkubiert, eine Minute mit 1000x g zentrifugiert und anschließend mit 500µl Bindepuffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 1000x g wurden die Beads in 300µl Blockpuffer (Bindepuffer mit 5mg/ml Milchpulver) resuspendiert, erneut 30min bei 4°C gerollert und anschließend mit 500µl Bindepuffer gewaschen. Nach einer Zentrifugation



von einer Minute mit 1000x g wurden die Agarose-Beads in 200µl Blockpuffer resuspendiert und mit 5µl des zweiten, mit <sup>35</sup>S-Methionin translatierten Proteins, für eine Stunde bei 4°C gerollert. Die Beads wurden anschließend drei mal mit 1ml Bindepuffer gewaschen, mit Proteinladepuffer (Roti®-Load1, Roth, Karlsruhe) versetzt, 5min auf 100°C erhitzt, abzentrifugiert und der Überstand im PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für eine Stunde fixiert (40%[v/v] Methanol / 10%[v/v] Essigsäure), 90min auf einem Vakuumtrockner bei 60°C getrocknet und auf einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert.

### **3.29 Isolierung von Nucleosomen aus Mais-Schößlingen**

Die Isolierung der Nucleosomen aus Mais-Schößlingen wurde nach (Moehs et al., 1988) und (Spiker, 1984) verändert und alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

100g Mais-Schößlinge wurden in einem Küchenmixer mit 300ml Lösung 1 (0.4M Saccharose, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM β-Mercaptoethanol, 0,1mM PMSF) gemixt, durch 3 Lagen Miragloth (Calbiochem, Merck, Darmstadt) filtriert und 10min bei 12000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lösung 2 (0.25M Saccharose, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1%[w/v] Triton X-100, 5mM β-Mercaptoethanol, 0,1mM PMSF) gewaschen, 10min bei 12000x g zentrifugiert und das Pellet mit Lösung 3 (1.7M Saccharose, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0,15%[w/v] Triton X-100, 5mM β-Mercaptoethanol, 0,1mM PMSF) gemörsert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30min bei 27000x g wurde das Pellet zweimal mit Lösung 4 (75mM NaCl, 25mM EDTA, 12mM NaHSO<sub>3</sub>, 0.1mM PMSF) gewaschen und mit Lösung 5 (0,35M NaCl, 1mM Tris pH8, 0.1mM PMSF) mit einem Glasmörser mit Teflonpistill homogenisiert. Nach einer Zentrifugation von 10min mit 12000xg befanden sich die Nucleosomen im Pellet und die HMG-Proteine im Überstand. Beide Fraktionen wurden bei -80°C gelagert.

### **3.30 Isolierung von Histonen aus Nucleosomen**

Das Protokoll zur Isolierung von Histonen aus Nucleosomen wurde nach (Simon and Becker, 1976) verändert und alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

Die Nucleosomen wurden in 1.5mM NaCitrat (pH7.0)/15mM NaCl auf eine Konzentration von 0.5mg/ml eingestellt und anschließend mit 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tropfenweise bis zu einer Konzentration von 0.1M verdünnt. Die Lösung wurde 4h auf Eis gerührt, 10min bei 10000x g zentrifugiert und der Überstand auf Eis gelagert. Das Pellet wurde erneut in 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resuspendiert, 4h auf Eis gerührt und 10000x g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit drei Volumen eiskaltem absoluten Ethanol für 48h bei -80°C gefällt. Das Pellet wurde 2x mit eiskaltem, 95% Ethanol, gewaschen, getrocknet und bei 4°C gelagert.

### 3.31 *In vitro* Acetylierung von Histonen

Die Acetylierung von Histonen wurde nach einem Protokoll von (Kuo et al., 1996) verändert. In einem Probenvolumen von 50µl wurden 50mM Tris-HCl, pH8.0, 10% Glycerol, 1mM DTT, 10mM Buttersäure, 0,2µCi <sup>3</sup>H-Acetyl Coenzym A (5-6Ci/mmol), 25µg Kalbs-Thymus Histone (Typ IIA, Sigma) und 5µl GST-Fusionsprotein 20 min bei 28°C inkubiert und nach (Horiuchi and Fujimoto, 1975) auf P81 Filter (Whatman) gespottet. Die Filter wurden für 30 min bei 37°C in 0,05M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.2 inkubiert und anschließend erst in Azeton, dann in Methanol / Chloroform (1:2) gewaschen, 5 min getrocknet und in Scintillationsflüssigkeit (Protein Ready<sup>+</sup>) in einem Scintillationszähler (Beckman Coulter, München) ausgewertet. Um den Hintergrund durch unspezifische Zählimpulse zu reduzieren, wurde 15 min lang gezählt.

### 3.32 Fluorographie – Nachweis radioaktiv markierter Proteine

Da die mit <sup>3</sup>H markierten Histone nicht direkt auf einem Röntgenfilm nachweisbar sind, da die Reichweite der β- Strahlen zu gering ist, wurde ein Fluorogramm (verändert nach Laskey and Mills, 1977 und Bonner and Laskey, 1974) angefertigt. Hierzu wurden die acetylierten Histone auf einem 10% PAA Gel aufgetrennt. Das Gel wurde für 2 h in 40%[v/v] Methanol / 10%[v/v] Essigsäure fixiert, 2 x 30 min in DMSO, sowie 2 h in Rotifluoroszint<sup>®</sup>D inkubiert, 2 x 30 min in H<sub>2</sub>O gewässert und anschließend 1,5 h auf einem Vakuumtrockner bei 60°C getrocknet. Da die Strahlung sehr gering war, wurde das Gel für eine Woche auf einem Röntgenfilm (Kodak) mit Trimax T16 Verstärkerfolie (3M, Neuss) bei -70°C exponiert.

### 3.33 Transiente Genexpression in Tabakprotoplasten

#### 3.33.1 Isolierung von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1

Tabakpflanzen der Varietät Petit Havana SR1 (Maliga et al., 1973) wurden auf hormonfreiem MS-Medium (Fertigsalz der Firma Duchefa, Murashige und Skoog, 1962) in steriler Kultur bei 24°C gehalten. Zur Isolierung der Protoplasten wurden 5g Blattmaterial in 100ml K3-Lösung mit 0,1% Cellulase (Sigma) und 0,4% Macerozym R10 (Serva) bei 28°C über Nacht im Dunkeln inkubiert. Durch langsames Schwenken wurden die Protoplasten aus dem Gewebe gelöst und durch Filtration durch ein 100µm Sieb von Geweberesten getrennt. Eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 100x g separierte die floatierenden Protoplasten von den pelletierten Zelldebris. Medium und Gewebereste wurden mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt und die Protoplasten mit W5-Lösung durch eine weitere Zentrifugation bei 100x g

pelletiert. Anschließend wurden die Protoplasten in MaMg-Lösung resuspendiert, gezählt und auf eine Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen /ml eingestellt.

### **3.33.2 Isolierung von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* L. cv. BY2**

100ml einer 3-4 Tage alten BY2-Zellsuspension wurden durch ein 50 $\mu$ m Sieb in einen Erlenmeyerkolben geben und mit 10ml MaMg-Lösung gewaschen. Die Protoplasten wurden anschließend bei 28°C für mindestens zwei Stunden auf einem Rotationsschüttler mit 60upm in 40ml Enzymlösung (450mM Mannitol, 1%[w/v] Cellulase, 0,1%[w/v] Pectolyase) verdaut. Eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 100x g separierte die floatierenden Protoplasten von den pelletierten Zelldebris. Medium und Gewebereste wurden mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt und die Protoplasten mit W5-Lösung durch eine weitere Zentrifugation bei 100x g pelletiert. Anschließend wurden die Protoplasten in MaMg-Lösung resuspendiert, gezählt und auf eine Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen /ml eingestellt.

### **3.33.3 Transfektion von Tabak-Protoplasten für GFP-Fusionen**

330 $\mu$ l Protoplasten in MaMg-Lösung wurden mit 600 $\mu$ l 25% PEG 1500, je 5 $\mu$ g Plasmid-DNA und 50 $\mu$ g Lachsspermien-DNA gemischt und anschließend für 20min bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Die Protoplasten wurden mit K3-Lösung auf 10ml aufgefüllt und anschließend 20-24 Stunden erneut bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

### **3.33.4 Transfektion von Tabak-Protoplasten für GUS-Fusionen**

330 $\mu$ l Protoplasten in MaMg-Lösung wurden mit 600 $\mu$ l 25% PEG 1500, je 5 $\mu$ g Plasmid-DNA und 50 $\mu$ g Lachsspermien-DNA gemischt und anschließend für 20min bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Die Protoplasten wurden mit K3-Lösung auf 10ml aufgefüllt und anschließend 20-24Stunden erneut bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 8ml W5-Lösung wurden die Protoplasten fünf Minuten bei 100x g zentrifugiert, in 1ml W5 resuspendiert und in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 13.000x g erneut für 1min pelletiert. Das Pellet wurde bis zur Bestimmung der  $\beta$ -Glukuronidaseaktivität in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.33.5 Fluorometrische $\beta$ -Glukuronidaseaktivitätsbestimmung

Die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität in transfizierten Tabakprotoplasten erfolgte mit Hilfe des Substrates 4-MUG (4-Methyl-Umbelliferyl-Glukoronid, Sigma). Die zu testende Protoplastenpräparation wurde dazu in 100 $\mu$ l Aufschlußpuffer (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 10mM EDTA, 0,1% Triton-X100, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert. Eine 10 $\mu$ g Protein entsprechende Menge des Extraktes wurde mit Aufschlußpuffer auf ein Volumen von 60 $\mu$ l verdünnt, anschließend mit 20 $\mu$ l 4-MUG (4mM in Aufschlußpuffer) versetzt und bei 37°C inkubiert. In Zeitabständen von jeweils 15min wurden zur Erstellung einer Enzymkinetik 10 $\mu$ l Aliquots aus der Reaktion entnommen, welche durch Versetzen mit 1ml 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt wurden. Die Messung der Fluoreszenz (365nm Anregung, 455nm Emission) erfolgte an einem Lumineszenz Spektrometer (LS30, Perkin Elmer).

Die Proteinkonzentration der Protoplastenextrakte wurde nach (Bradford, 1976) mit einem Biorad-Testsystem nach Herstellerangaben bestimmt, wobei BSA-Standardkonzentrationen zur Kalibrierung dienten.

### 3.34 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

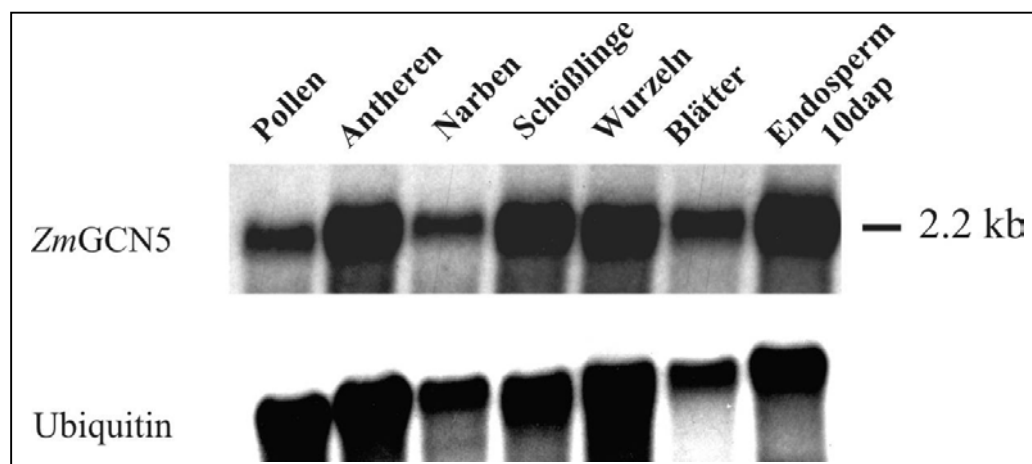
*Arabidopsis* Pflanzen wurden für sechs Wochen unter Gewächshausbedingungen (16 Stunden Licht, 25°C Tag/ 15°C Nacht) in Einheitserde (ED73) angezogen. Eine einzelne Kolonie Agrobakterien mit dem entsprechenden Plasmid wurde bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 0.8 in YEB-Medium angezogen. Die Pflanzen wurden über Kopf in die Agrobakterienlösung getaucht und für etwa 20min im Vakuum von 1bar inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen zurück ins Gewächshaus gebracht, wo sie bis zur Ausreifung der Samen verblieben. Die Samen wurden mit eine Woche getrocknet, 10min sterilisiert (10% NaOCl, 0,1% SDS), mehrmals gründlich mit sterilem Wasser gewaschen und auf Petrischalen mit MS-Medium (50 $\mu$ g/ml Kanamycin, 500 $\mu$ g/ml Claforan) ausplattiert. Die Platten wurden für 48 Stunden bei 4°C und anschließend im Kulturraum (16Stunden Licht, 25°C) gelagert. Die resistenten Pflanzen wurden dann in Erde umgetopft und ins Gewächshaus gebracht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung von *ZmGCN5*

#### 4.1.1. Northern Blot Analyse von *ZmGCN5*

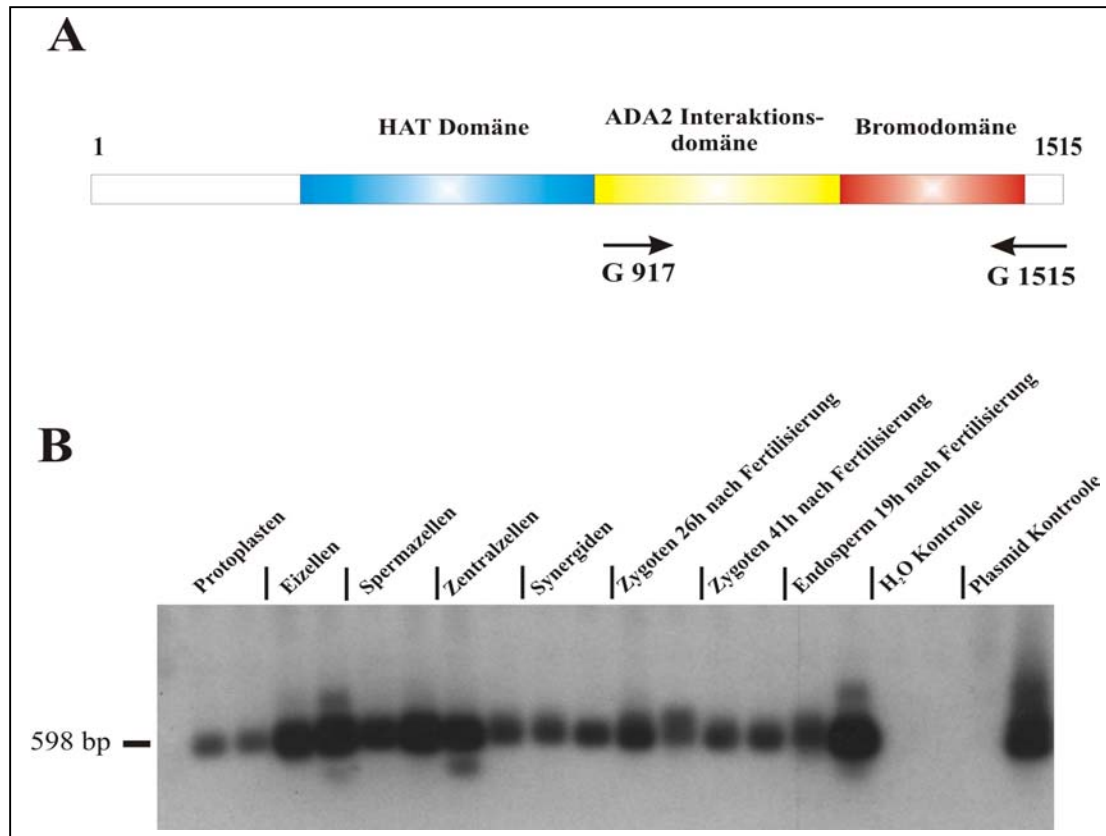
Bereits bei früheren Experimenten (Riehl, 1999) konnte in verschiedenen Maisgeweben nur eine homologe Sequenz von *GCN5* (Acc. Nr.: AJ428540) detektiert werden, was darauf hindeutet, daß es sich bei *ZmGCN5* um ein Gen mit nur einer Kopie handelt. Zur Vervollständigung dieser Ergebnisse wurden weitere Gewebe anhand von Northern Blot Untersuchungen bearbeitet. Hierzu wurden jeweils 10µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Pollen, Antheren, Narben, Schößlingen, Wurzeln, Blättern und Endosperm 10 Tage nach Bestäubung (days after pollination - dap) aus der Mais Linie A69Y isoliert, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *ZmGCN5* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde unter den gleichen Bedingungen hybridisiert. Wie in Abb. 4.1.1. zu erkennen ist, wird das *ZmGCN5* Transkript in allen untersuchten Geweben exprimiert. Unter Berücksichtigung der Ladungskontrolle sind keine größeren Unterschiede in der Stärke der Expression innerhalb der verschiedenen Maisgewebe zu erkennen.



**Abb. 4.1.1. : Northern Blot verschiedener Maisgewebe mit der *ZmGCN5* Sonde.** Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Pollen, Antheren, Narben, Schößlingen, Wurzeln, Blättern und Endosperm wurden aus der Mais Linie A69Y isoliert, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *ZmGCN5* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.

#### 4.1.2. Untersuchung der Expression von *ZmGCN5* mittels Einzelzellen-PCR verschiedener Zelltypen

Es konnte bereits in früheren Experimenten durch Northern Blot Analyse (Riehl, 1999) sowie *in situ* Hybridisierung (Geraldina Santandrea, persönliche Mitteilung) gezeigt werden, daß *ZmGCN5* in Maiskörnern bereits ab einem Stadium von drei Tagen nach der Bestäubung exprimiert wird. Daraufhin ergab sich die Fragestellung, ob *ZmGCN5* bereits in Spermazellen oder Eizellen exprimiert wird. Zur Analyse der Expression in Eizellen, Spermazellen und den frühen Entwicklungsstadien der Maiskorntwicklung wurden Einzelzellen-PCR Experimente in Zusammenarbeit mit PD Dr. Erhard Kranz (Institut für Allgemeine Botanik, AMP II, Universität Hamburg) durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Zelltypen der Mais-Inzuchtlinie A188 isoliert und das *ZmGCN5* Transkript mit Hilfe von genspezifischen Primern (Abb. 4.1.2. A) in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch Southern-Blot Technik mittels einer *ZmGCN5*-spezifischen Sonde nachgewiesen (Abb. 4.1.2. B). Wie zu erkennen ist, konnte das *ZmGCN5*-Transkript in Eizellen, Spermazellen, Zentralzellen, Synergiden, Zygoten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Fertilisation und in Endosperm nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle dienten hierbei Protoplasten, bei denen aus vorherigen Experimenten bekannt war, daß *ZmGCN5* exprimiert wird, als auch eine Plasmid Kontrolle. Als Negative Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O anstelle von Zellen in die PCR eingesetzt, was zu keiner Amplifikation in der PCR-Reaktion führte. Die mit der Einzelzellen-PCR gewonnenen Ergebnisse bestätigen und ergänzen die zuvor durch Northern-Blot erzielten Resultate, bei denen das *ZmGCN5*-Transkript in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte. Diese Resultate, vor allem auch der Nachweis in Eizellen, Spermazellen und den frühen Stadien der Embryoentwicklung weisen auf eine zentrale Rolle von *ZmGCN5* während der Transkription hin, wie es auch für andere *GCN5*-Gene in verschiedenen anderen Spezies (z.B. Hefe, Maus, Mensch, Drosophila) gezeigt werden konnte.

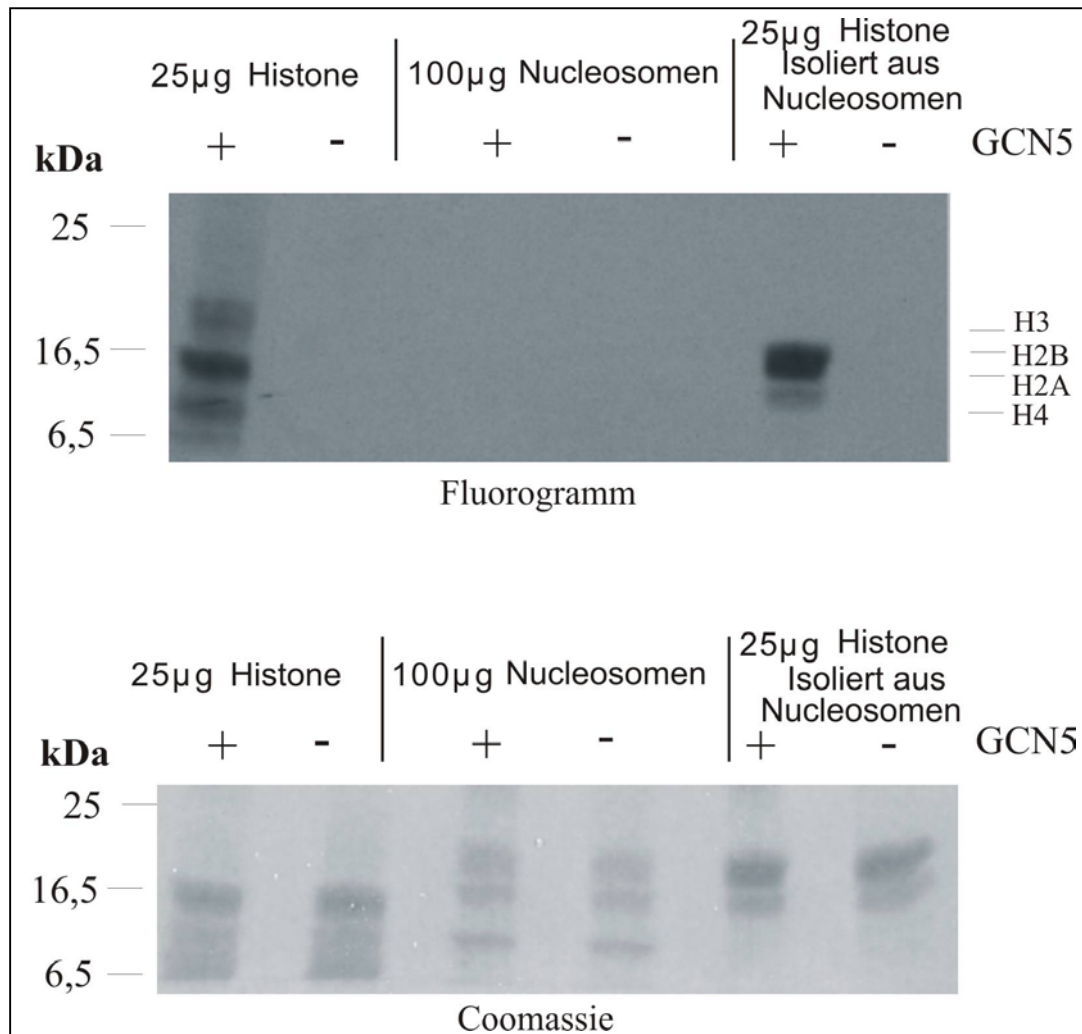


**Abb. 4.1.2. : *ZmGCN5* kann mit Hilfe der Einzelzellen-PCR in den verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden.** Einzelne Zellen verschiedener Zelltypen wurden isoliert, *ZmGCN5* mit Hilfe von PCR amplifiziert (A) und nach Transfer der PCR-Produkte auf Hybond-Membran mit einer *ZmGCN5*-Sonde nachgewiesen (B).

### 4.1.3. Überprüfung der Histonacetylierung von Nucleosomen und Histonen durch *ZmGCN5*

GCN5 wurde in verschiedenen Spezies jeweils als Teil von Multiproteinkomplexen isoliert. Lange Zeit wurde angenommen, daß GCN5 nur im Zusammenspiel mit anderen Mitgliedern dieser Komplexe in der Lage ist, Nucleosomen, das natürliche Ziel von Histonacetyltransferasen, zu acetylieren. Mit Hilfe von isoliertem GCN5-Protein konnten lediglich freie Histone acetyliert werden. Lediglich die beiden längeren Transkripte von GCN5 in Mensch und Maus mit den N-terminalen Homologien zum PCAF Protein waren in der Lage, Histone im Nucleosom zu acetylieren (Yang et al., 1996; Xu et al., 1998). Untersuchungen von (Tse et al., 1998) zufolge ist isoliertes Hefe-GCN5 ebenso unter bestimmten Salzbedingungen in der Lage, sowohl freie Histone, als auch Histone im Nucleosom zu acetylieren.

Die mRNA von GCN5 aus Mäusen und dem Menschen wird alternativ gespliced, so daß hier jeweils zwei Formen auftreten, von denen die kürzere nur freie Histone acetylieren kann, die längere jedoch auch in der Lage ist, Histone im Nucleosom zu acetylieren (Yang et al., 1996; Xu et al., 1998). Die längeren N-terminalen Domänen der GCN5 Proteine von Mais, Arabidopsis und Taxoplasma zeigen keine Homologie zum PCAF Protein.



**Abb. 4.1.3. : ZmGCN5 acetyliert Histone aber keine Nucleosomen.** Histone und Nucleosomen wurden aus Maiskeimlingen der Wildtyplinie A188 isoliert, mit ZmGCN5 acetyliert und anschließend auf einem 12% PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und ein Fluorogramm erstellt.

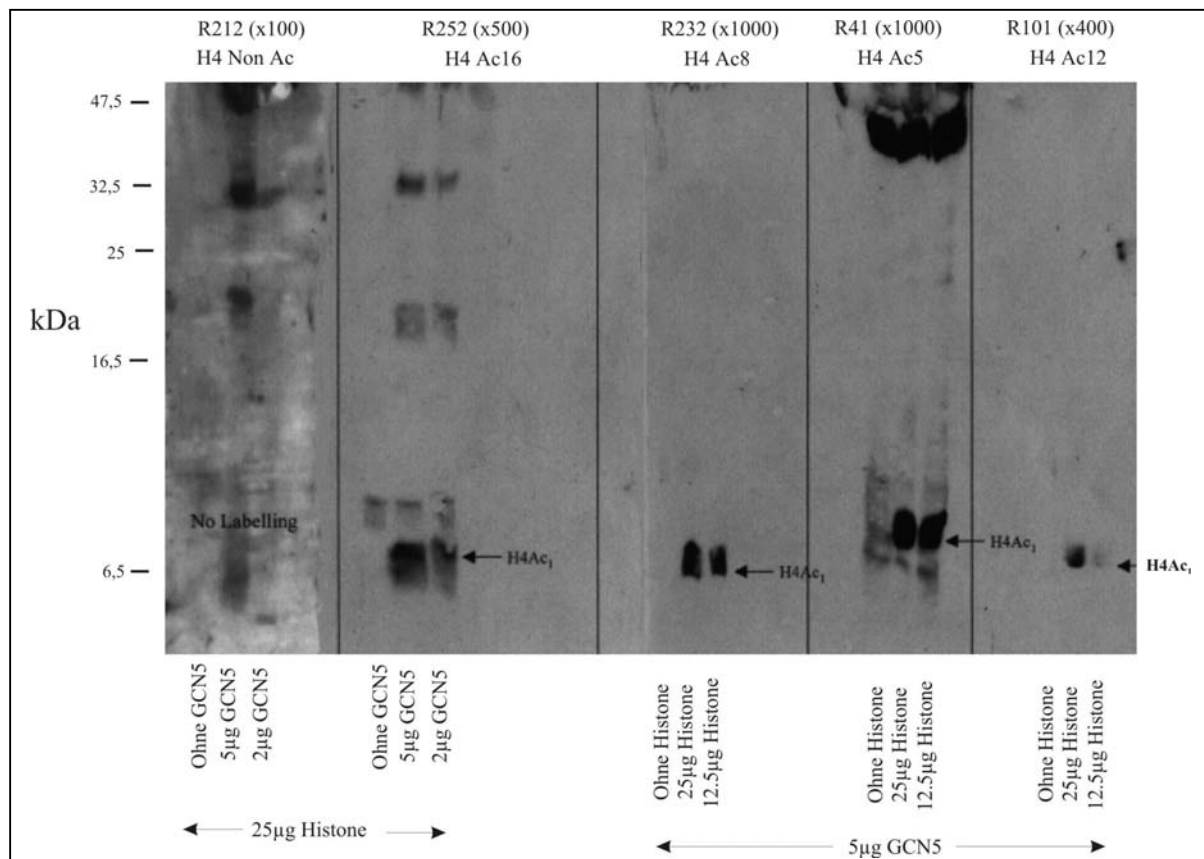
Zur Charakterisierung der Acetylierungseigenschaften von ZmGCN5 wurden Nucleosomen aus Maiskeimlingen der Wildtyplinie A188 isoliert. Um nachweisen zu können, daß diese Nucleosomen nicht degradiert waren, wurden Histone aus diesen Nucleosomen isoliert. Als Kontrolle dienten Kalbs-Thymus Histone (Typ IIA, Sigma). Wie in Abb. 3.1.3. zu erkennen ist, konnte in *E.coli* exprimiertes ZmGCN5 sowohl die Kalbs-Thymus Histone, als auch die, aus den Nucleosomen isolierten Histone acetylieren. Die Nucleosomen konnten durch



ZmGCN5 auch unter den, von (Tse et al., 1998) verwandten Salzbedingungen, nicht acetyliert werden. Zum Nachweis der Acetylierung wurden die Histone und Nucleosomen auf einem 12% PAA-Gel aufgetrennt und das eingebaute  $^3\text{H}$  mittels Fluorogramm nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt.

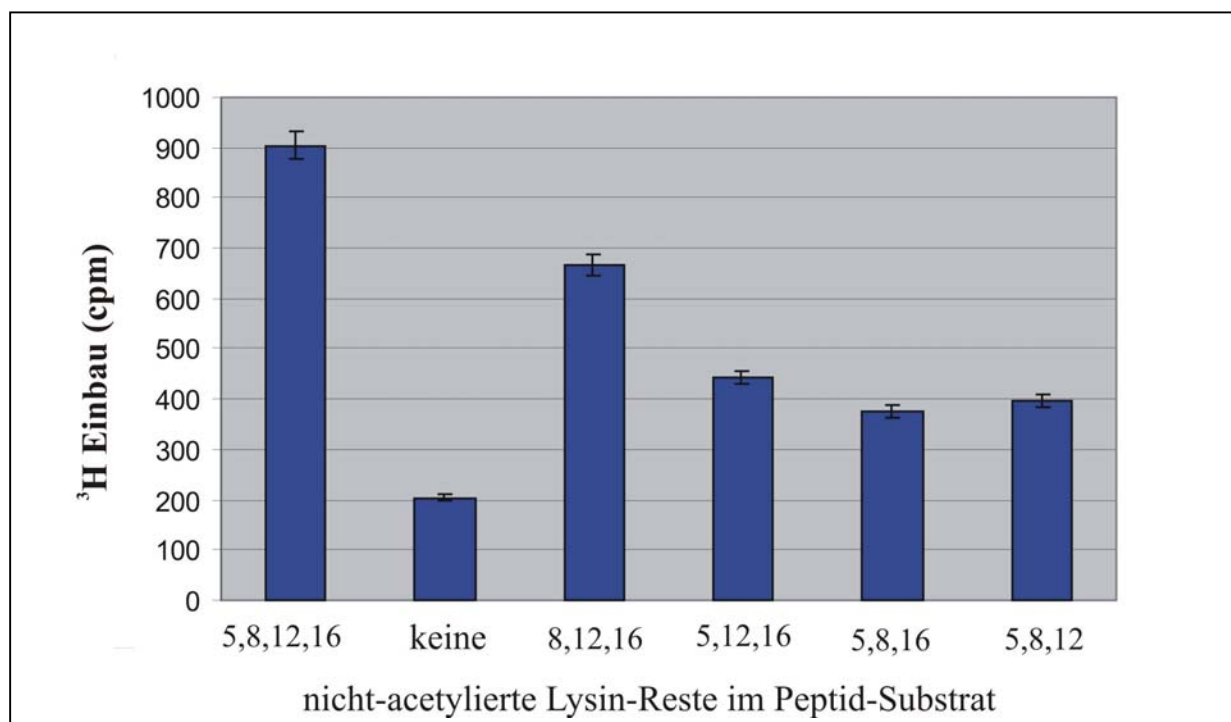
#### 4.1.4. Identifizierung der Lysin-Reste in Histon H4, die durch ZmGCN5 acetyliert werden

Das Histon H4 weist in seinem N-terminus vier Lysin-Reste als mögliche Acetylierungsstellen auf. Um zu analysieren, welche dieser Lysin-Reste von ZmGCN5 acetyliert werden, wurden Kalbs-Thymus Histone mit in E.coli exprimierten ZmGCN5 acetyliert, in AUT-Gelen (Acid-Urea-Triton-Gele zur Auftrennung kleiner Proteine und Peptide) aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die Filter wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen die vier möglichen Acetylierungsstellen des Histons H4 geprobt (Kooperation mit Prof. Dr. Bryan Turner, Institut für Anatomie, Universität Birmingham). Wie zu erkennen ist, konnten alle vier möglichen Lysin-Reste des Histons H4 acetyliert werden (Abb. 4.1.4.1.).



**Abb. 4.1.4.1. : Acetylierung der Lysin-Reste 5, 8, 12 und 16 von Histon H4 durch in E.coli expremiertes ZmGCN5-Protein .** Histone wurden durch in E.coli expremiertes ZmGCN5-Protein acetyliert, in AUT-Gelen aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembranen geblottet. Die Filter wurden mit spezifisch gegen die Lysin-Reste 5, 8, 12 und 16 von Histon H4 gerichteten Antikörpern inkubiert.

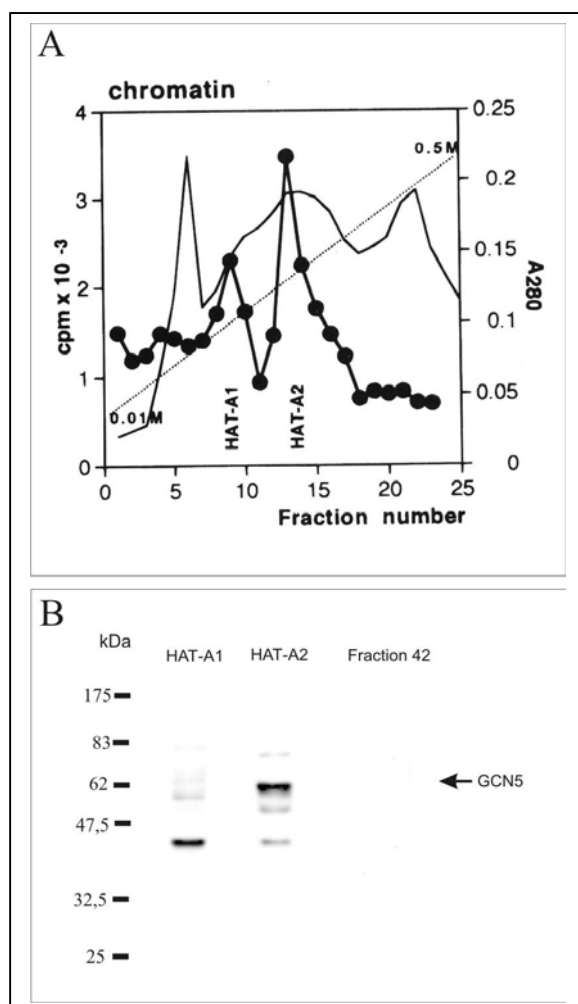
Zur Überprüfung der Ergebnisse, die die Acetylierung aller vier Lysin-Reste im Histon H4 mit Hilfe der Antikörpern zeigen, wurden Peptide als Substrat für die Acetylierungsreaktion verwendet, bei denen jeweils ein Lysin-Rest des Histons H4 acetyliert, die anderen drei Reste allerdings nicht acetyliert waren. Als Kontrolle dienten zum einen Peptide, bei denen alle Lysin-Reste bereits acetyliert waren und zum anderen Peptide, bei denen alle vier Acetylierungsstellen noch frei vorlagen. Erneut wurde in *E.coli* exprimiertes ZmGCN5 als Enzym verwendet. Der Enzymreaktion wurde anhand des  $^3\text{H}$  Einbaus in Acetyl-CoA mit Hilfe eines Scintillationszählers ermittelt. Wie in Abb. 4.1.4.2. zu erkennen ist, konnte in allen vier Peptiden, in denen nur drei Lysin-Reste acetyliert waren, eine Zunahme des  $^3\text{H}$  Einbaus durch die Acetylierung des letzten Restes beobachtet werden. Die Acetylierung aller vier Reste in der Kontrolle zeigte wie erwartet einen stärkeren  $^3\text{H}$  Einbau, während der Acetylierungsversuch des Peptides, bei dem keine weitere Acetylierungsposition verfügbar war, auch zu keinem Einbau von  $^3\text{H}$  geführt hat. Dieses Ergebnis unterstützt die vorherige Beobachtung, daß ZmGCN5 in der Lage ist, die vier Lysin-Reste 5, 8, 12 und 16 des Histons H4 zu acetylieren.



**Abb. 4.1.4.2. : Acetylierung von Lysin-Resten 5, 8, 12 und 16 in Peptiden des Histons H4 durch ZmGCN5.** Peptide des Histons H4, in denen jeweils einer der vier Lysin-Reste nicht acetyliert war, wurden durch in *E.coli* exprimiertes ZmGCN5-Protein acetyliert.

#### 4.1.5. ZmGCN5 kommt auch in Mais in Komplexen vor

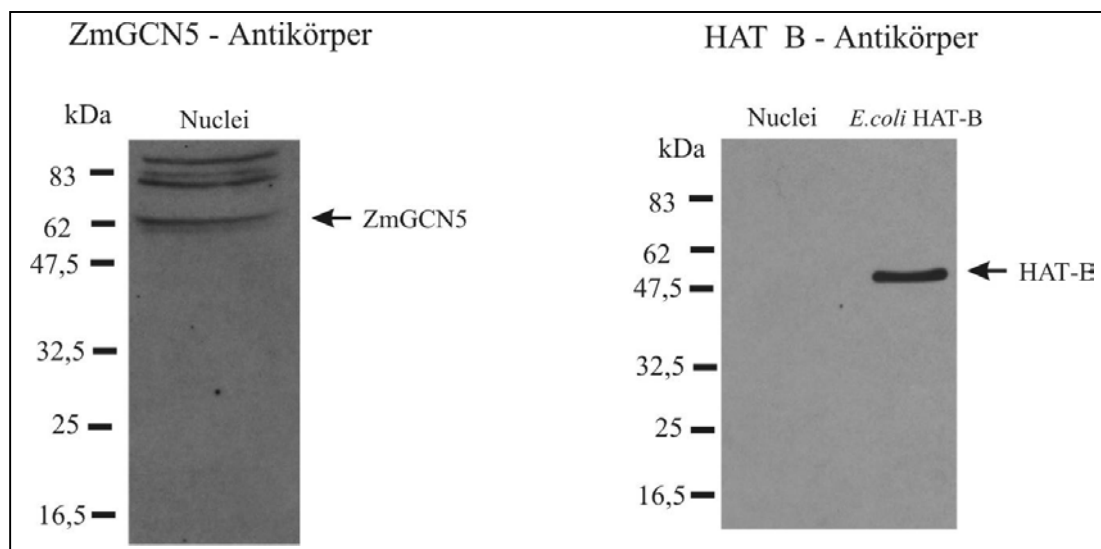
In Hefe konnte bereits früh gezeigt werden, daß GCN5 in verschiedenen Multiproteinkomplexen vorkommt. Später wurde auch für andere Mitglieder der GCN5 Familie ein Vorhandensein in Komplexen nachgewiesen. Im Labor von Peter Loidl (Institut für Mikrobiologie, Universität Innsbruck) wurden in den Chromatinfractionen von Mais-Embryonen zwei Histonacetyltransferase-Aktivitäten, als Bestandteile von Multiproteinkomplexen, nachgewiesen (Abb. 4.1.5.A). Diese beiden Aktivitäten sind in der Lage, Histone zu acetylieren und wurden als HAT-A1 und HAT-A2 bezeichnet (Grabher et al., 1994). Jeweils 10µg der HAT-A1 und der HAT-A2 Fraktionen der Komplexe wurden im 10% PAA-Gel aufgetrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5-Antikörper geprobt. Als negative Kontrolle diente Fraktion 42, die keine HAT-Aktivität aufwies. Abb. 4.1.5.B zeigt die, mit dem anti-ZmGCN5-Antikörper geprobtene Proteinfractionen. Wie deutlich zu erkennen ist, weist die HAT-A2 Fraktion einen hohen Anteil an ZmGCN5 auf. In der HAT-A1 Fraktion konnte ZmGCN5 nur in sehr geringen Mengen detektiert werden. Die Negativkontrolle (Fraktion 42) weist kein GCN5 Signal auf. Diese Ergebnisse zeigen, daß ZmGCN5, wie auch die anderen Mitglieder der GCN5-Familie in Komplexen vorkommt, daß aber auch eine weitere HAT-Aktivität in Mais existiert.



**Abb. 4.1.5. : ZmGCN5 ist hauptsächlich im HAT-A2 Komplex vorhanden.** Jeweils 10µg der HAT-A1 und HAT-A2 Fraktionen aus (A) wurden im 10% PAA-Gel aufgetrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5-Antikörper geprobt (B). Als negative Kontrolle diente Fraktion 42, die keine HAT-Aktivität zeigt hat.

#### 4.1.6. In Nuclei ist ZmGCN5 vorhanden, nicht aber HAT-B

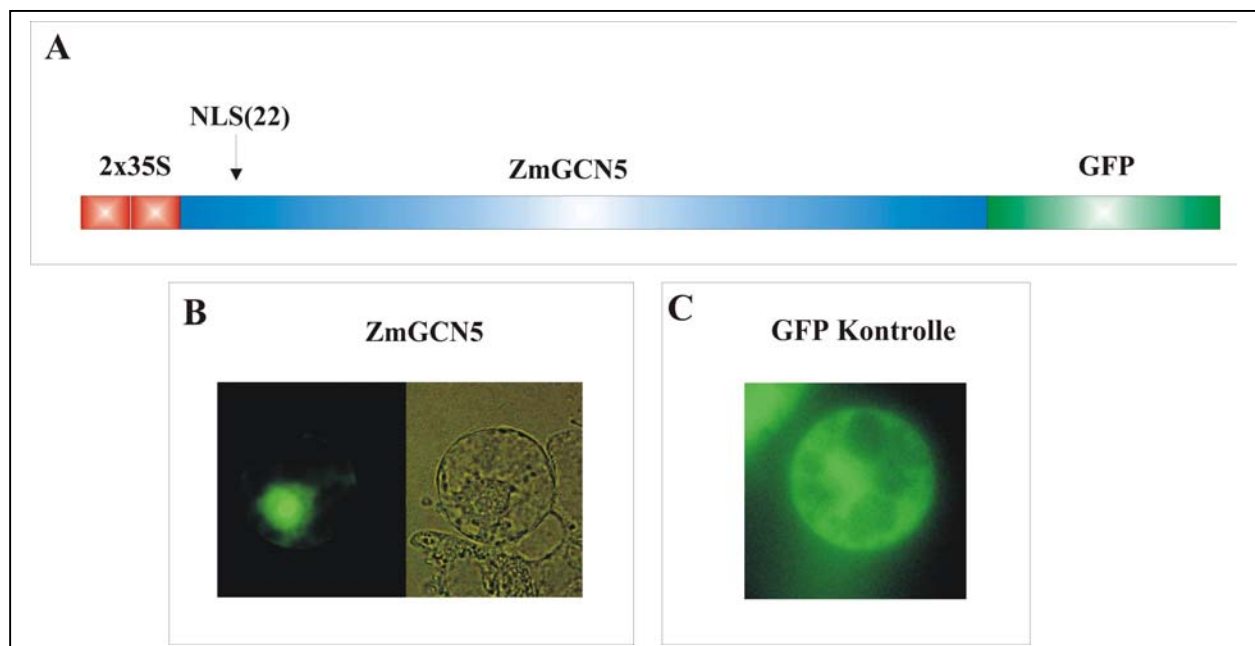
Um zu zeigen, daß es sich bei ZmGCN5 um eine Histonacetyltransferase vom Typ A handelt, die im Kern vorkommt, wurden Nuclei aus Mais-Schößlingen isoliert. Jeweils 100µg Nuclei wurden im 10% PAA-Gel aufgetrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5-Antikörper. Anschließend wurde die Probe vom Filter abgewaschen und mit dem anti-HAT-B Antikörper geprobt. Als Kontrolle diente in *E.coli* exprimiertes HAT-B (zur Verfügung gestellt von Peter Loidl, Institut für Mikrobiologie, Universität Innsbruck), das als cytoplasmatische Histonacetyltransferase vom Typ B bekannt ist. Wie in Abb. 4.1.6. zu erkennen ist, kann ZmGCN5 mit Hilfe des spezifischen Antikörpers in Nuclei nachgewiesen werden. Der anti-HAT-B Antikörper zeigt in Nuclei kein Signal. Das, in *E.coli* exprimierte HAT-B ergibt wie erwartet ein starkes Signal mit dem anti-HAT-B Antikörper. Somit konnte gezeigt werden, daß es sich bei ZmGCN5 um eine nukleäre Histonacetyltransferase vom Typ A handelt.



**Abb. 4.1.6. : Nuclei enthalten ZmGCN5, nicht aber HAT-B.** Jeweils 100µg Nuclei wurden im 10% PAA-Gel aufgetrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5-Antikörper, sowie mit dem anti-HAT-B Antikörper geprobt. Als Kontrolle diente in *E.coli* exprimierte HAT-B.

#### 4.1.7. Kernlokalisierung von ZmGCN5

Als weiterer Nachweis, daß es sich bei ZmGCN5 um eine HAT-A Histonacetyltransferase handelt, und das Protein somit im Kern vorhanden ist, wurde eine Kernlokalisationsstudie in Zusammenarbeit mit Riyaz Bhat (MPI für Züchtungsforschung, Köln) durchgeführt. Anhand des Computerprogramms Psort Prediction (<http://psort.nibb.ac.jp/>) konnte an Aminosäureposition 22 der ZmGCN5 cDNA eine putative Kernlokalisationssequenz (nuclear localisation sequence - NLS) identifiziert werden (Abb. 4.1.7. A). Um die Kernlokalisierung von ZmGCN5 nachzuweisen, wurde die cDNA unter Kontrolle eines zweifachen CaMV 35S Promotors mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. BY2-Tabakprotoplasten wurden mit dem unter Abb. 4.1.7.A gezeigtem Konstrukt transfiziert und die Protoplasten anschließend sowohl unter UV-Licht (HQ GFP, HQ GFP LP Filter mit Blaulichtanregung BP 450-490 nm; Strahlteiler RKP 510 nm; Emitter LP 520 nm) als auch im Hellfeld untersucht. ZmGCN5 zeigt hierbei nur ein Signal im Kern (Abb. 4.1.7.B). Als Kontrolle diente der GFP Vektor, welcher sowohl in Kernnähe (da es wahrscheinlich nicht in den Kern transportiert wird) als auch im Cytoplasma exprimiert wird (Abb. 4.1.7.C). Die bei diesem Experiment gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Westernblotergebnisse aus Versuch 4.1.6., wonach es sich bei ZmGCN5 um eine im Zellkern lokalisierte Histonacetyltransferase vom Typ HAT-A handelt.

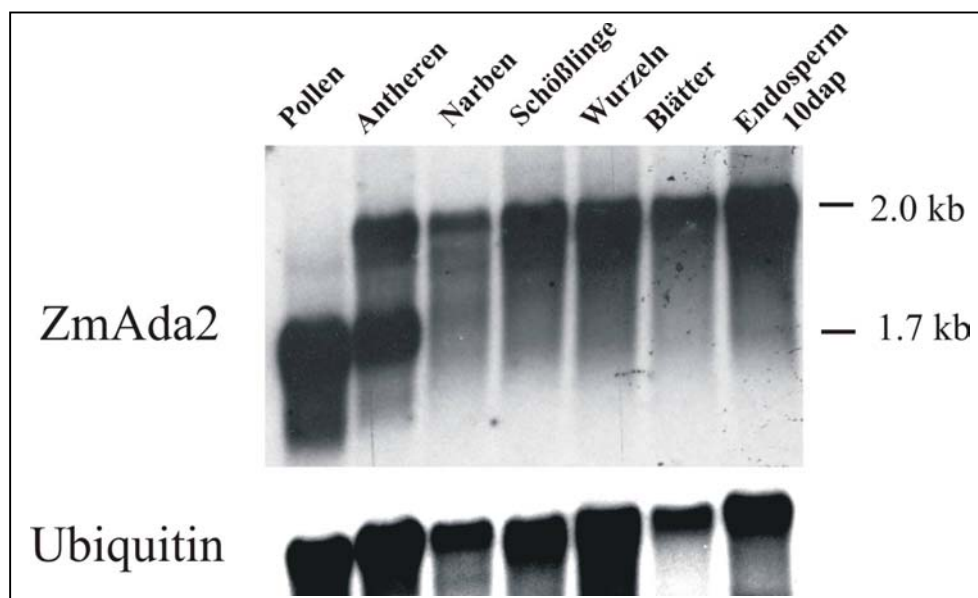


**Abb. 4.1.7. : Kernlokalisierung von ZmGCN5.** A) ZmGCN5 wurde unter Kontrolle eines zweifachen CaMV 35S Promotors mit GFP fusioniert. Anhand von Psort Prediction konnte an Aminosäureposition 20 von ZmGCN5 ein Kernlokalisierungssignal identifiziert werden. B) BY2-Tabakprotoplasten wurden mit dem unter (A) gezeigtem Konstrukt transfiziert und die Protoplasten anschließend sowohl unter UV-Licht als auch im Hellfeld untersucht. ZmGCN5 zeigt hierbei nur ein Signal im Kern. C) Als Kontrolle diente der GFP Vektor, welcher sowohl in Kernnähe als auch im Cytoplasma exprimiert wird.

## 4.2. Charakterisierung von *ZmAda2*

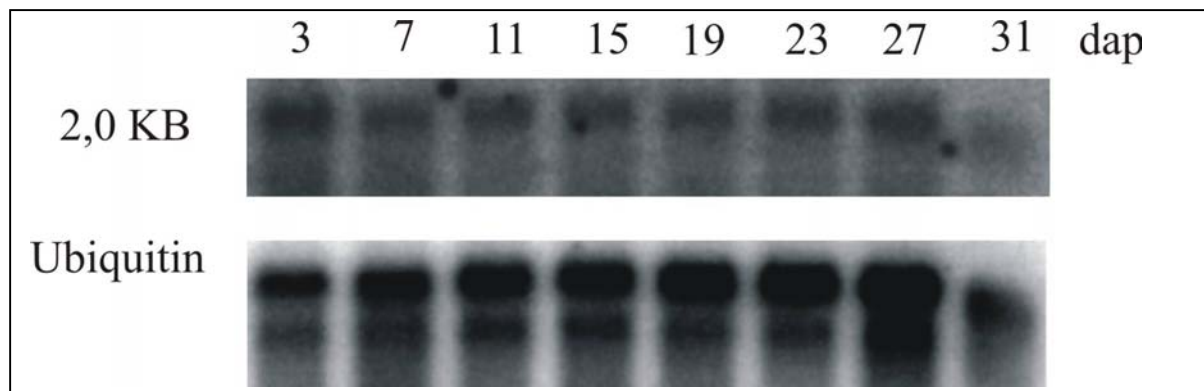
### 4.2.1. Northern Blot Analyse von *ZmAda2*

*ZmAda2* (Acc. Nr.: AJ430205) wurde aus einer Mais Narben-cDNA Bank mit Hilfe eines *Ada2*-homologen Gerste EST Klon isoliert (Heinz-Albert Becker, persönliche Mitteilung). Um das Expressionsmuster des *ZmAda2*-Transkripts zu untersuchen, wurden jeweils 10µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Pollen, Antheren, Narben, Schößlingen, Wurzeln, Blättern und Endosperm 10 Tage nach Bestäubung (days after pollination - dap) aus der Mais Linie A69Y isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran gebロットet und der Filter anschließend mit der *ZmAda2* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurde der Filter mit einer Ubiquitin Sonde unter den gleichen Bedingungen hybridisiert. Wie in Abb. 4.2.1.1. zu erkennen ist, wird das *ZmAda2* Transkript in allen untersuchten Geweben exprimiert, wobei in Antheren, Narben, Schößlingen, Wurzeln, Blättern und Endosperm ein großes Transkript von etwa 2kb zu erkennen ist. Im Gegensatz zu diesen Geweben wird in Pollen ein kleineres Transkript von etwa 1.7kb exprimiert. In Antheren ist neben dem großen auch das kleine Transkript zu beobachten, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß sich bei der Präparation der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA noch Pollen in den Antheren befand. Unter Berücksichtigung der Ladungskontrolle sind keine größeren Unterschiede in der Stärke der Expression innerhalb der verschiedenen Maisgewebe zu erkennen.



**Abb. 4.2.1.1. : Northern Blot verschiedener Maisgewebe mit der *ZmAda2* Sonde.** Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Pollen, Antheren, Narben, Schößlingen, Wurzeln, Blättern und Endosperm wurden aus der Mais Linie A69Y isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran gebロットet und der Filter anschließend mit der *ZmAda2* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Anschließend wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde zur Ladungskontrolle unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.

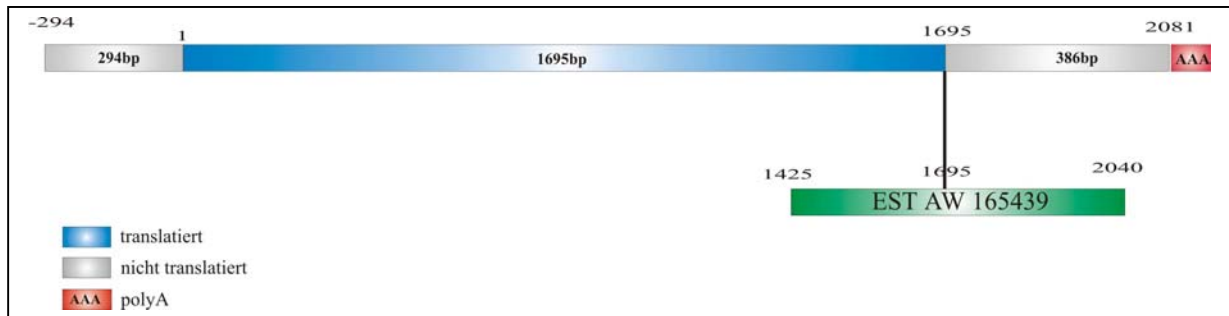
Zur weiteren Analyse von *ZmAda2* wurde die Expression in verschiedenen Stadien der Endospermentwicklung untersucht. Jeweils 5 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA verschiedener Entwicklungszeitpunkte von Endosperm nach der Bestäubung (days after pollination - DAP) wurden aus der Mais Linie A69Y isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *ZmAda2* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Wie Abb. 4.2.1.2. zeigt, wird das *ZmAda2* Transkript in allen Stadien der Endospermentwicklung gleichmäßig exprimiert. Zur Kontrolle der Ladung des Filters wurde die Membran mit der Ubiquitin Sonde unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.



**Abb. 4.2.1.2. : Northern Blot verschiedener Entwicklungszeitpunkte von Maiskörnern mit der *ZmAda2* Sonde.** Poly(A)<sup>+</sup>-RNA verschiedener Entwicklungszeitpunkte von Endosperm nach der Bestäubung (DAP) wurden aus der Mais Linie A69Y isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *ZmAda2* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Anschließend wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde zur Ladungskontrolle unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.

#### 4.2.2. Isolierung eines *Ada2*-homologen Transkripts aus Mais Pollen

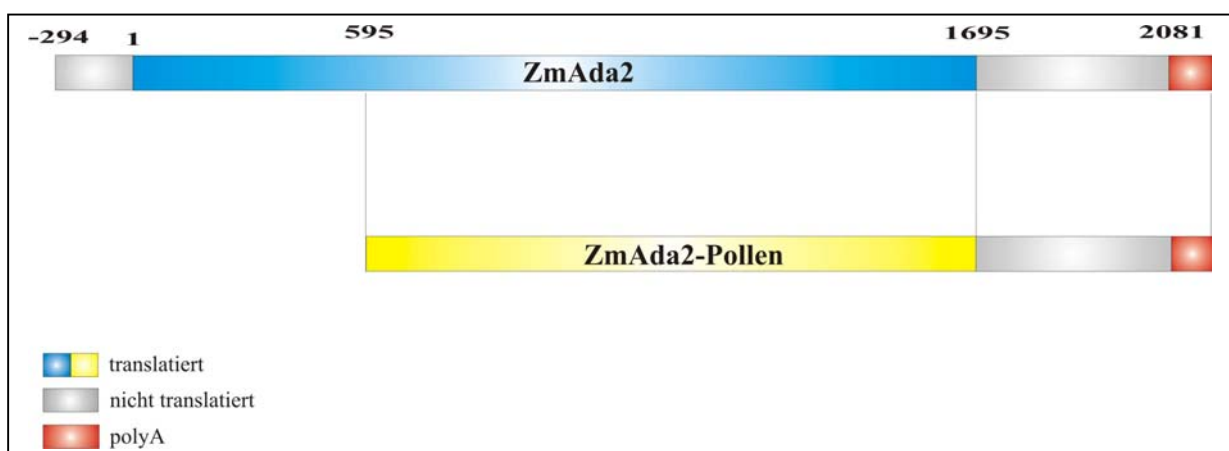
Zur Identifizierung des kleineren *ZmAda2* Transkriptes in Mais-Pollen wurden verschiedene Datenbanken nach homologen Sequenzen durchsucht. In der ZmDatabase (<http://www.zmdb.iastate.edu/>) wurden mehrere EST's (expressed sequence tag) identifiziert, die Homologie zu *ZmAda2* zeigen. Ein EST (AW165439) entstammte einer cDNA Bank aus Fahrenprimordien und überspannte alle anderen Sequenzen. Der EST AW165439 ist identisch zum C-Terminus und einem Teil der nicht translatierten Sequenz von *ZmAda2* (Abb. 4.2.2.). Auf Sequenzebene konnten keine abweichenden Basen zu *ZmAda2* nachgewiesen werden.



**Abb. 4.2.2. : Darstellung einer EST-Sequenz mit Homologie zu *ZmAda2*.** Die Zahlen stellen die Basenpaarpositionen dar. Acc. Nr.: *ZmAda2* = AJ430205, EST = AW165439

#### 4.2.2.1. Screening einer cDNA Bank aus Mais Pollen

Zur Isolierung des kürzeren, pollenspezifischen *ZmAda2* Transkriptes wurde eine cDNA Bank durchsucht, die aus reifen Pollen der Mais-Inzuchtlinie A188 hergestellt wurde (zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Dresselhaus, Institut für Allgemeine Botanik, AMP II, Universität Hamburg). Etwa zwei Millionen Phagen Plaques wurden auf Hybond-N Membran geblottet und die Filter anschließend mit der *ZmAda2* Sonde hybridisiert. Nach der Sequenzierung mehrerer Klone konnte eine Sequenz isoliert werden, die die Basen 595 bis 1695 der *ZmAda2* cDNA, den C-terminalen, nicht translatierten Bereich, sowie den polyA-Schwanz umfasst (Abb. 4.2.2.1.). Die isolierte Pollensequenz zeigt ein offenes Leseraster, jedoch ohne eine Startcodon im Bereich des N-Terminus. Abweichenden Basen im Vergleich zum *ZmAda2* Transkript konnten nicht identifiziert werden.

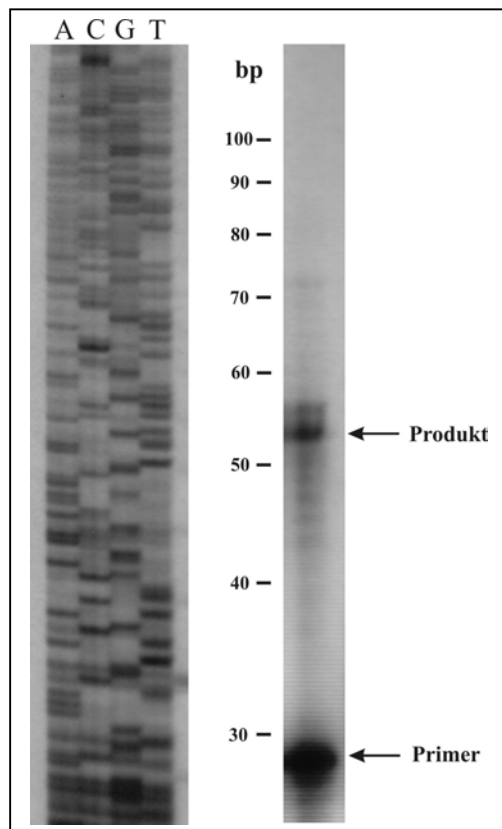


**Abb. 4.2.2.1. : Vergleich von *ZmAda2* mit der isolierten *ZmAda2*-Pollen Sequenz.** Die Zahlen stellen die Basenpaarpositionen dar.



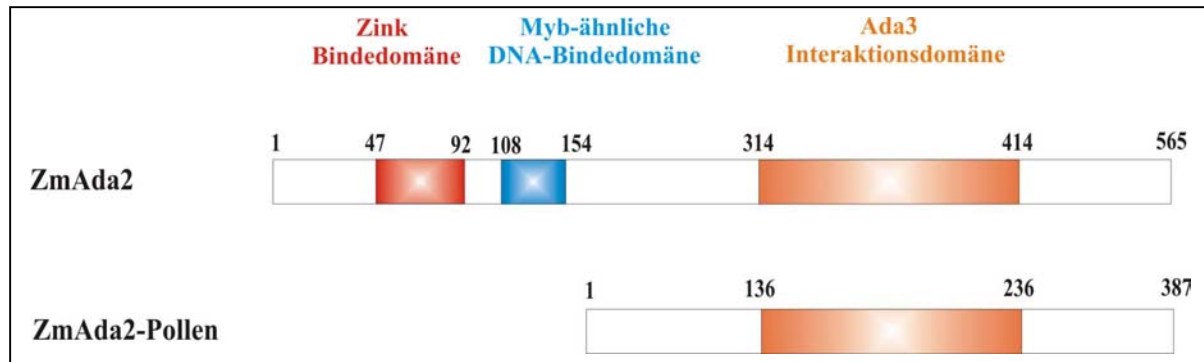
#### 4.2.2.2. Identifizierung des N-Terminus des *ZmAda2*-Pollen Transkriptes

Zur Identifizierung des N-Terminus des *ZmAda2*-Pollen Transkriptes wurde eine RACE- (rapid amplification of cDNA) Reaktion durchgeführt, die allerdings nicht zum gewünschten Ziel führte. Eine weitere Möglichkeit bestand in der Durchführung von Primer Extension. Hierzu wurde ein *ZmAda2*-spezifischer Primer radioaktiv markiert, mit 20µg Pollen-RNA aus Mais inkubiert, "revers" transkribiert und das Produkt anschließend auf einem 9%igen Acrylamidgel mit 7M Harnstoff aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine Sequenzreaktion, die auf *ZmAda2* cDNA mit dem gleichen Primer durchgeführt wurde. Wie in Abb. 4.2.2.2.1. zu erkennen ist, konnte ein Produkt isoliert werden das mit Hilfe der Sequenzreaktion genauer analysiert werden konnte.



**Abb. 4.2.2.2.1. : Primer Extension mit *ZmAda2*-Pollen.** Ein *ZmAda2*-spezifischer Primer wurde radioaktiv markiert, mit 20µg Pollen-RNA aus Mais inkubiert, revers transkribiert und das Produkt anschließend auf einem 9%igen Acrylamidgel mit 7M Harnstoff aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine Sequenzreaktion, die auf *ZmAda2* cDNA mit dem gleichen Primer durchgeführt wurde.

Hierbei stellte sich heraus, daß das *ZmAda2*-Pollen Transkript am N-Terminus acht Kodons länger ist, als der in der Pollenbank isolierte Klon. Somit steht fest, daß das *ZmAda2*-Pollen Transkript ein offenes Leseraster von 387 Aminosäuren aufweist (Acc. Nr. *ZmAda2*-Pollen = AJ430386) (Abb. 4.2.2.2.2.). Aufgrund der Verkürzung am N-Terminus verfügt *ZmAda2*-Pollen lediglich noch über die Ada3-Interaktionsdomäne. Die Zink-Bindedomäne sowie die Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne sind nicht vorhanden.



**Abb. 4.2.2.2.2. : Vergleich von ZmAda2 mit ZmAda2-Pollen.** ZmAda2 besitzt eine Zink-Bindedomäne, eine Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne und eine Ada3-Interaktionsdomäne. ZmAda2-Pollen verfügt lediglich über die Ada3-Interaktionsdomäne. Die Zahlen stellen die entsprechenden Aminosäurepositionen der Domänen dar. Acc. Nr.: ZmAda2 = AJ430205 ; ZmAda2-Pollen = AJ430386

### 4.2.3. Kernlokalisierung von ZmAda2 und ZmAda2-Pollen

Da ZmGCN5 im Kern lokalisiert ist, kann man aufgrund früherer Ergebnisse erwarten, daß das Partnerprotein ZmAda2 auch eine Kernlokalisierung aufweist. Da in Pollen ein kleineres Transkript nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieses kleinere Transkript ebenfalls im Kern vorhanden ist, oder ob es vielleicht cytoplasmatisch lokalisiert ist. Anhand des Computerprogramms Psort Prediction (<http://psort.nibb.ac.jp/>) konnte an den Aminosäurepositionen 19, 262, 331 und 416 der ZmAda2 cDNA und an den Aminosäurepositionen 85, 153 und 238 der ZmAda2-Pollen cDNA putative Kernlokalisationssequenzen (nuclear localisation sequences - NLS) identifiziert werden (Abb. 4.2.3.A). Um die Rolle der beiden ZmAda2 Transkripte zu untersuchen, wurden beide cDNA's unter Kontrolle eines zweifachen CaMV 35S Promotors mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. BY2-Tabakprotoplasten wurden mit den, unter Abb. 4.2.3.A gezeigtem Konstrukten transfiziert und die Protoplasten anschließend sowohl unter UV-Licht (HQ GFP, HQ GFP LP Filter mit Blaulichtanregung BP 450-490 nm; Strahlteiler RKP 510 nm; Emitter LP 520 nm) als auch im Hellfeld untersucht. Sowohl ZmAda2 (Abb. 4.2.3.B), als auch ZmAda2-Pollen (Abb. 4.2.3.C) zeigten hierbei wie erwartet nur ein Signal im Kern. Als Kontrolle diente das GFP Protein alleine, welches sowohl in Kernnahe (da es wahrscheinlich nicht in den Kern transportiert wird) als auch im Cytoplasma vorgefunden wird (Abb. 4.2.3.D).



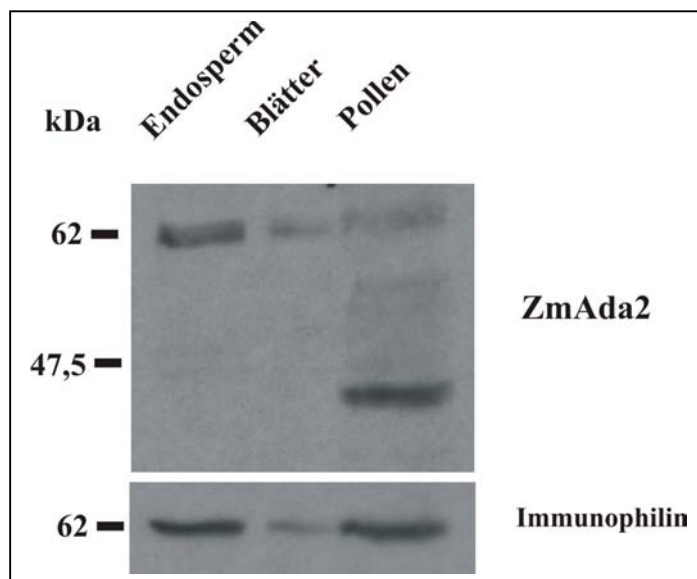
**Abb. 4.2.3. : Kernlokalisierung von ZmAda2 und ZmAda2-Pollen.** A) ZmAda2 und ZmAda2-Pollen wurden unter Kontrolle eines zweifachen CaMV 35S Promotors N-terminal mit GFP fusioniert. Anhand von Psort Prediction konnten an den Aminosäurepositionen 19, 262, 331 und 416 von ZmAda2 und an den Aminosäurepositionen 85, 153 und 238 der ZmAda2-Pollen cDNA mögliche Kernlokalisierungssignale identifiziert werden.

BY2-Tabakprotoplasten wurden mit den unter (A) gezeigten Konstrukten transfiziert und die Protoplasten anschließend sowohl unter UV-Licht als auch im Hellfeld untersucht (B,C). ZmAda2 und ZmAda2-Pollen zeigten hierbei ein Signal im Kern. Als Kontrolle diente der GFP Vektor, welcher sowohl in Kernnähe als auch im Cytoplasma expremiert wird (D).

#### **4.2.4. Charakterisierung von ZmAda2-Proteinen in verschiedenen Geweben**

Um zu zeigen, ob die Proteine von ZmAda2 und ZmAda2-Pollen exprimiert werden, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Proteinextrakte von Mais Endosperm, Blättern und Pollen in einem 12% PAA-Gel aufgetrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit dem anti-ZmAda2 Antikörper geprobt. Zur Überprüfung der Ladung wurde

der gleiche Filter mit dem Immunophilin Antikörper getestet. Wie in Abb. 4.2.4. zu erkennen ist, erkennt der anti-ZmAda2 Antikörper im Endosperm und in Blättern ein Protein von 62kDa, was der berechneten Größe aufgrund der Aminosäuresequenz entspricht. In Pollen wird zum größten Teil ein Protein von 45kDa und zu einem geringen Teil das große Protein von 62kDa detektiert. Dieses Resultat bestätigt die im Northern Blot beobachteten Ergebnisse und zeigt, daß das kürzere RNA Transkript tatsächlich translatiert wird und es sich höchstwahrscheinlich nicht um ein Abbauprodukt oder Artefakt handelt. Die schwächere ZmAda2 Bande in Blättern geht auf eine ungleichmäßige Ladung des Filters zurück, die durch die Immunophilin Kontrolle bestätigt wird.



**Abb. 4.2.4. : Western Blot von ZmAda2 in verschiedenen Maisgeweben.** Proteinextrakte von Mais Endosperm, Blättern und Pollen wurden im 12% PAA-Gel aufgetrennt, auf Nylon Membran geblottet und mit einem anti-ZmAda2 Antikörper geprobt. Anschließend wurde der gleiche Filter zur Ladungskontrolle mit dem Immunophilin Antikörper geprobt.

#### 4.2.5. Einfluß von *ZmGCN5*, *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen auf die Transaktivierung des *B32*-Promotors mit *O2*

Um die Auswirkung von *ZmGCN5*, *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen auf Enhancer-vermittelte Genaktivierung durch den Transkriptionsfaktor *O2* zu untersuchen, wurde das Reporterkonstrukt *b32/GUS* sowohl ohne-, als auch mit Expressionsplasmid in Tabakprotoplasten transfiziert (Kooperation mit Riyaz Bhat, MPI für Züchtungsforschung; Köln). Die Genregulation von Opaque-2 wird durch sequenzspezifische Bindung der Zielgene, unter anderem durch *b-32* (Lohmer et al., 1991), das eine Homologie zu den Ribosomen Inaktivierungs- Proteinen vom Typ I zeigt (Maddaloni et al., 1991), erreicht.

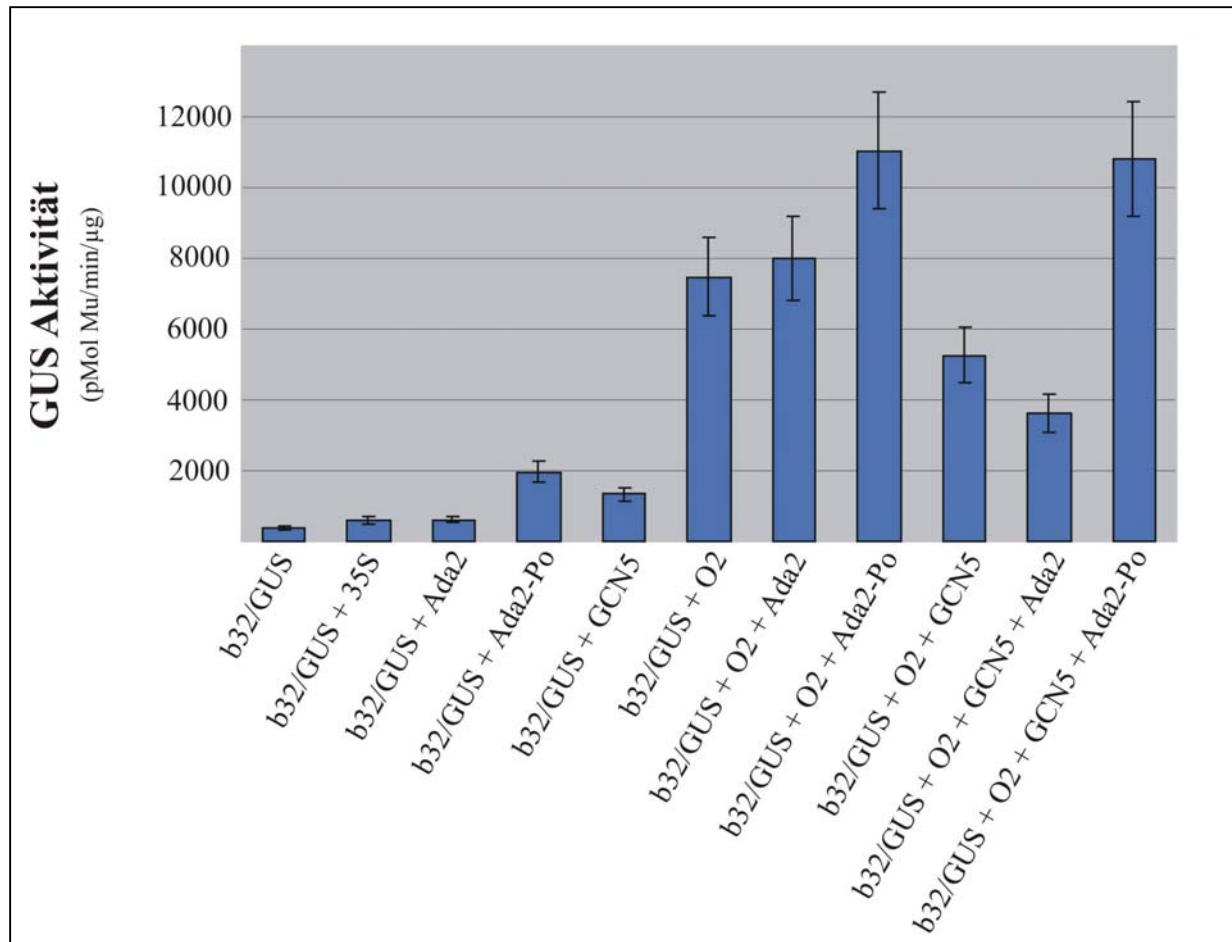
Die GUS Aktivität wurde mittels eines Lumineszenz Spektrometers gemessen und in pMol Mu / Minute / $\mu$ g Protein angegeben (Abb. 4.2.5.). Als Expressionsplasmide wurden *ZmO2*,

*ZmAda2*, *ZmAda2*-Pollen und *ZmGCN5* jeweils unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors verwendet. Als negative Kontrolle dienten das Reporterkonstrukt b32/Gus ohne kotransfizierte DNA oder mit dem CaMV 35S-Promotor im pRT100 Vektor (Töpfer et al., 1987). Beide Konstrukte weisen nur eine sehr geringe GUS Aktivität auf. Die Kotransfektion des Reporterkonstrukts b32/GUS mit dem *O2* Expressionsplasmid führt hingegen zu einem 20-fachen Anstieg der Aktivität. Die Kotransfektion von b32/GUS mit *O2* und *Ada2* führte zu keinem signifikanten Anstieg der GUS Aktivität gegenüber b32/GUS mit *O2*. Ersetzt man allerdings *Ada2* durch *Ada2*-Pollen, steigt die GUS Aktivität deutlich an.

Eine Kotransfektion von b32/GUS mit *O2* und *GCN5* führt zu einem Rückgang der GUS Aktivität im Vergleich zur Kotransfektion b32/GUS mit *O2*. Eine zusätzliche Transfektion mit *Ada2* führt ebenso zu einem weiteren Rückgang der GUS Aktivität, nahezu auf das Level des Hintergrundes. Ersetzt man *Ada2* allerdings durch *Ada2*-Pollen steigt die Aktivität sprunghaft an und erreicht etwa die Aktivität der Transfektion ohne *GCN5*.

Es wird also deutlich, daß das Volllängen *Ada2*-Protein nicht zu einer Aktivierung des b32/GUS Reporterkonstruktes befähigt ist. Ersetzt man allerdings das Volllängen *Ada2*-Konstrukt durch das *Ada2*-Pollen Konstrukt, so ist eine deutliche Steigerung der GUS-Aktivität messbar. Aufgrund dieser Beobachtungen kann man davon ausgehen, daß der N-Terminus von *Ada2* die Aktivierung des b32/GUS Konstruktes in diesem Protoplastensystem behindert.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von (Candau et al., 1996) überein, in denen beschrieben wird, daß die *Ada2*-Proteine aus Hefe und dem Menschen jeweils eine kryptische Aktivierungsdomäne enthalten, deren Aktivität allerdings durch die Volllängenproteine maskiert wird.

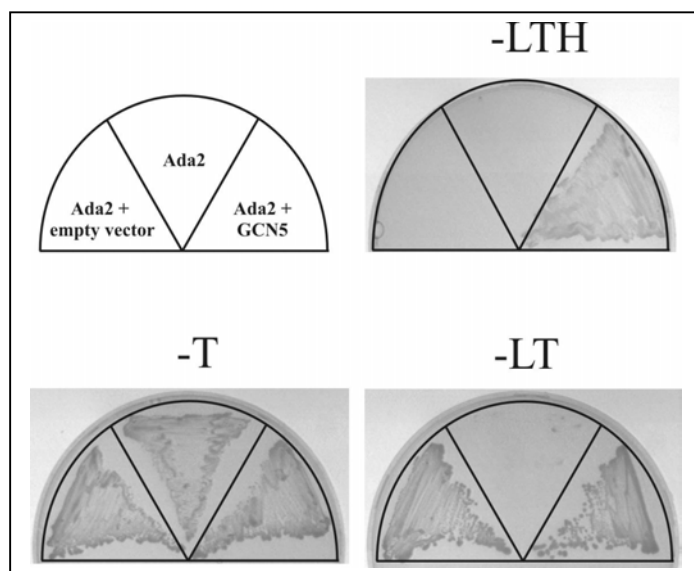


**Abb. 4.2.5. : Transiente Expression von *ZmAda2*, *ZmAda2*-Pollen und *ZmGCN5* in Tabak Protoplasten.** Das Reporterkonstrukt b32/GUS wurde sowohl ohne-, als auch mit Expressionsplasmid in Tabakprotoplasten transfiziert. Als Expressionsplasmide wurden *ZmO2*, *ZmAda2*, *ZmAda2*-Pollen und *ZmGCN5* jeweils unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors verwendet. Die GUS Aktivität wurde mittels eines Lumineszenz Spektrometers gemessen und in pMol Mu / Minute / µg Protein angegeben.

#### 4.2.6. Interaktionsstudie *ZmGCN5* – *ZmAda2* und *ZmGCN5* – *ZmAda2*-Pollen

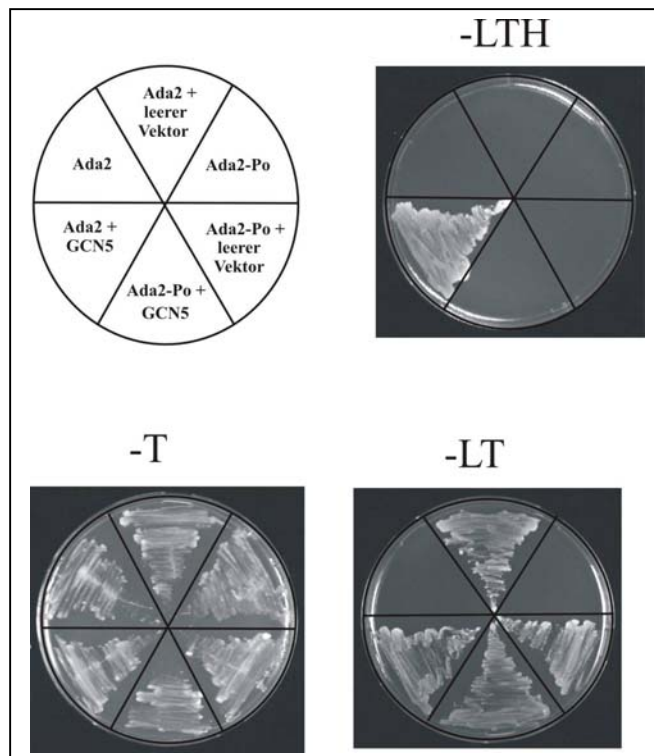
Wie bereits in anderen Organismen gezeigt werden konnte, kommen GCN5 und Ada2 in den meisten Komplexen zusammen vor und beide Proteine interagieren miteinander. Die Interaktionsdomänen beider Proteine konnten bereits charakterisiert werden (Candau and Berger, 1996). Um nachzuweisen, daß GCN5 und Ada2 auch in Mais miteinander interagieren, wurden beide Proteine in Hefe kloniert und im Two-Hybrid System auf eine

eventuelle Interaktion untersucht. Die transformierten Hefen wurden auf Platten mit Selektivmedium ausplattiert. Lediglich Hefezellen, die interagierende Proteine exprimieren, können auf Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LTH) wachsen, während Hefeisolate, die einzelne Proteine oder nicht interagierende Proteine exprimieren, kein Wachstum unter diesen Bedingungen aufweisen. Wie in Abb. 4.2.6.1. zu erkennen ist, sind nur die doppelt transformierten Hefen mit ZmGCN5 und ZmAda2 in der Lage, auf den -LTH Platten zu wachsen, was auf die Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist. Weder ZmAda2, noch die Doppeltransformation von ZmAda2 mit dem leeren Vektor, sind in der Lage auf Platten -LTH zu wachsen, was aber auf den Platten ohne Tryptophan wie erwartet möglich ist. Somit konnte nachgewiesen werden, daß GCN5 und Ada2 wie bereits in anderen Spezies gezeigt, auch in Mais miteinander interagieren.



**Abb. 4.2.6.1. : Two-Hybrid Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2.** Die Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2 ermöglicht es den Hefen auf Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin zu wachsen, während die Kontrollkonstrukte kein Wachstum unter diesen Bedingungen aufweisen.

Da die bisher kartierte Interaktionsdomäne zu GCN5 im N-Terminus des Ada2 Proteins lokalisiert ist (Candau et al., 1996), stellte sich die Frage, ob ZmAda2 Pollen, dem im Vergleich zu ZmAda2 der N-Terminus fehlt, noch in der Lage ist, mit ZmGCN5 zu interagieren. Somit sollte in einem weiteren Hefe Two-Hybrid Experiment dieser Frage nachgegangen werden. Das ZmAda2-Pollen Protein wurde ebenfalls in Hefe transformiert und in einer Doppeltransformation mit ZmGCN5 auf Platten mit Selektivmedium ausplattiert. Wie in Abb. 4.2.6.2. zu erkennen ist, sind die Hefen lediglich bei einer Interaktion von ZmGCN5 mit ZmAda2 auf den Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin zu wachsen. Die Doppeltransformation von ZmGCN5 mit ZmAda2-Pollen zeigt kein Wachstum auf -LTH Platten, was darauf zurückzuführen ist, daß der N-Terminus von ZmAda2-Pollen mit der Interaktionsdomäne zu ZmGCN5 nicht mehr vorhanden ist und somit beide Proteine nicht mehr miteinander interagieren können. Die Kontrollkonstrukte weisen das erwartete Wachstum auf.

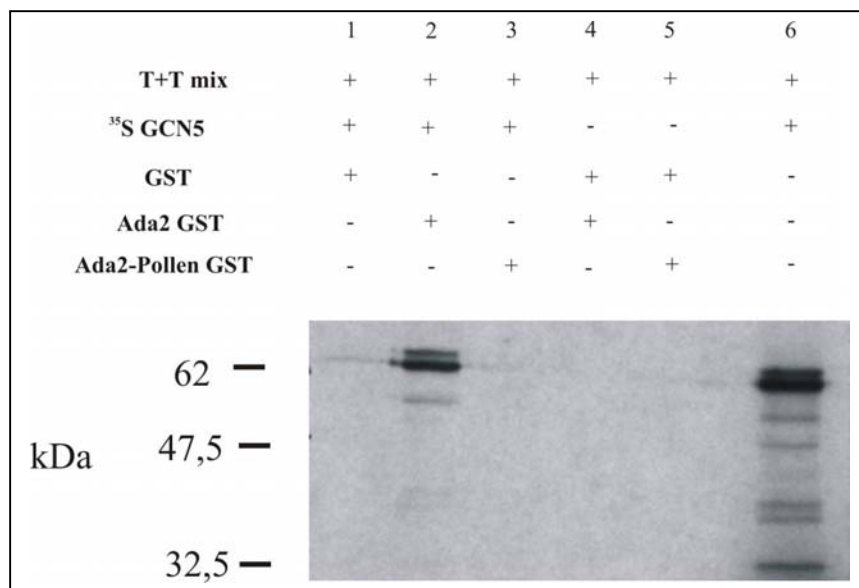


**Abb. 4.2.6.2. : Interaktion zwischen ZmGCN5 interagiert im Two-Hybrid-System mit ZmAda2, nicht aber mit ZmAda2-Pollen.** Die Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2 ermöglicht es den Hefen auf Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin zu wachsen, während ZmGCN5 und ZmAda2-Pollen sowie die Kontrollkonstrukte kein Wachstum unter diesen Bedingungen aufweisen.

#### 4.2.7. *In vitro* Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2

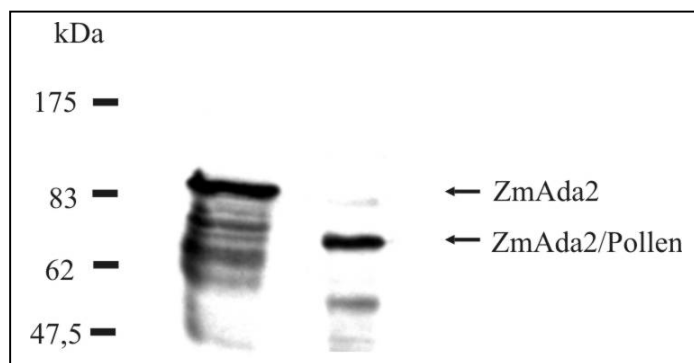
Zur Überprüfung der *in vivo* Ergebnisse im heterologen Hefe Two-Hybrid System wurde eine *in vitro* Interaktionsstudie zwischen ZmGCN5 - ZmAda2 und ZmGCN5 – ZmAda2-Pollen mit Hilfe eines Pull-Down Experiments durchgeführt. Hierzu wurden ZmAda2 und ZmAda2-Pollen als GST-Fusionsproteine in E.coli exprimiert, an Glutathion Agarose Beads gekoppelt und mit *in vitro* transkribiertem und mit <sup>35</sup>S Methionin translatiertem ZmGCN5 Protein inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im 10% PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Ergebnisse in Abb. 4.2.7.1. zeigen, daß wie bereits im Two-Hybrid System gezeigt, lediglich ZmAda2 mit ZmGCN5 interagiert, nicht aber das kürzere ZmAda2-Pollen.





**Abb. 4.2.7.1. : *In vitro* Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2.** ZmAda2 und ZmAda2-Pollen wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* expremiert, an Glutathion Agarose Beads gekoppelt und mit *InVivo* transkribiertem und mit <sup>35</sup>S Methionin translatiertem ZmGCN5 Protein inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im 10% PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

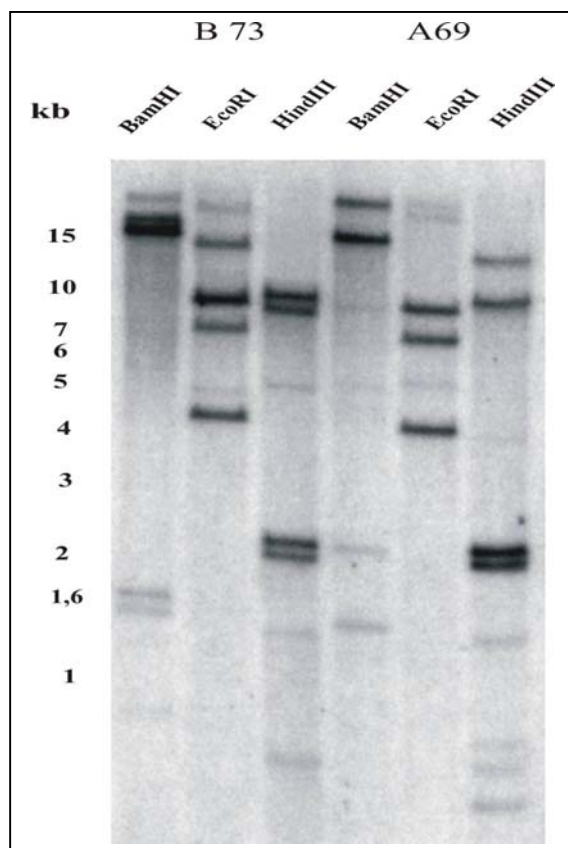
Zur Kontrolle, ob ZmAda2 und ZmAda2-Pollen für den Pull-Down Versuch in der entsprechenden Größe eingesetzt wurden, sind beide Proteine *in vitro* transkribiert und mit <sup>35</sup>S Methionin translatiert worden. Anschließend wurden sie im 12% PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen, wie in Abb. 4.2.7.2. dargestellt. Wie zu erkennen ist, wurden beide Proteine in der entsprechenden Größe translatiert.



**Abb. 4.2.7.2. : *In vitro* translatiertes ZmAda2, ZmAda2-Pollen und ZmAda2Δ704-1495 Protein.** Die Proteine wurden *in vitro* transkribiert und mit <sup>35</sup>S Methionin translatiert, im 12% PAA-Gel aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie nachgewiesen.

#### 4.2.8. Southern Blot Analyse von *ZmAda2*

Für lange Zeit galt *Ada2* wie auch *GCN5* in allen Spezies als ein Gen mit jeweils einer Kopie. Im Laufe dieser Arbeit wurden von (Stockinger et al., 2001) zwei *Ada2*-Sequenzen aus *Arabidopsis* (*AtAda2a* = AAK31319 und *AtAda2b* = AAK31320) publiziert. Um die Kopienzahl von *Ada2* in Mais zu ermitteln, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA der Wildtypen A69Y+ und B73 mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme verdaut, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *ZmAda2* Sonde hybridisiert. Um eine möglichst hohe Stringenz zu erreichen, wurde die Hybridisierung bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt (Abb. 4.2.8.).

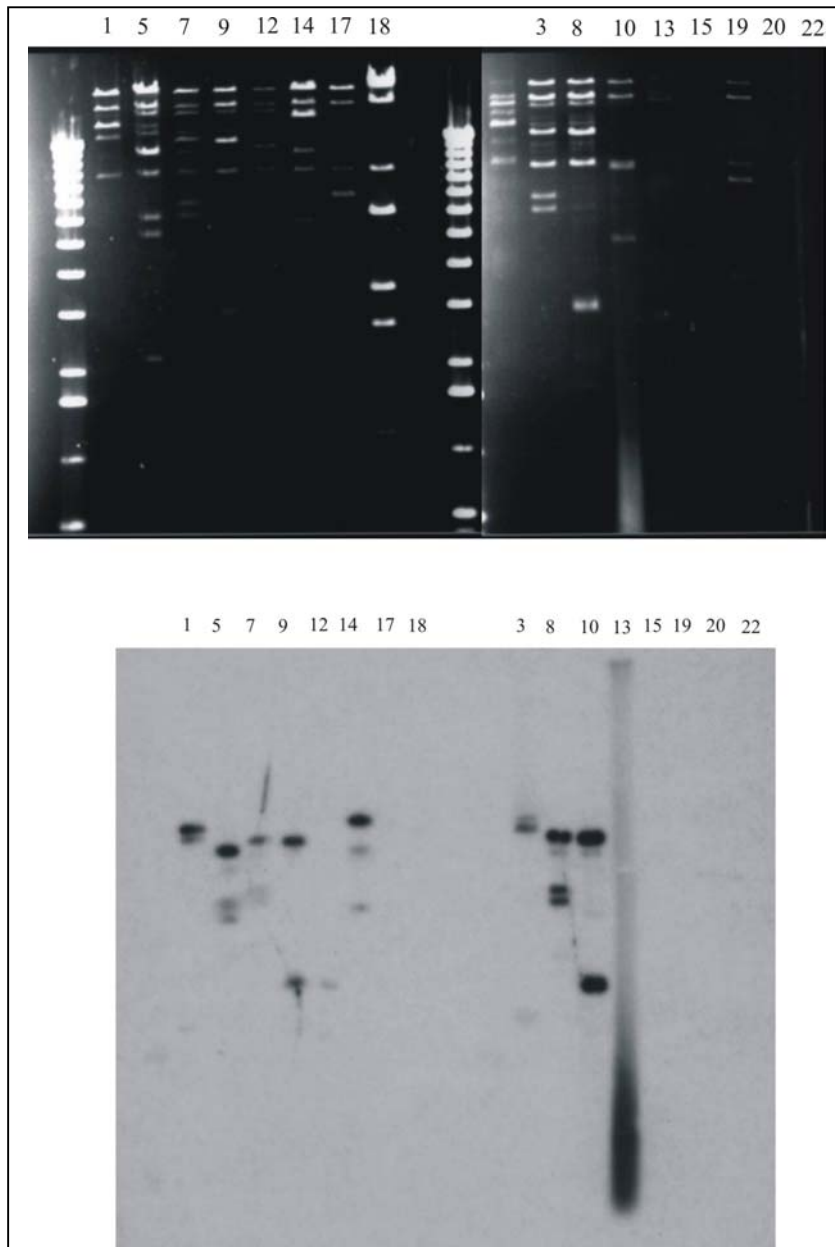


**Abb. 4.2.8. : Southern Blot zweier Mais Wildtyp- Linien mit der *ZmAda2* Sonde bei hoher Hybridisierungs-Stringenz.** Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt.

Auf dem Filter sind jeweils drei bis vier stärkere sowie drei bis vier schwächere Banden in jeder Spur zu erkennen, was auf mehrere Kopien von *Ada2* in Mais hindeutet. Somit handelt es sich bei *ZmAda2* wie auch bei *Ada2* aus *Arabidopsis* um Multicopygene.

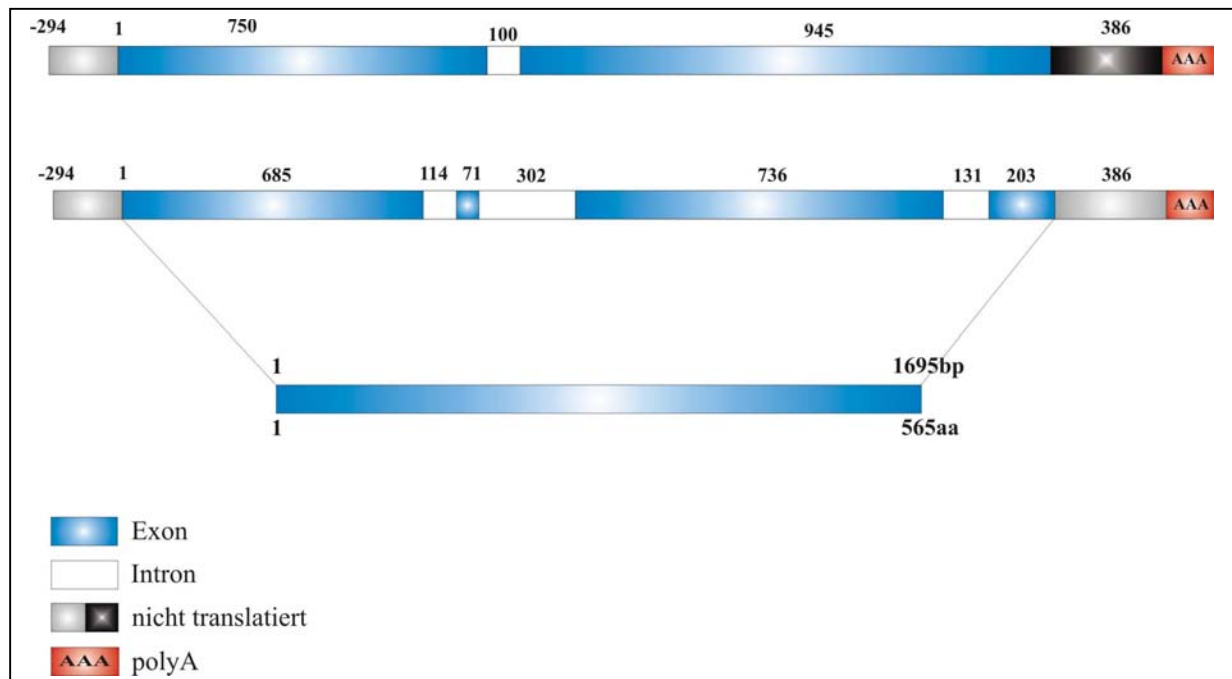
#### 4.2.9. Isolierung verschiedener genomischer *ZmAda2* Klone zur Identifizierung der Sequenzen

Zur Identifizierung der genomischen Sequenz, sowie weiterer möglicher *ZmAda2* Transkripte, wurde eine genomische Mais-Bank der Inzuchtlinie B73 (Clontech) durchsucht. Hierzu wurde die Bank ausplattiert, mit der *ZmAda2* Sonde geprobt und die hybridisierenden Klone nach zwei weiteren Screeningrunden mit *SalI* verdaut (Abb. 4.2.9.1.), kloniert und sequenziert.



**Abb. 4.2.9.1. : Identifizierung spezifischer *ZmAda2*-Sequenzen in genomischen *ZmAda2*-Klonen.** Verschiedene genomische *ZmAda2*-Klone wurden mit *SalI* geschnitten, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N geblottet und mit einer *ZmAda2*-Probe hybridisiert.

Aufgrund der Sequenzierungsergebnisse konnten die folgende Exon- und Intronpositionen der verschiedenen genomischen *ZmAda2*-Klonen identifiziert werden (Abb. 4.2.9.2.).



**Abb. 4.2.9.2. : Exon- und Intronpositionen der verschiedenen genomischen *ZmAda2*-Klonen.**

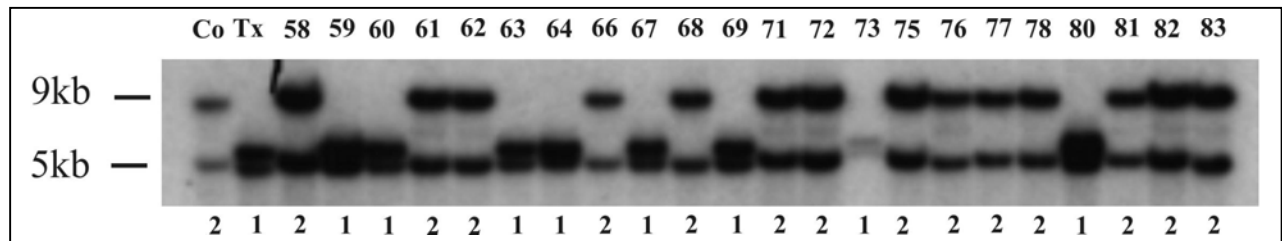
Die zwei isolierten genomischen *ZmAda2*-Klone zeigen ein unterschiedliches Exon-Intronmuster. Während der erste Klon nur ein Intron von 100 Basenpaaren aufweist, konnten im zweiten Klon drei Introns von 114, 302 und 131 Basenpaaren identifiziert werden. Die Sequenz innerhalb der Exons beider Klone ist identisch. Es konnten keine abweichenden Basen isoliert werden. Während die 5' untranslatierten Bereiche der beiden Klone identisch sind, zeigen die 3' untranslatierten Bereiche keinerlei Homologie. Hier sind diese Klone völlig unterschiedlich. Die genomischen Sequenzen resultieren in einer cDNA von 1695 Basenpaaren, respektive 565 Aminosäuren.

#### 4.2.10. Genomische Lokalisation von *ZmAda2*

Um festzustellen, auf welchem Chromosom *ZmAda2* lokalisiert ist, wurde die Mais-Inzuchtpopulation Co159\*Tx303 untersucht. Hierzu wurden jeweils 10µg DNA der beiden Eltern- und 41 unabhängigen Inzuchtlinien mit *HindIII* verdaut, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und mit *ZmAda2* hybridisiert (Abb. 4.2.10.1.). Da die Bande bei 5kb keinen Polymorphismus aufweist und in allen Pflanzen eine Bande zu

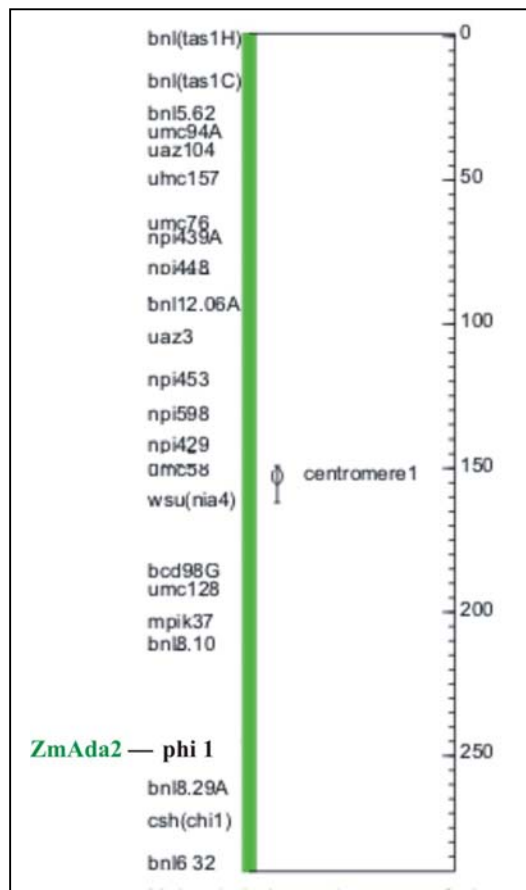
erkennen ist, könnte es sein, daß es sich bei dieser Bande um einen zweiten Locus handelt. Es könnte sein, daß ein zweites *ZmAda2*-Gen im Genom vorliegt.

Aufgrund des Bandenmusters der Polymorphismen wurden für Linien, die das Co159 Allel aufweisen, eine 2, für das Tx303 Allel eine 1 vergeben. Die Daten aller Linien wurden zur Auswertung an Prof. Benjamin Burr (Brookhaven National Laboratory, New York) gesendet.



**Abb. 4.2.10.1. : Aufspaltung des *ZmAda2*-Locus in der Mais-Inzuchtpopulation Co \* Tx.** Jeweils 10µg DNA der einzelnen Linien wurde mit *HindIII* verdaut, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und mit *ZmAda2* hybridisiert. Die Bezeichnungen der Inzuchtlinien sind oberhalb des Bandenmusters dargestellt, die Auswertung unterhalb. Co159 = 2; Tx303 = 1.

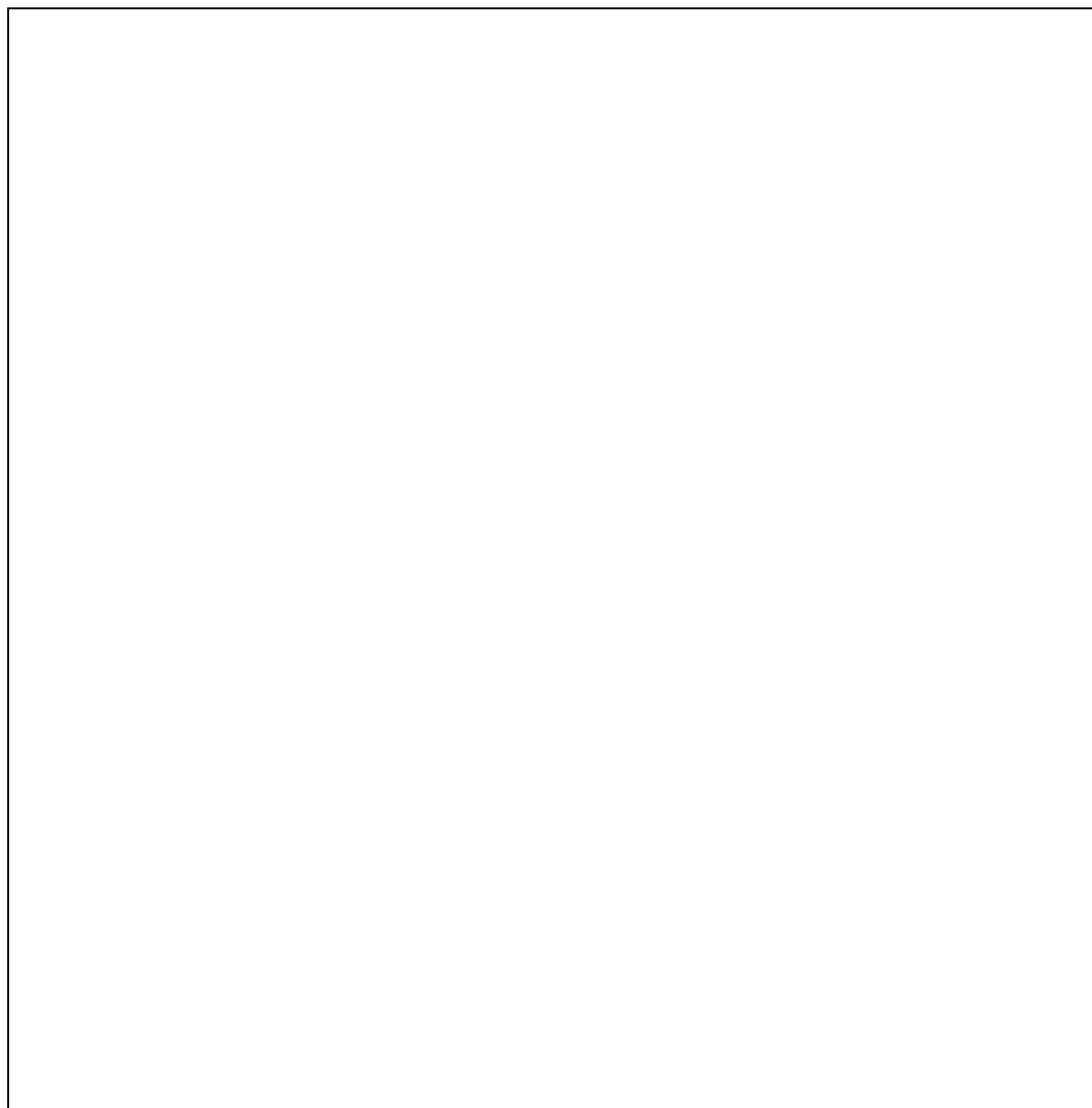
Aufgrund der, von Prof. Burr ermittelten Daten, konnte *ZmAda2* auf dem langen Arm des Maischromosoms 2 lokalisiert werden (Abb. 4.2.10.2.). Die Distanz zwischen *ZmAda2* und *phi1* beträgt 0.0588 Morgan. Bei *phi1* handelt es sich um eine Phosphohexose isomerase (Lal and Sachs, 1995).



**Abb. 4.2.10.2. : Position des *Ada2* Locus auf Chromosom1.** Die Distanz zwischen *Ada2* und *phi1* beträgt 0.0588 Morgan. Die Karte von Chromosom1 befindet sich unter <http://demeter.bio.bnl.gov/cgi-bin/display?db=acemaz1.7&class=Map&object=chrom1>

#### 4.2.11. Untersuchung der Expression von *ZmAda2* mittels Einzelzellen-PCR verschiedener Zelltypen

Zur Analyse der Expression in Eizellen, Spermazellen und den frühen Entwicklungsstadien der Mais Kornentwicklung wurden, wie auch für *ZmGCN5* (Versuch 4.1.2.), Einzelzellen-PCR Experimente in Zusammenarbeit mit PD Dr. Erhard Kranz (Institut für Allgemeine Botanik, AMP II, Universität Hamburg) durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Zelltypen der Mais-Inzuchtlinie A188 isoliert und das *ZmAda2* Transkript mit Hilfe von genspezifischen Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden im 1% Agarosegel aufgetrennt und durch Southern-Blot Technik mittels einer *ZmAda2*-spezifischen Sonde nachgewiesen (Abb. 4.2.11.).



**Abb. 4.2.11. : *ZmAda2* kann mit Hilfe der Einzelzellen-PCR in den verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden.** Einzelne Zellen verschiedener Zelltypen wurden isoliert, *ZmAda2* mit Hilfe von PCR amplifiziert (A), im 1% Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer der PCR-Produkte auf Hybond-Membran mit einer *ZmAda2*-Sonde nachgewiesen (B).

Das *ZmAda2*-Transkript konnte in Eizellen, Zentralzellen, Synergiden und in Endosperm nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle diente eine Plasmid Kontrolle. Als Negative Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O anstelle von Zellen in die PCR eingesetzt, was zu keiner Amplifikation in der PCR-Reaktion führte. Die größere Bande in der ersten der beiden Synergiden ist auf die Amplifikation eines Introns zurückzuführen. Aufgrund fehlenden Materials konnten keine Spermazellen oder weiteren Gewebe untersucht werden. Die mit der Einzelzellen-PCR gewonnenen Ergebnisse bestätigen und ergänzen die zuvor durch Northern-Blot erzielten Resultate, bei denen das *ZmAda2*-Transkript in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnte und weisen auf eine zentrale Rolle von *ZmAda2*, wie auch für *ZmGCN5* (Versuch 4.1.2.), während der Transkription hin.

### 4.3. Isolierung und Charakterisierung von *AtHAT*

Zu Beginn dieser Arbeit befand sich in den Datenbanken lediglich eine *GCN5*-homologe Histonacetyltransferase (AAB92257) aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHAT*). Im May 2000 wurde eine, zum Hefe-*GCN5* orthologe *Arabidopsis* Sequenz (HAC000003), in der Pflanzen-Chromatindatenbank (The Plant Chromatin Database, <http://www.chromdb.org/>) unter dem Namen *GCN5* und anschließend auch in den anderen Datenbanken (SwissProt, PIR, PRF, PDB, GenBank und RefSeq, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>)) unter dem Namen *HAT1* (CAB77581) hinterlegt. Im April 2001 wurde die Sequenz der Histonacetyltransferase *GCN5* aus *Arabidopsis* (AAK31321) von (Stockinger et al., 2001) veröffentlicht. *AtHAT1* und *AtGCN5* unterscheiden sich lediglich in einer Insertion von 18 Aminosäuren in der HAT-Domäne von *AtHAT1* (Abb. 4.3.).

<i>AtHAT</i>	.....	0
<i>AtGCN5</i>	MD3H33HLN&A&NR3R33 QTPSPSHS&S&S&VTS SLHKRKLAA&TTA&A&A&A&S EDH&APP33 SFP33 SFS&ADTRD&ALT&S NDEL	80
<i>AtHAT1</i>	MD3H33HLN&A&NR3R33 QTPSPSHS&S&S&VTS SLHKRKLAA&TTA&A&A&A&S EDH&APP33 SFP33 SFS&ADTRD&ALT&S NDEL	80
Consensus	.....	
<i>AtHAT</i>	..... MVKMMV	6
<i>AtGCN5</i>	ESISARG&ADTDS&PDESEDI VVDDDEDEF&PEQDQDS SIRTFTA&BLDS SSGVNGS S&RNTK&L&TES&STV&K&LES SDG&K&D&G	160
<i>AtHAT1</i>	ESISARG&ADTDS&PDESEDI VVDDDEDEF&PEQDQDS SIRTFTA&BLDS SSGVNGS S&RNTK&L&TES&STV&K&LES SDG&K&D&G	160
Consensus	..... k	
<i>AtHAT</i>	.....	86
<i>AtGCN5</i>	ESISVVG&TGVSGTGVGSS ISGLV&PKDES&VKVLA&ENFQTS G&YIARE&E&ALK&REE&Q&GRL&K&F&V&CY&SND&S&IDE&MM&CLI&GL&K&NI	240
<i>AtHAT1</i>	ESISVVG&TGVSGTGVGSS ISGLV&PKDES&VKVLA&ENFQTS G&YIARE&E&ALK&REE&Q&GRL&K&F&V&CY&SND&S&IDE&MM&CLI&GL&K&NI	240
Consensus	svvgtgvs gtvvgss is glvpkdes vkvlaenf qts gayiareealkree qagrlnkfvcys nds ide mmcli glkni	
<i>AtHAT</i>	F&B&QLP&MP&K&EYI&V&LL&M&DR&K&K&S&V&M&V&L&R&G&M&LV&V&G&G&I&T&Y&R&P&Y&H&S Q&M&F&G&E&I&A&F&C&A&I&T&A&D&E&Q&V&K&G&Y&C&T&R&L&M&H&L&K Q&H&A&R&D&V&D	166
<i>AtGCN5</i>	F&B&QLP&MP&K&EYI&V&LL&M&DR&K&K&S&V&M&V&L&R&G&M&LV&V&G&G&I&T&Y&R&P&Y&H&S Q&M&F&G&E&I&A&F&C&A&I&T&A&D&E&Q&V&K&G&Y&C&T&R&L&M&H&L&K Q&H&A&R&D&V&D	320
<i>AtHAT1</i>	F&B&QLP&MP&K&EYI&V&LL&M&DR&K&K&S&V&M&V&L&R&G&M&LV&V&G&G&I&T&Y&R&P&Y&H&S Q&M&F&G&E&I&A&F&C&A&I&T&A&D&E&Q&V&K&G&Y&C&T&R&L&M&H&L&K Q&H&A&R&D&V&D	320
Consensus	fa qlp mpkeyivrlldmrkksvmvlgmlvvggityrpyhs qmfgeiafca itadeqvkgyctrlnmhlkqhardvd	
<i>AtHAT</i>	GLTHFLTY&AD&N&N&A&G&Y&F&V&K..... QGFTKEI&Y&LE&K&D&V&H&G&F&I&K&D&D&G&L&L&ME&CK&I&D&P&K&L&P&Y&T&D&L&S&S&M	228
<i>AtGCN5</i>	GLTHFLTY&AD&N&N&A&G&Y&F&V&K..... QGFTKEI&Y&LE&K&D&V&H&G&F&I&K&D&D&G&L&L&ME&CK&I&D&P&K&L&P&Y&T&D&L&S&S&M	382
<i>AtHAT1</i>	GLTHFLTY&AD&N&N&A&G&Y&F&V&KQEIPQSFTS&S&S&V&T&L&S&Y QGFTKEI&Y&LE&K&D&V&H&G&F&I&K&D&D&G&L&L&ME&CK&I&D&P&K&L&P&Y&T&D&L&S&S&M	400
Consensus	glthfltyadnnavgyfvk qgftkeiy lekdvhgfiikdydg l mecki dpklpytdlssm	
<i>AtHAT</i>	IR&Q&Q&K&A&I&D&E&R&I&E&L&S&N&C QN&V&Y&P&K&I&E&F&L&K&N&E&G&I&P&R&K&I IK&V&E&E&I&R&G&L&R&E&G&O&T&P&D&Q&O&G&H&T&R&F&K&L&F&N&G&S&A&D&M&V&T&N&Q&K&L&N&A	208
<i>AtGCN5</i>	IR&Q&Q&K&A&I&D&E&R&I&E&L&S&N&C QN&V&Y&P&K&I&E&F&L&K&N&E&G&I&P&R&K&I IK&V&E&E&I&R&G&L&R&E&G&O&T&P&D&Q&O&G&H&T&R&F&K&L&F&N&G&S&A&D&M&V&T&N&Q&K&L&N&A	462
<i>AtHAT1</i>	IR&Q&Q&K&A&I&D&E&R&I&E&L&S&N&C QN&V&Y&P&K&I&E&F&L&K&N&E&G&I&P&R&K&I IK&V&E&E&I&R&G&L&R&E&G&O&T&P&D&Q&O&G&H&T&R&F&K&L&F&N&G&S&A&D&M&V&T&N&Q&K&L&N&A	480
Consensus	irgqrkaiderirelsnc qnvypkieflkneagiprki ikveeirglrea gotpdqoght r fklfngs admvtnqkqlna	
<i>AtHAT</i>	L&M&R&A&L&L&K&T&M&Q&D&E&A&D&A&O&P&F&K&E&P&V&D&S&R&D&V&P&D&Y&D&I IK&D&P&I&D&L&K&V&I&A&K&R&V&E&S&E&Q&Y&Y&V&T&L&M&F&V&D&A&R&R&M&F&N&N&C&R&T&Y&N&S&P&D&T&I&Y	388
<i>AtGCN5</i>	L&M&R&A&L&L&K&T&M&Q&D&E&A&D&A&O&P&F&K&E&P&V&D&S&R&D&V&P&D&Y&D&I IK&D&P&I&D&L&K&V&I&A&K&R&V&E&S&E&Q&Y&Y&V&T&L&M&F&V&D&A&R&R&M&F&N&N&C&R&T&Y&N&S&P&D&T&I&Y	542
<i>AtHAT1</i>	L&M&R&A&L&L&K&T&M&Q&D&E&A&D&A&O&P&F&K&E&P&V&D&S&R&D&V&P&D&Y&D&I IK&D&P&I&D&L&K&V&I&A&K&R&V&E&S&E&Q&Y&Y&V&T&L&M&F&V&D&A&R&R&M&F&N&N&C&R&T&Y&N&S&P&D&T&I&Y	560
Consensus	lmrallktmqd adawpfkepvd srdvpdydydi ikdpi dlkvi akrves eqyyvtlcmfvadarrmfnnccrtyns pdtiy	
<i>AtHAT</i>	Y&X&C&A&T&R&L&E&T&H&F&H&S&V&Q&A&G&L&Q&S&G&A&K&S&Q.....	418
<i>AtGCN5</i>	Y&X&C&A&T&R&L&E&T&H&F&H&S&V&Q&A&G&L&Q&S&G&A&K&S&Q.....	568
<i>AtHAT1</i>	Y&X&C&A&T&R&L&E&T&H&F&H&S&V&Q&A&G&L&Q&S&G&A&K&S&Q.....	586
Consensus	sykcat k	

**Abb. 4.3. : Vergleich der Aminosäuresequenzen von *AtHAT*, *AtHAT1* und *AtGCN5*.** Die HAT-Domäne wurde mit blau, die Ada2-Interaktionsdomäne mit gelb und die Bromodomäne mit rot markiert. Acc. Nr.: *AtHAT* = AAB92257, *GCN5* = AAK31321, *HAT1* = CAB77581.

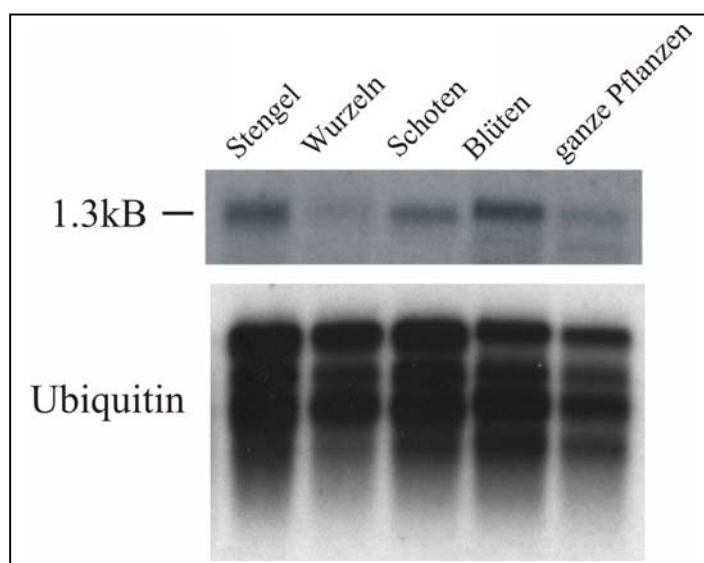


Das Alignment wurde mit dem BCM SEARCH LAUNCHER (Multiple Sequence Alignment, <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) erstellt und anschließend mit BOXSHADE 3.21 (ch.EMBNET.org, [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) bearbeitet. Die Domänen im Alignment wurden aufgrund der Vorhersage des Computerprogramms Pfam 6.6 (<http://pfam.wustl.edu/index.html>) eingezeichnet. Hierzu wurden die HAT-Domäne mit blau, die Ada2-Interaktionsdomäne mit gelb und die Bromodomäne mit rot markiert.

Die Sequenzen von *AtHAT* und später auch von *AtHAT1* wurden mit Hilfe von Primern, die anhand der bekannten Sequenzen designed wurden, mittels RT-PCR kloniert. Zur genaueren Analyse dieser Proteine wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.3.1. Expression der *AtHAT* mRNA in verschiedenen Geweben

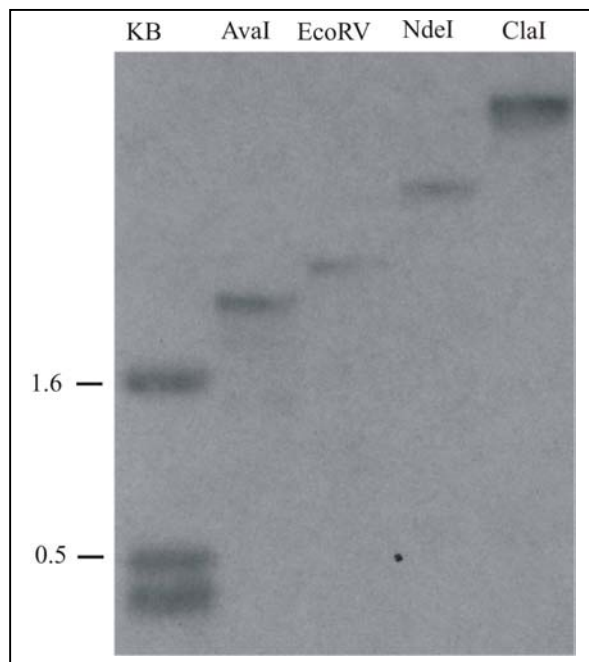
Um das Expressionsmuster des *AtHAT* Transkripts zu untersuchen, wurden jeweils 10 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Stengeln, Wurzeln, Schoten, Blüten und ganzen Pflanzen aus *Arabidopsis thaliana* (Ecotyp Columbia-0) isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtHAT* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde unter den gleichen Bedingungen hybridisiert. Wie in Abb. 4.3.1. zu erkennen ist, wird das *AtHAT* Transkript in allen untersuchten Geweben mit einer Größe von 1.3kB exprimiert, wobei in Wurzeln und ganzen Pflanzen eine schwächere Bande zu erkennen ist. Berücksichtigt man allerdings die Ladungskontrolle sind keine größeren Unterschiede in der Stärke der Expression innerhalb der verschiedenen *Arabidopsis* Gewebe zu erkennen.



**Abb. 4.3.1. : Northern Blot verschiedener Arabidopsisgewebe mit der *AtHAT* Sonde.** Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Stengeln, Wurzeln, Schoten, Blüten und ganzen Pflanzen wurden aus der *Arabidopsis* Linie Col-0 isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtHAT* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Anschließend wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde zur Ladungskontrolle unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.

### 4.3.2. Genomische Organisation des *AtHAT* Lokus

Um die Kopienzahl von *AtHAT* in Arabidopsis zu ermitteln, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurde genomische Arabidopsis Col-0-DNA mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme verdaut, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtHAT* Sonde hybridisiert. Um eine möglichst hohe Stringenz zu erreichen, wurde die Hybridisierung bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt (Abb. 4.3.2.). Wie zu erkennen ist, handelt es sich bei *AtHAT*, wie auch bei *ZmGCN5* um ein Gen mit nur einer Kopie.



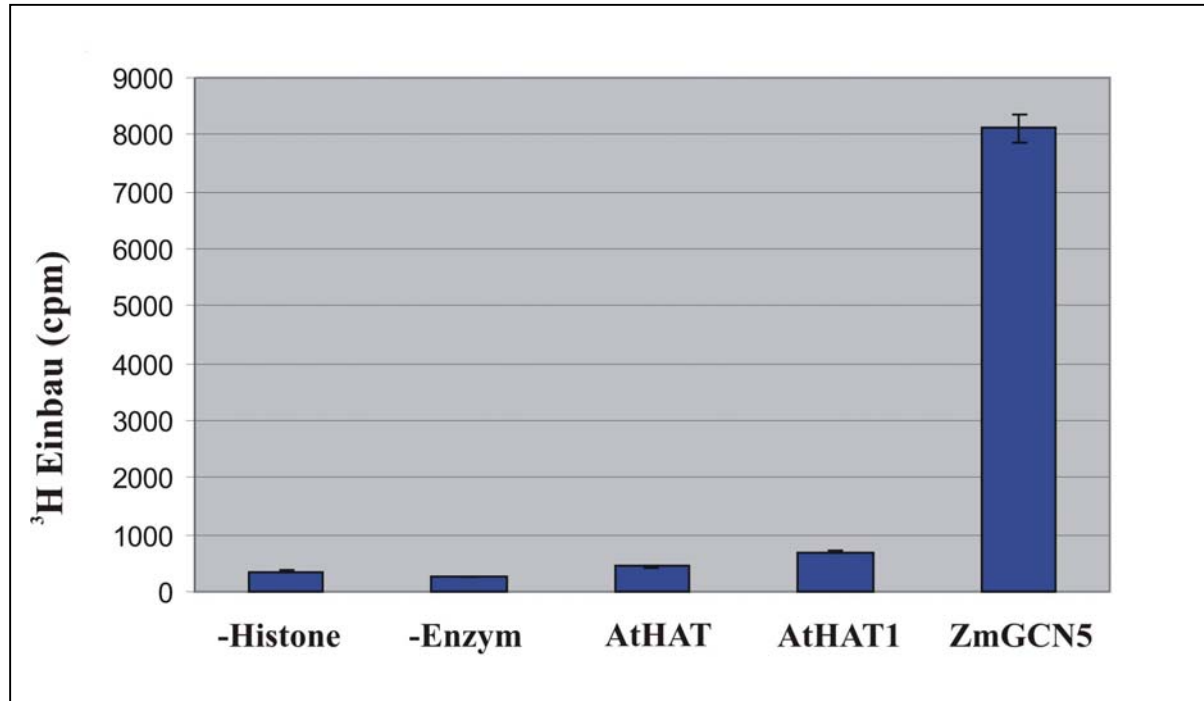
**Abb. 4.3.2. : Southern Blot der Arabidopsis Wildtyp-Linie Col-0 mit der *AtHAT* Sonde.** Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt.

### 4.3.3. HAT-Aktivität von AtHAT und AtHAT1 im Vergleich zu ZmGCN5

Zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität von AtHAT und AtHAT1 wurden beide Proteine in *E.coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert. Als Substrat für die Acetylierungsreaktion wurden Kalbs-Thymus Histone (Typ IIA, Sigma) verwendet. Als negative Kontrolle dienten eine Reaktion ohne Histone, sowie eine Reaktion ohne Enzym. Als positive Kontrolle wurde *ZmGCN5* verwendet, bei dem bereits in früheren Experimenten die Histonacetyltransferase- (HAT) Aktivität nachgewiesen werden konnte (Riehl, 1999). Wie deutlich zu erkennen ist (Abb. 4.3.3.1.) weisen weder AtHAT noch AtHAT1 im Gegensatz zu *ZmGCN5* HAT-Aktivität auf.

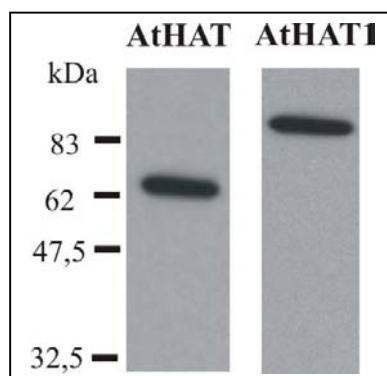
Die von (Stockinger et al., 2001) publizierte AtGCN5 Sequenz zeigt im Gegensatz zu AtHAT

und AtHAT1 Histonacetyltransferase-Aktivität. AtGCN5 unterscheidet sich von AtHAT1 lediglich in der Insertion von 18 Aminosäuren innerhalb der HAT-Domäne. Diese Insertion scheint für die HAT-Aktivität zwingend erforderlich zu sein. AtHAT fehlen diese 18 Aminosäuren ebenfalls, was sich vermutlich in der fehlenden HAT-Aktivität auswirkt.



**Abb. 4.3.3.1. : Vergleich der Histonacetyltransferase-Aktivitäten von AtHAT, AtHAT1 und ZmGCN5.** Mit Hilfe der verschiedenen Enzyme wurden jeweils Kalbs-Thymus Histone als Substrat acetyliert. Der <sup>3</sup>H Einbau wurde mittels Scintillationszähler in cpm (counts per minute) ermittelt.

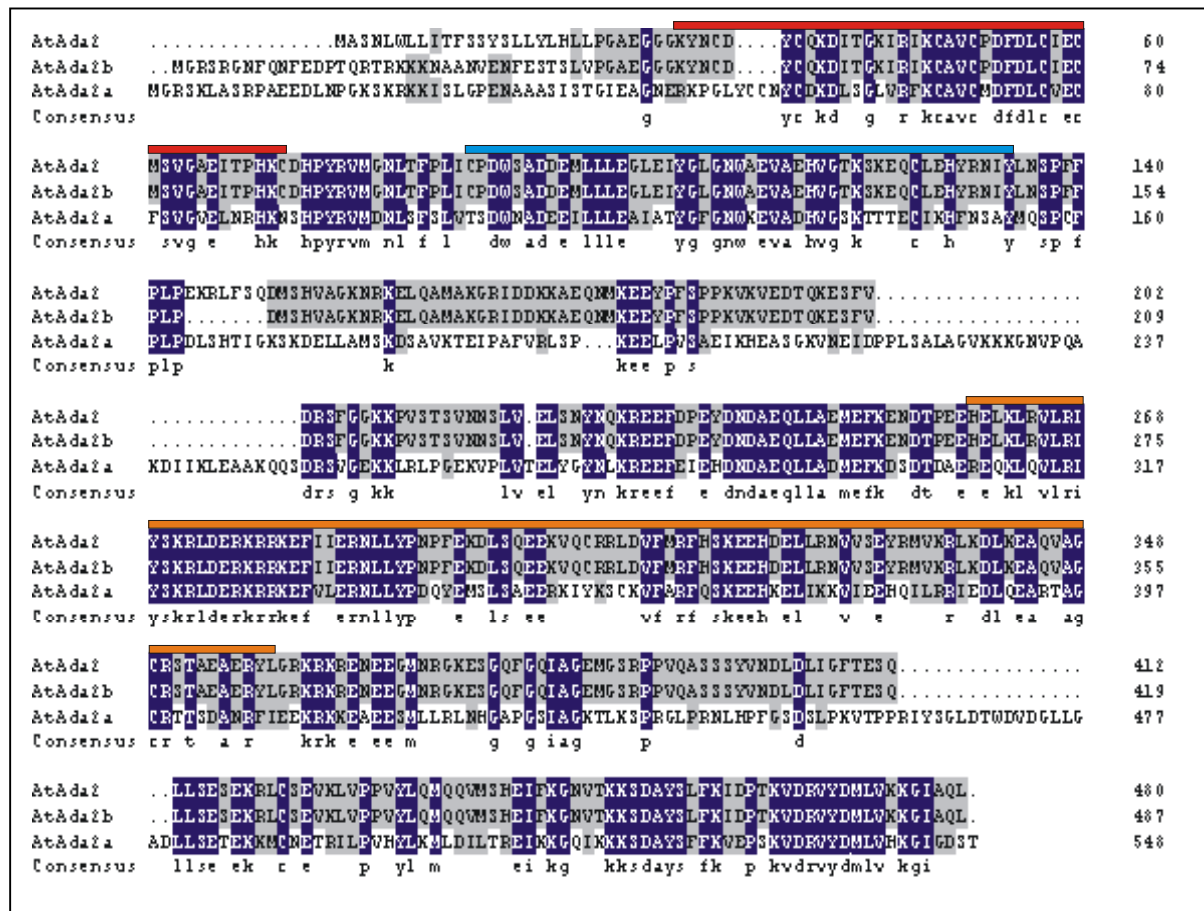
Zur Überprüfung der Proteine für den HAT-Assay wurden AtHAT und AtHAT1 in E.coli als GST-Fusionsproteine exprimiert, auf Nylonmembran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5 Antikörper geprobt (Abb.4.3.3.2.). Beide Proteine zeigen jeweils eine Bande in der errechneten Größe. Die Berechnung der Proteingrößen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ExpPASy ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)). Das GST-Fusionsprotein von AtHAT weist eine Größe von 71 kDa auf, AtHAT1-GST von 88 kDa. Zur Berechnung der nativen Proteingrößen müssen jeweils 23 kDa für GST abgezogen werden.



**Abb. 4.3.3.2. : Western Blots von AtHAT und AtHAT1.** AtHAT und AtHAT1 wurden in E.coli als GST-Fusionsproteine exprimiert, auf Nylonmembran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5 Antikörper geprobt.

### 4.4. Isolierung und Charakterisierung von *AtAda2*

Am Anfang dieser Arbeit war eine Transkriptionsadaptor-homologe Sequenz (*AtAda2*) aus *Arabidopsis thaliana* in den Datenbanken hinterlegt (CAB78684). Später wurden von (Stockinger et al., 2001) zwei *Ada2* Sequenzen (*AtAda2a* = AAK31319 und *AtAda2b* = AAK31320) publiziert. Wie sich herausstellte, ist die zuvor isolierte *AtAda2* Sequenz mit *AtAda2b* fast identisch (Abb. 4.4.). Lediglich der N-Terminus und ein Intron von 14 Aminosäuren, das von den Datenbankprogrammen nicht identifiziert wurde, unterscheidet die beiden Sequenzen.



**Abb. 4.4. : Vergleich der Aminosäuresequenzen von *AtAda2*, *AtAda2b* und *AtAda2a*.** Die Zink-Bindedomäne ist mit rot, die Myb-ähnliche Bindedomäne mit blau und die *Ada3* Interaktionsdomäne mit orange markiert. Acc. Nr.: *AtAda2* = CAB78684, *AtAda2b* = AAK31320, *AtAda2a* = AAK31319.

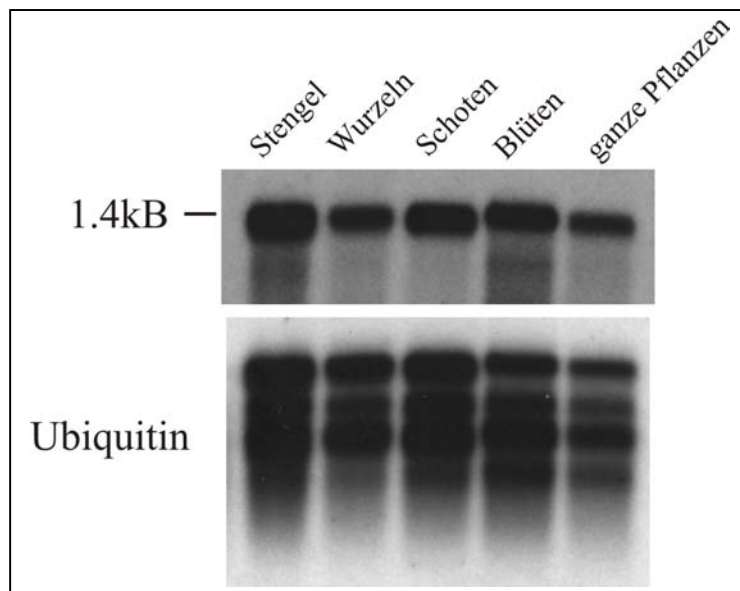
Das Alignment wurde mit dem BCM SEARCH LAUNCHER (Multiple Sequence Alignment, <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) erstellt und anschließend mit BOXSHADE 3.21 (ch.EMBNET.org, [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) bearbeitet. Die Domänen im Alignment wurden aufgrund der Vorhersage des

Computerprogramms Pfam 6.6 (<http://pfam.wustl.edu/index.html>) eingezeichnet. Hierzu wurden die Zink-Bindedomäne mit rot, die Myb-ähnliche Bindedomäne mit blau und die Ada3 Interaktionsdomäne mit orange markiert.

Die Sequenzen von *AtAda2*, *AtAda2a* und *AtAda2b* wurden mit Hilfe von Primern, die anhand der bekannten Sequenzen designed wurden, mittels RT-PCR kloniert. Zur genaueren Analyse dieser Proteine wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.4.1. Northern Blot Analyse von *AtAda2b*

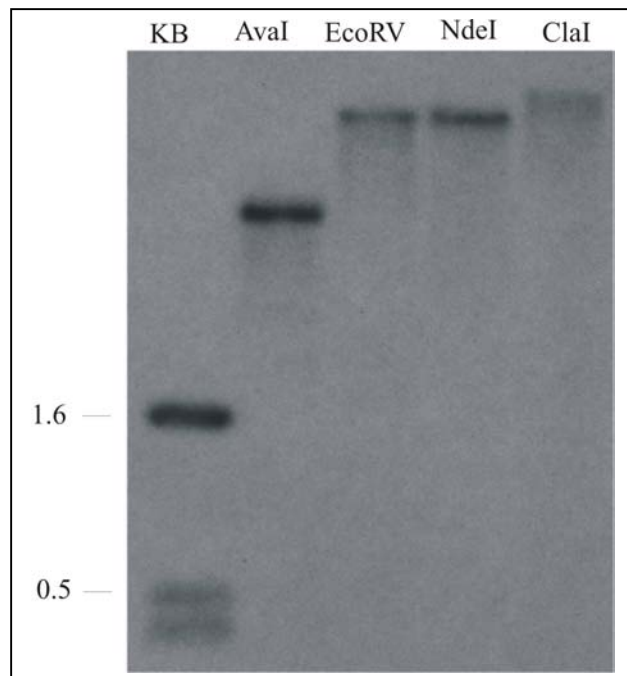
Zur Untersuchung der Expression von *AtAda2b*, wurden jeweils 10µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Stengeln, Wurzeln, Schoten, Blüten und ganzen Pflanzen aus der *Arabidopsis thaliana* Ecotyp Columbia-0 isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtAda2b* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde unter den gleichen Bedingungen hybridisiert. Wie in Abb. 4.4.1. zu erkennen ist, wird das *AtAda2b* Transkript in allen untersuchten Geweben mit einer Größe von 1.4kB exprimiert. Wie auch in der Ladungskontrolle zu erkennen ist, sind keine größeren Unterschiede in der Stärke der Expression innerhalb der verschiedenen *Arabidopsis* Gewebe zu erkennen.



**Abb. 4.4.1. : Northern Blot verschiedener Arabidopsisgewebe mit der *AtAda2b* Sonde.** Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von Stengeln, Wurzeln, Schoten, Blüten und ganzen Pflanzen wurden aus der *Arabidopsis* Linie Col0 isoliert, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtAda2b* Sonde bei 45°C in Gegenwart von 50% Formamid hybridisiert. Anschließend wurde der Filter mit der Ubiquitin Sonde zur Ladungskontrolle unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.

#### 4.4.2. Southern Blot Analyse von *AtAda2*

Um die Kopienzahl von *AtAda2* zu ermitteln, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurde genomische Arabidopsis Col-0-DNA mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme verdaut, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtAda2b* Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt (Abb. 4.4.2.1.). Wie deutlich zu erkennen ist, ist jeweils nur eine Bande zu erkennen, was auf ein Gen mit nur einer Kopie hindeutet. Da allerdings bekannt ist, daß es neben *Ada2b* noch ein *Ada2a* Transkript gibt, kann festgestellt werden, daß *Ada2b* und *Ada2a* nicht miteinander kreuzhybridisieren.

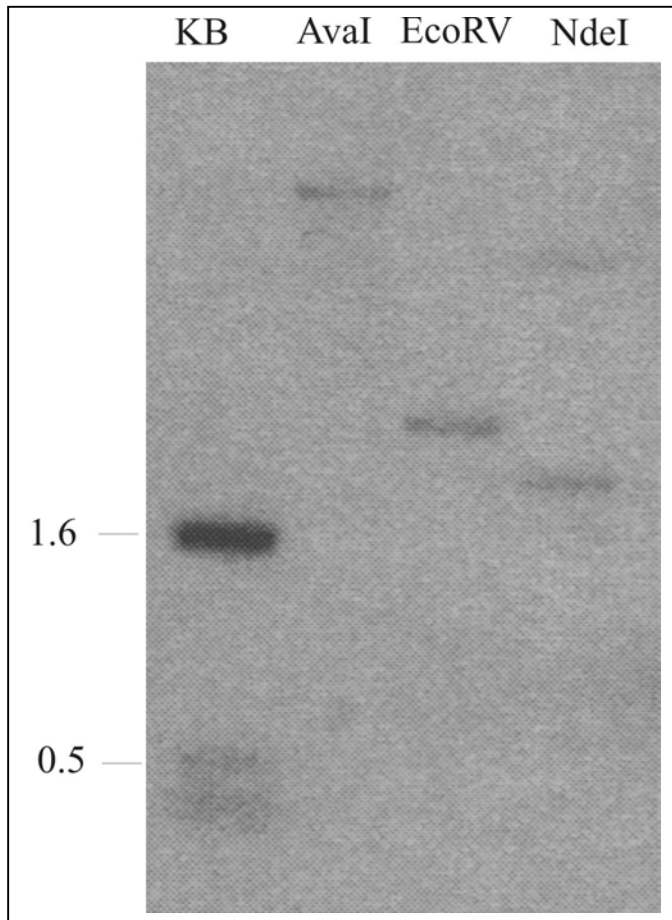


**Abb. 4.4.2.1. : Southern Blot der Arabidopsis Wildtyp-Linie Col-0 mit der *AtAda2b* Sonde.**

Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt.

Um diese Aussage zu überprüfen, wurde eine weitere Southernblot-Analyse mit der *Ada2a* Sonde durchgeführt.

Erneut wurde genomische Arabidopsis Col-0-DNA mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme verdaut, im 1% Agarosegel aufgetrennt, auf Hybond-N Membran geblottet und der Filter anschließend mit der *AtAda2a* Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt (Abb. 4.4.2.2.). Wie schon auf dem Filter, der mit der *AtAda2b* Sonde hybridisiert wurde, ist auch bei einer Hybridisierung mit *AtAda2a* jeweils nur eine Bande zu erkennen. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor gewonnenen Resultate die zeigen, daß *AtAda2b* und *AtAda2a* nicht miteinander kreuzhybridisieren.



**Abb. 4.4.2.2. : Southern Blot der Arabidopsis Wildtyp-Linie Col-0 mit der *AtAda2a* Sonde bei hoher Hybridisierungs-Stringenz.**

Die Hybridisierung wurde bei 65°C in Gegenwart von Dextran Sulfat, 20x SETS und 100x Denhardts durchgeführt.

## 4.5. Charakterisierung transgener Arabidopsis Pflanzen

### 4.5.1. Screening nach T-DNA Insertionslinien von *AtGCN5* und *AtAda2*

Zur Identifizierung einer biologischen Funktion von *AtGCN5* und *AtAda2* wurden transgene sense und antisense Arabidopsislinien hergestellt. Da die erzeugten Linien in der F<sub>2</sub>-Generation allerdings weder einen Phänotyp, noch eine Änderung der Proteinexpression zeigten, wurden die Versuche an diesen Linien eingestellt.

Zur Isolierung von Insertionslinien für *AtGCN5* und *AtAda2* mit Hilfe der Reversen Genetik wurde eine Kollektion von T-DNA Linien im Labor von Burkhard Schulz (MPI für Züchtungsforschung Köln) gescreent. Die Population besteht aus T-DNA Linien der Arabidopsis Stock Center der Ohio State University (Prof. Randy Scholl) und der University of Nottingham (Dr. Sean May). In 40% der Screens in dieser Population konnte in früheren Untersuchungen eine T-DNA Insertion innerhalb oder in unmittelbarer Nähe des gesuchten Gens identifiziert werden, wobei jede zweite Insertion innerhalb des offenen Leserasters des Gens lokalisiert war.

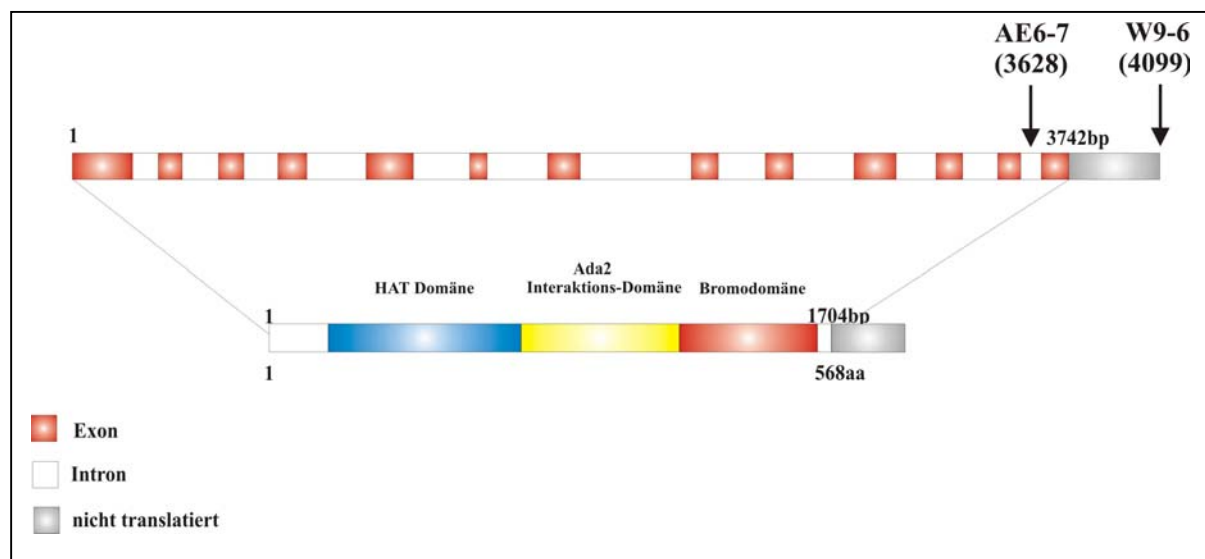
DNAs von 64.000 verschiedenen T-DNA Linien wurden isoliert, in Pools von je 1000 T-DNA Linien zusammengefasst und mittels PCR mit je einem genspezifischen, sowie einem T-DNA spezifischen Primer amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß die zu erwarteten Produkte eine Größe von 1.5kB nicht überschreiten, wobei für Gene mit einer Größe von mehr als 3kB mehrere genspezifische Primer entworfen wurden. Die PCR-Produkte werden auf Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonfilter geblottet und mit genspezifischen Sonden hybridisiert. Positive Signale wurden zur Sequenzierung der Insertionsstelle reamplifiziert und in Subpools von 100 Linien, 10 Linien und anschließend in der Einzelpflanze verifiziert. Samen der isolierten Einzelpflanze wurden ausgelegt und Pflanzen für die weitere Charakterisierung der Mutante herangezogen.



#### 4.5.2. Analyse von *AtGCN5* T-DNA Arabidopsislinien

Anhand des PCR Screens konnten zwei Arabidopsis T-DNA Insertionslinien für *AtGCN5* identifiziert werden (Abb. 4.5.2.1.). Die Linie W9-6 inseriert im C-terminalen, nicht translatierten Bereich von *AtGCN5*, 357 Basenpaare hinter dem Stop-Codon. Aufgrund der großen Distanz zum offenen Leseraster von *AtGCN5* wurde diese Insertionslinie nicht weiter analysiert.

Die Linie AE6-7 weist eine T-DNA Insertion im letzten Intron von *AtGCN5* auf. Diese Insertion betrifft den C-Terminus der Bromodomäne.



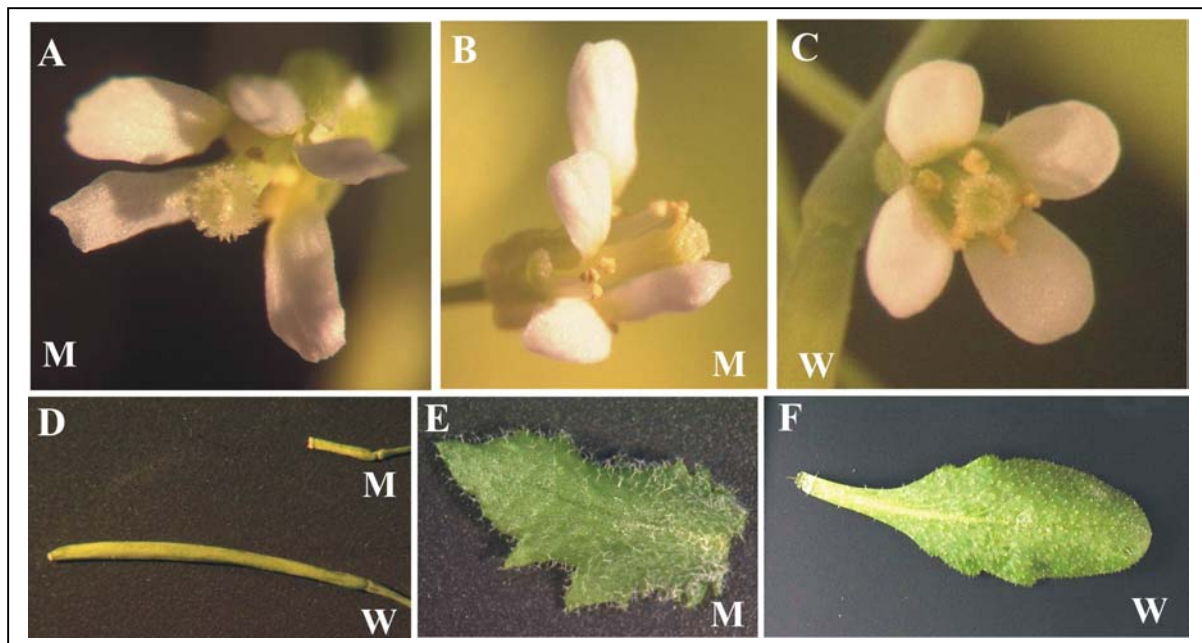
**Abb. 4.5.2.1. : Positionen von zwei T-DNA Insertionslinien in *AtGCN5*.** Die Insertion AE6-7 betrifft das letzte Intron der Bromodomäne. Die Insertion W9-6 inseriert 357bp hinter dem Stop-Codon.

Wie auf den folgenden Bildern zu erkennen ist, führt die T-DNA Insertion in der Linie AE6-7 zu einem stark verzögerten Wachstum der Mutante (Abb. 4.5.2.2.A). Im Gegensatz zum Wildtyp sind die Blätter gewellt und zackig und sterben von den Blatträndern her ab (Abb. 4.5.2.2.B). Im späteren Entwicklungsstadium (nach der Sproßbildung) (Abb. 4.5.2.2.C) ist deutlich zu erkennen, daß die Mutanten keine Apikaldominanz aufweisen. Die langsamere Entwicklung ist weiterhin deutlich sichtbar.

Aufnahmen mit Hilfe eines Binokulars zeigen, daß die Blüten eine abnormale Stellung der Blütenblätter aufweisen (Abb. 4.5.2.3.A,B), die Schoten wesentlich kleiner sind (Abb. 4.5.2.3.D), die Blätter Zacken aufweisen (Abb. 4.5.2.3.E) und nicht so gleichmäßig geformt sind wie der Wildtyp (Abb. 4.5.2.3.F).



**Abb. 4.5.2.2. : Vergleich der *AtGCN5* T-DNA Mutante mit *Arabidopsis* Wildtyp Pflanzen.** Die T-DNA Insertion in der Linie AE6-7 führt zu einem stark verzögerten Wachstum der Mutante (A). Im Gegensatz zum Wildtyp sind die Blätter gewellt und zackig und sterben von den Blatträndern her ab (B). Im späteren Entwicklungsstadium (C) ist deutlich zu erkennen, daß die Mutanten keine Apikaldominanz aufweisen. Die langsamere Entwicklung ist weiterhin deutlich sichtbar. M=Mutante, W=Wildtyp



**Abb. 4.5.2.3. : Vergleich von Blüten, Blätter und Schoten der *AtGCN5* T-DNA Mutante mit *Arabidopsis* Wildtyp Pflanzen.** Durch die T-DNA Insertion in der Linie AE6-7 zeigen die Blüten eine abnormale Stellung der Blütenblätter (A,B), die Schoten sind wesentlich kleiner (D) und die Blätter weisen gezackte Ränder auf (E) und sind nicht gleichmäßig geformt wie der Wildtyp (F).M=Mutante, W=Wildtyp

Die im Gegensatz zum Wildtyp wesentlich kleineren Schoten und die abnorme Blütenstellung deuten darauf hin, daß die Mutanten Probleme mit der Fortpflanzung haben, oder sogar steril sind. Die Nachkommenschaft aus diesen Schoten zeigte deutlich reduzierte Fertilität.

#### 4.5.3. PCR Analyse der *AtGCN5* T-DNA Insertionslinien

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der Pflanzen wirklich auf die T-DNA Insertion in der Bromodomäne von *AtGCN5* zurückzuführen ist, wurden verschiedene PCR Analysen durchgeführt. Mit Hilfe der in (Abb. 4.5.3. A) dargestellten Primerkombinationen wurden jeweils vier Pflanzenlinien mit einem Wildtyp-Phänotyp und mit dem Mutanten-Phänotyp mittels PCR untersucht. Als Kontrolle dienten zwei Columbia-0 Wildtyp-Pflanzen (Abb. 4.5.3. B).



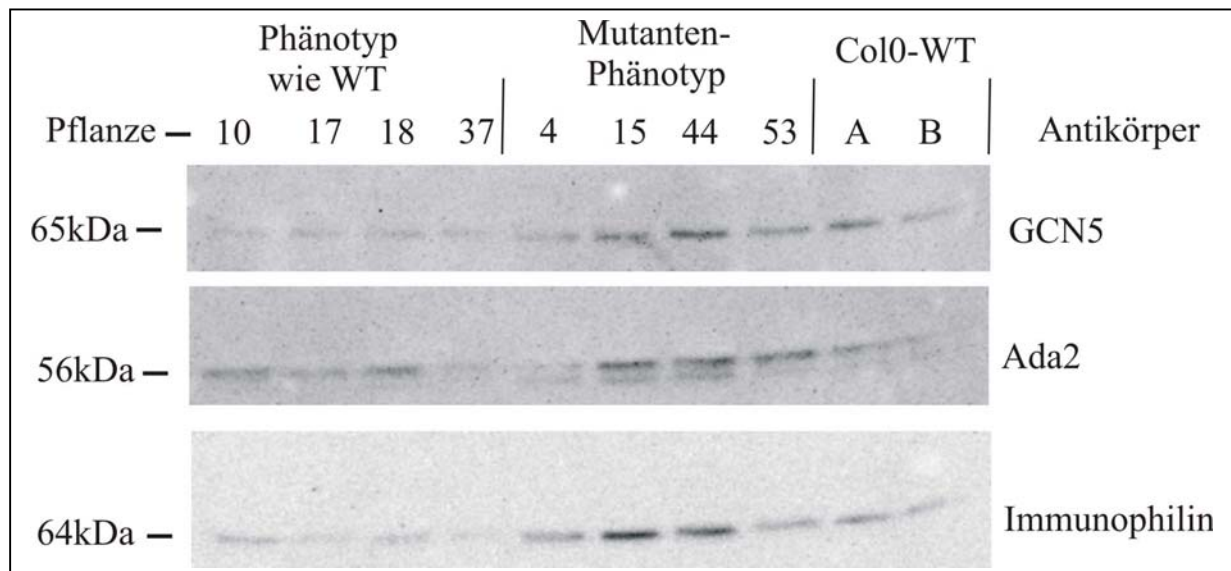
**Abb. 4.5.3. : PCR Analyse der *AtGCN5* T-DNA Insertionsmutante.** Mit Hilfe der in (A) dargestellten Primerkombinationen wurden PCR Analysen an jeweils vier Pflanzenlinien mit Wildtyp-Phänotyp und mit Mutanten-Phänotyp durchgeführt. Als Kontrolle dienten zwei Columbia-0 Wildtyp-Pflanzen (B). Die PCR-Produkte wurden im 1% Agarosegel aufgetrennt.

Die Amplifikation des gesamten *GCN5*-Gens mittels der Primerkombination G1-G7 gelang lediglich in den vier Linien mit WT-Phänotyp und in den Col-0- Linien. In den restlichen Linien ist die T-DNA-Insertion so groß, daß in der PCR Reaktion keine Amplifikation möglich war. Hierbei konnte in den PCR's auf DNA der Col-0- Linien eine Bande von 1704bp beobachtet werden, was der normalen Größe des *AtGCN5*-Gens entspricht. Die Banden der PCR-Produkte der anderen Linien weisen eine Größe von 4910bp auf, was auf die zusätzliche Insertion der T-DNA-Kopie in die *AtGCN5* Sequenz zurückzuführen ist. Die Amplifikation der ersten drei charakteristischen Domänen (HAT-Domäne, Ada2-Interaktionsdomäne und Bromodomäne) war in allen Linien möglich. Mit den

Primerkombinationen G2-G5, G6-G7 und G4-G5 konnte gezeigt werden, daß in allen Linien, mit Ausnahme der Col-0- Linien, eine T-DNA-Kopie in der Bromodomäne inseriert ist.

#### 4.5.4. Western Blot Analyse der *AtGCN5* T-DNA Insertionslinien

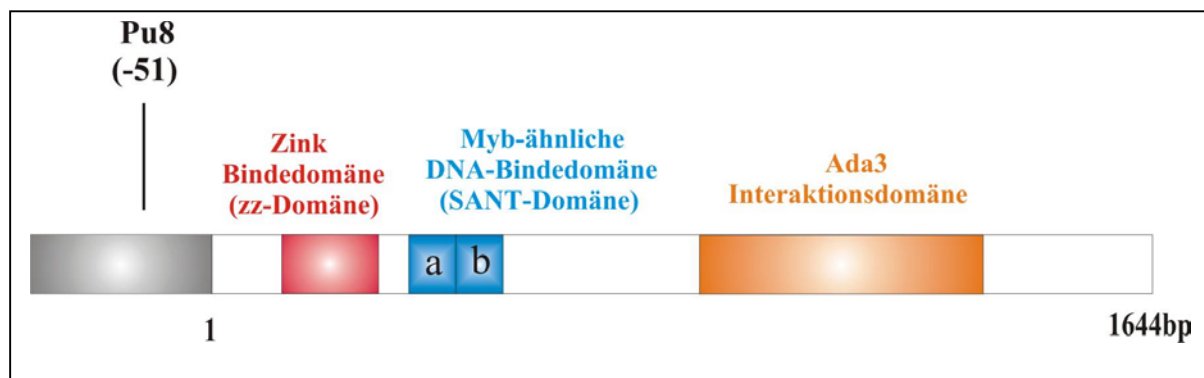
Um zu überprüfen, inwieweit sich die GCN5-Proteine in den T-DNA-Mutanten verändert haben, wurden Proteinextrakte von jeweils vier Linien mit einem Wildtyp-Phänotyp, mit dem Mutanten-Phänotyp und mit zwei Columbia-0 Wildtyp-Pflanzen als Kontrolle auf Nylon-Membran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5 Antikörper geprobt. Wie in Abb. 4.5.4. zu erkennen ist, konnten keine Unterschiede zwischen den T-DNA Linien und den Col-0-Pflanzen detektiert werden. Das ist darauf zurückzuführen, daß die T-DNA im letzten Intron inseriert und somit der Bereich hinter der T-DNA, der an den Antikörper bindet so kurz ist, daß der Größenunterschied der ohne dieses Stück erreicht wird, im Western Blot nicht sichtbar ist. Zur Kontrolle wurde der Antikörper vom Filter abgewaschen und der gleiche Filter mit dem anti-ZmAda2 Antikörper sowie mit dem anti-ZmImmunophilin Antikörper geprobt. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den T-DNA Linien und den Col-0-Pflanzen beobachtet werden.



**Abb. 4.5.4. : Western Blot Analyse der *AtGCN5* T-DNA Mutanten.** Proteinextrakte von jeweils vier Pflanzenlinien mit einem Wildtyp-Phänotyp, mit dem Mutanten-Phänotyp und mit zwei Columbia-0 Wildtyp-Pflanzen wurden auf Nylon-Membran geblottet und mit dem anti-ZmGCN5 Antikörper geprobt. Zur Kontrolle wurde der Antikörper vom Filter abgewaschen und mit dem anti-ZmAda2 Antikörper sowie mit dem anti-ZmImmunophilin Antikörper geprobt.

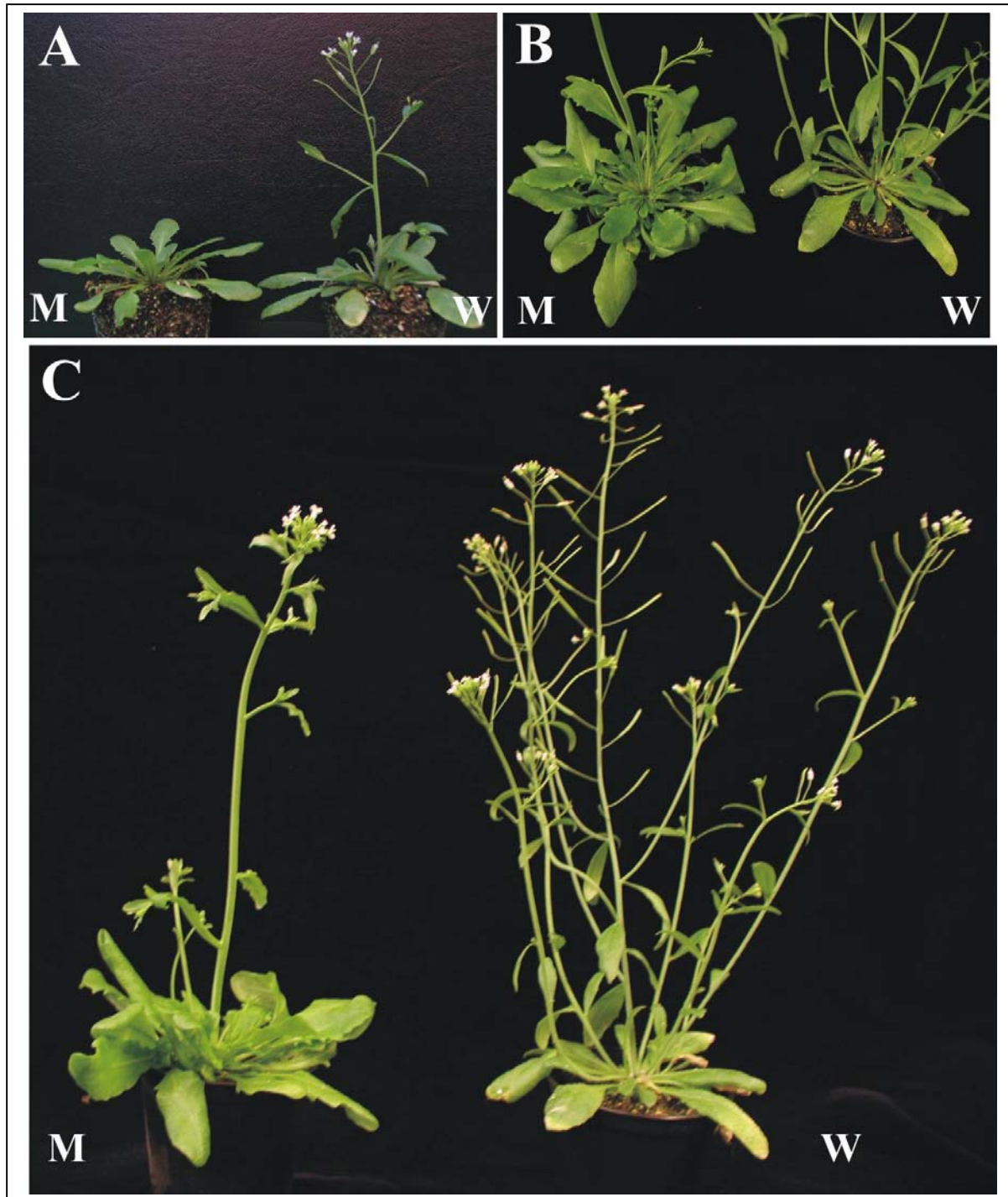
#### 4.5.5. Analyse der *AtAda2* T-DNA Insertionslinien

Anhand des PCR Screens konnte eine Arabidopsis T-DNA Insertionslinie für *AtAda2a* identifiziert werden (Abb. 4.5.5.1.). Die Linie Pu8 inseriert 51 Basenpaare vor dem Start-Codon von *AtAda2a*. Aufgrund der Distanz zum offenen Leseraster von *AtAda2a* konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, ob der beobachtete Phänotyp auf die T-DNA Insertion zurückzuführen ist.



**Abb. 4.5.5.1. : Positionen einer T-DNA Insertion vor *AtAda2a*.** Die Insertion Pu8 inseriert 51bp upstream des Start-Codons von *AtAda2a*.

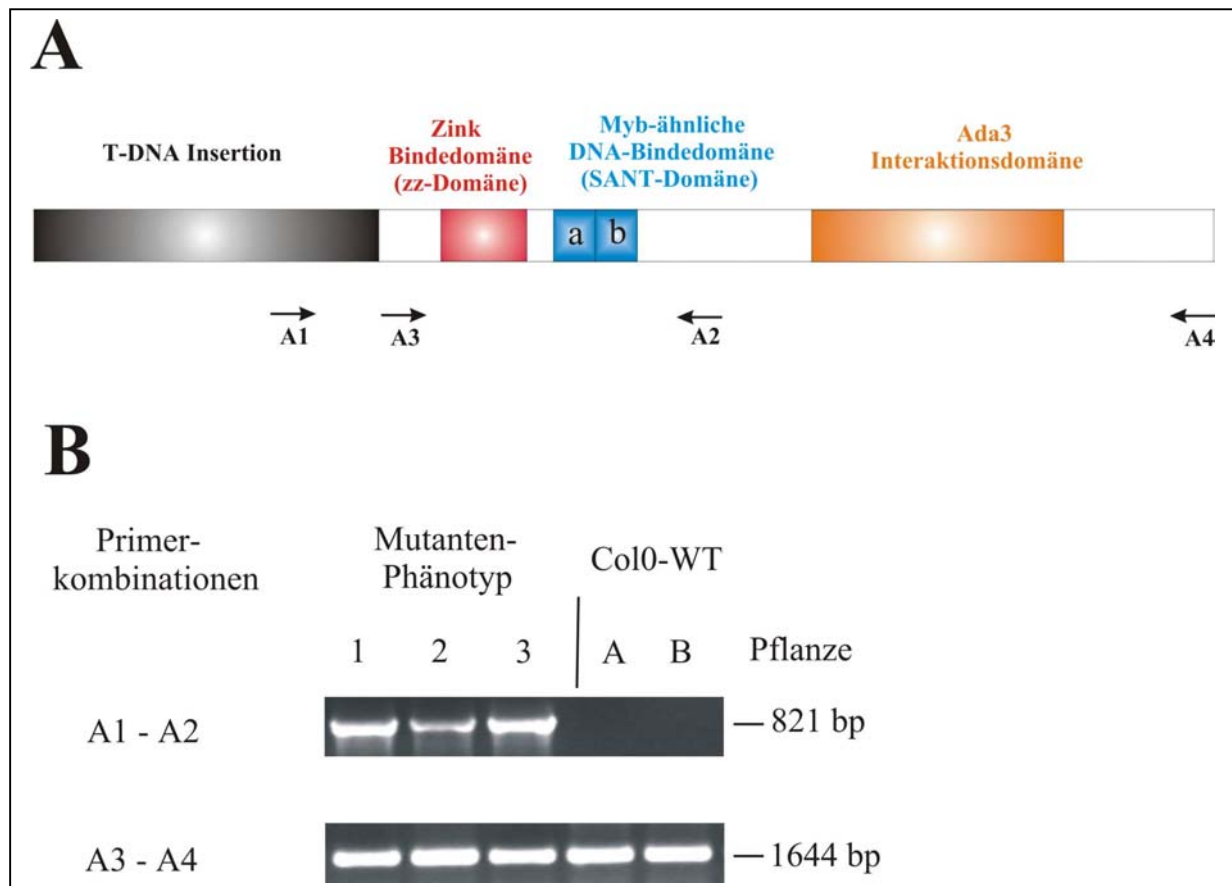
Wie auf den folgenden Bildern zu erkennen ist, führt die T-DNA Insertion vor *Ada2a* zu einem verzögerten Wachstum der Mutante (Abb.4.5.5.2 A). Die Rosette der Mutante weist im Vergleich zum Wildtyp wesentlich mehr Blätter auf (Abb.4.5.5.2 B). Im späteren Entwicklungsstadium (Abb.4.5.5.2 C) ist deutlich zu erkennen, daß die Mutanten einen stark entwickelten Hauptproß besitzt. Die verzögerte Entwicklung ist weiterhin sichtbar.



**Abb. 4.5.5.2. : Vergleich der *AtAda2a* T-DNA Mutante mit Arabidopsis Wildtyp Pflanzen.** Die T-DNA Insertion Vor *AtAda2a* führt zu einem verzögerten Wachstum der Mutante (A). Die Rosette der Mutante weist im Vergleich zum Wildtyp wesentlich mehr Blätter auf (B). Im späteren Entwicklungsstadium (C) ist deutlich zu erkennen, daß die Mutanten einen stark entwickelten Hauptsproß besitzt. Die verzögerte Entwicklung ist

#### 4.5.6. PCR Analyse der *AtAda2a* T-DNA Insertionslinien

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der Pflanzen tatsächlich auf die T-DNA Insertion vor *AtAda2a* zurückzuführen ist, wurden verschiedene PCR Analysen durchgeführt. Mit Hilfe der in (Abb. 4.5.6. A) dargestellten Primerkombinationen wurden drei Pflanzenlinien mit einem Mutanten-Phänotyp mittels PCR untersucht. Als Kontrolle dienten zwei Columbia-0 Wildtyp-Pflanzen (Abb. 4.5.6. B).



**Abb. 4.5.6. : PCR Analyse der *AtAda2a* T-DNA Mutante.** Mit Hilfe der in (A) dargestellten Primerkombinationen wurden PCR Analysen an drei Pflanzenlinien mit einem Mutanten-Phänotyp durchgeführt. Als Kontrolle dienten zwei Columbia-0 Wildtyp-Pflanzen (B). Die PCR-Produkte wurden im 1% Agarosegel aufgetrennt.

Mit den Primerkombinationen A1-A2 konnte gezeigt werden, daß in allen Linien, mit Ausnahme der Col-0-Linien, eine T-DNA vor dem *Ada2a*-Gen inseriert ist. Die Amplifikation des gesamten *Ada2a*-Gens mittels der Primerkombination A3-A4 gelang sowohl in den drei Linien mit Mutanten-Phänotyp, als auch in den Col0-WT Linien. Die Bande von 1644bp entspricht der normalen Größe des *AtAda2a*-Gens.



## 5. Diskussion

Die Chromatinorganisation spielt eine entscheidende Rolle in der Transkriptionsregulation (Allfrey et al., 1964). In großen Proteinkomplexen sind Histonacetyltransferasen in der Lage, Chromatin so zu modifizieren, daß sich die Verpackung der DNA im Nucleosom lockert und somit die DNA von der Transkriptionsmaschinerie abgelesen werden kann. Diese Komplexe sind in Hefe und dem menschlichen System (Grant et al., 1997; Pollard and Peterson, 1997; Saleh et al., 1997) weitgehend charakterisiert, in Pflanzen ist allerdings noch wenig bekannt. Eine der enzymatischen HAT's dieser Komplexe ist die Histonacetyltransferase GCN5, die über eine N-terminale HAT-Domäne (Brownell and Allis, 1996), eine Ada2 Interaktionsdomäne (Berger et al., 1992) und eine C-terminale Bromodomäne (Dhalluin et al., 1999) verfügt. In Hefe konnte gezeigt werden, daß isoliertes GCN5 verschiedene Lysine einzelner Histone acetyliert und in Komplexen mit anderen Proteinen auch in der Lage ist, Nucleosomen zu acetylieren (Utley et al., 1998; Grant et al., 1999).

GCN5 kommt in fast allen bisher untersuchten Komplexen mit dem Adaptorprotein Ada2 zusammen vor (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990; Pugh and Tjian, 1990). Adaptoren oder Coaktivatoren erleichtern möglicherweise durch Unterstützung der Interaktion zwischen Transkriptionsaktivatoren und der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie, die Transkription (Lewin, 1990; Ptashne and Gann, 1990; Roeder, 1991; Gill and Tjian, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der Histonacetyltransferase GCN5 und des Adaptorproteins Ada2 in Pflanzen genauer charakterisiert werden. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den bisher gewonnenen Daten, die vor allem in Hefe, dem Menschen und in *Taxoplasma* gewonnen wurden sollten analysiert werden. Hierzu wurden die Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (L.) und *Zea mays* (L.) gewählt. Ein entscheidender Punkt für die Aufklärung der biologischen Rolle von GCN5 und Ada2 in Mais und *Arabidopsis* könnte hierbei anhand von Knockout-Mutanten in *Arabidopsis* erfolgen.

## 5.1. Charakterisierung der HAT-Aktivität von ZmGCN5

Kurze Zeit nach der Entdeckung, daß TgGCN5 Histon-Acetyl-Transferase (HAT) Aktivität besitzt (Brownell et al., 1996) konnte auch für die anderen Mitglieder der GCN5-Familie eine HAT-Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem wurden zahlreiche Versuche unternommen, diese HAT-Aktivität weitergehend zu charakterisieren. Man fand übereinstimmend heraus, daß isolierte GCN5 Proteine freie Histone isolieren, nicht aber Nucleosomen. Die Acetylierung von Nucleosomen durch GCN5 war nur im Komplex mit anderen Proteinen möglich (Utley et al., 1998; Grant et al., 1999). Als minimale Einheit zur Acetylierung von Nucleosomen wurde ein Komplex der Proteine GCN5, Ada2 und Ada3 identifiziert (Balasubramanian et al., 2001).

Abweichend von diesen Ergebnissen konnte in Hefe gezeigt werden, daß isoliertes GCN5 sowohl verschiedene Lysine einzelner Histone acetyliert, als auch Nucleosomen unter speziellen Salzbedingungen (Tse et al., 1998). Neueste Untersuchungen in Hefe konnten diese Beobachtungen nicht bestätigen (Balasubramanian et al., 2001).

Um diese Beobachtungen in Mais zu überprüfen, wurde ZmGCN5 als GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und in einen HAT-Assay eingesetzt. Als Substrat wurden Nucleosomen, sowie Histone aus Maiskeimlingen der Wildtypelinie A188 isoliert. Als Kontrolle dienten Kalbs-Thymus Histone.

Wie in den Experimenten von (Utley et al., 1998) und (Grant et al., 1999) beschrieben, konnte das isolierte ZmGCN5 Protein sowohl die Mais-Histone, als auch die Kalbs-Thymus Histone problemlos acetylieren. Eine Acetylierung der Nucleosomen war allerdings weder unter Standardbedingungen, noch unter den, von (Tse et al., 1998) verwandten Salzbedingungen, möglich (Kapitel 4.1.3.). Bis zur Erstellung dieser Arbeit sind die, von (Tse et al., 1998) erzielten Ergebnisse, von keiner anderen Gruppe bestätigt worden.

Übereinstimmend mit den zuerst erzielten Beobachtungen, fand man heraus, daß die mRNA von GCN5 aus Mäusen und dem Menschen alternativ gespliced wird, so daß hier jeweils zwei Formen auftreten, von denen die kürzere nur freie Histone acetylieren kann, die längere jedoch auch in der Lage ist, Histone im Nucleosom zu acetylieren (Yang et al., 1996; Xu et al., 1998). Die längeren Formen dieser Proteine weisen im N-Terminus jeweils Homologie zum PCAF (p300/CBP assoziierender Faktor) Protein auf. PCAF zeigt wie auch GCN5 HAT Aktivität (Ogryzko et al., 1996).

Die längeren, N-terminalen Domänen der GCN5 Proteine von Mais, *Arabidopsis* und *Taxoplasma* zeigen keine Homologie zum PCAF Protein (Abb. 1.5.). Weder durch die Ergebnisse dieser Arbeit in Mais, als auch durch andere Gruppen in *Arabidopsis* oder *Taxoplasma* konnte die Acetylierung von Nucleosomen durch isolierte Proteine (ohne den Verband mit anderen Proteinen im Komplex) nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund ist eine Acetylierung von Nucleosomen durch isolierte Proteine dieser Art (ohne die Homologie zu PCAF im N-Terminus) eher unwahrscheinlich.

Bei der Untersuchung der Histon Acetylierungsspezifität fand man heraus, daß die GCN5 Proteine aus Hefe, Mensch und Maus spezifisch die Histone H3 und H4 acetylieren (Review:(Sterner and Berger, 2000)). Diese Spezifität beschränkt sich bei GCN5 aus Arabidopsis auf die Acetylierung des Histons H3 (Stockinger et al., 2001). Wie bereits in früheren Experimenten gezeigt werden konnte (Riehl, 1999), ist ZmGCN5 in der Lage, alle Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4) zu acetylieren. Allerdings werden die Histone H3 und H4 verstärkt acetyliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß ZmGCN5 in der Lage ist, alle vier Lysin-Reste (5, 8, 12 und 16) des Histons H4 zu acetylieren (Kapitel 4.1.4.).

## 5.2. Vorkommen von ZmGCN5 in Proteinkomplexen

Im Rahmen vieler verschiedener Arbeiten fand man heraus, daß die GCN5 Proteine der verschiedenen Spezies nicht alleine, sondern in großen Multiproteinkomplexen vorkommen (Review: (Naar et al., 2001)).

In früheren Experimenten konnten bereits zwei Histonacetyltransferase-Aktivitäten (HAT-A1 und HAT-A2) in Chromatinfractionen von Mais-Embryonen, als Bestandteile von Multiproteinkomplexen, nachgewiesen werden (Grabher et al., 1994). Allerdings war nicht klar, um welche Art von Histonacetyltransferasen es sich handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß es sich um Histonacetyltransferasen vom Typ A handelt, die im Kern vorkommen und nicht um Typ B HAT's, die hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert sind (Kapitel 4.1.5.). In weitergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß ZmGCN5 an beiden Aktivitäten beteiligt ist, vornehmlich aber in der HAT-A2 Fraktion vertreten ist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ZmGCN5, wie auch die anderen Mitglieder der GCN5-Familie in Komplexen vorkommt und seine enzymatischen Aufgaben dort erfüllt.

## 5.3. Isolierung von *ZmAda2*-Pollen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch das Expressionsmuster des *ZmAda2* Transkripts analysiert. Hierbei stellte sich heraus, daß *ZmAda2* in allen untersuchten Geweben exprimiert ist, wobei in Antheren, Narben, Schößlingen, Wurzeln, Blättern und Endosperm ein großes

Transkript von etwa 2kb zu erkennen ist. Im Gegensatz zu diesen Geweben wird in Pollen ein kleineres Transkript von etwa 1.7kb exprimiert. In Antheren ist neben dem großen auch das kleine Transkript zu beobachten, was darauf zurückzuführen ist, daß sich bei der Präparation der Poly(A)<sup>+</sup>-RNA noch Pollen in den Antheren befand (Kapitel 4.2.1.).

Zur Identifizierung des kleineren *ZmAda2* Transkriptes in Mais-Pollen (Kapitel 4.2.2.) wurden verschiedene Datenbanken nach homologen Sequenzen durchsucht. In der ZmDatabase (<http://www.zmdb.iastate.edu/>) wurde ein EST (AW165439) identifiziert, der Homologie zu *ZmAda2* aufweist. Dieser, einer cDNA Bank aus Fahnenprimordien entstammende EST ist identisch zum C-Terminus und einem Teil der nicht translatierten Sequenz von *ZmAda2*. Auf Sequenzebene konnten keine abweichenden Basen zu *ZmAda2* nachgewiesen werden. Die korrespondierende cDNA wurde mittels sequenzspezifischer Primer und RT-PCR isoliert, kloniert und als Sonde zur Durchsuchung einer cDNA Bank aus reifen Pollen der Mais-Inzuchtlinie A188 verwendet. Nach der Sequenzierung mehrerer Klone konnte eine Sequenz isoliert werden, die die Basen 595 bis 1695 der *ZmAda2* cDNA, den C-terminalen, nicht translatierten Bereich, sowie den polyA-Schwanz umfasst (Kapitel 4.2.2.1.). Abweichenden Basen im Vergleich zum *ZmAda2* Transkript konnten, wie schon bei der EST Sequenz, nicht identifiziert werden. Die isolierte Pollensequenz zeigt ein offenes Leseraster, jedoch ohne eine Startcodon im Bereich des N-Terminus. Mit Hilfe des anti-ZmAda2 Antikörpers konnte in Maispollen das verkürzte ZmAda2-Pollen Protein nachgewiesen werden. Die Größe der erhaltenen Bande korrespondierte allerdings nicht mit der Länge der isolierten cDNA. Da der 3'untranslatierte Bereich, sowie der Poly-A Schwanz in der isolierten Sequenz vorhanden sind, kann daraus geschlossen werden, daß ein Teil des N-Terminus der ZmAda2-Pollen Sequenz fehlt.

Die Durchsuchung einer zweiten pollenspezifischen cDNA Bank brachte keine weiteren Erkenntnisse. Nachdem auch eine RACE-Reaktion nicht zum gewünschten Ziel führte, wurde eine Primer Extension durchgeführt (Kapitel 4.2.2.2.). Hierbei stellte sich heraus, daß das isolierte Produkt des ZmAda2-Pollen Transkripts am N-Terminus acht Aminosäuren länger ist, als der in der Pollenbank isolierte Klon. Desweiteren konnte mit Hilfe einer Sequenzreaktion ein Startcodon identifiziert werden, dessen Position im N-Terminus des ZmAda2-Pollen Proteins mit der Bande im Westernblot korrespondiert.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, daß das ZmAda2-Pollen Transkript ein offenes Leseraster von 387 Aminosäuren aufweist. Aufgrund der Verkürzung am N-Terminus verfügt Zm-Ada2-Pollen lediglich noch über die Ada3-Interaktionsdomäne. Die Zink-Bindedomäne sowie die Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne sind nicht vorhanden.

Worauf die zwei *Ada2* Proteine in Mais zurückzuführen sind, konnte noch nicht geklärt werden. Aufgrund der identischen Sequenz der beiden Transkripte kann nahezu ausgeschlossen werden, daß es sich bei *ZmAda2*-Pollen um ein zweites *Ada2* Gen handelt. Zur Zeit werden zwei Modelle der Entstehung der beiden Transkripte diskutiert (Abb. 5.3.).

Zum einen könnte es sich bei *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen wie auch bei *HsGCN5* (Smith, 1998) und *MmGCN5* (Xu, 1998) um alternatives Splicing handeln (A). Im zweiten Modell (B) wird der Vermutung nachgegangen, daß das längere *ZmAda2* Transkript auf einen ersten Promotor zurückzuführen ist, das kürzere *ZmAda2*-Pollen Transkript auf einen zweiten Promotor in einem Intron in der genomischen *ZmAda2* Sequenz (A). Durch den inneren Promotor kann nur eine kürzere Sequenz transkribiert werden, so daß auch das translatierte Protein kürzer ist. Ein solcher Mechanismus konnte beim PPDK-Gen (pyruvate orthophosphate dikinase) aus Mais identifiziert werden (Sheen, 1991).



**Abb. 5.3. : Modelle der Entstehung von *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen.** Bei *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen kann es sich, wie auch bei *HsGCN5* und *MmGCN5*, um alternatives Splicing handeln (A). Allerdings kann das längere *ZmAda2* Transkript auch auf einen ersten Promotor zurückzuführen sein, das kürzere *ZmAda2*-Pollen Transkript auf einen zweiten Promotor in einem Intron in der genomischen *ZmAda2* Sequenz (B).

#### 5.4. Charakterisierung der Genaktivierung von *ZmGCN5*, *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen

Um die Auswirkung von *ZmGCN5*, *ZmAda2* und *ZmAda2*-Pollen auf Enhancer-vermittelte Genaktivierung durch den Transkriptionsfaktor *O2* zu untersuchen, wurde das Reporterkonstrukt b32/GUS sowohl ohne-, als auch mit Expressionsplasmid in Tabakprotoplasten transfiziert (Kapitel 4.2.5.). Als Effektorplasmide wurden *ZmO2*, *ZmAda2*, *ZmAda2*-Pollen und *ZmGCN5* jeweils unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors verwendet und die GUS-Aktivität anschließend photometrisch bestimmt.

Eine Kotransfektion des Reporterkonstrukts b32/GUS mit *GCN5* oder *Ada2* führte nicht zu einer Steigerung der GUS Aktivität im Vergleich zur Kotransfektion b32/GUS mit *O2*. Eine zusätzliche Transfektion mit *Ada2* und *GCN5* führte zu einem Rückgang der GUS Aktivität, nahezu auf das Level des Hintergrundes. Ersetzte man *Ada2* allerdings durch *Ada2*-Pollen stieg die Aktivität sprunghaft an.

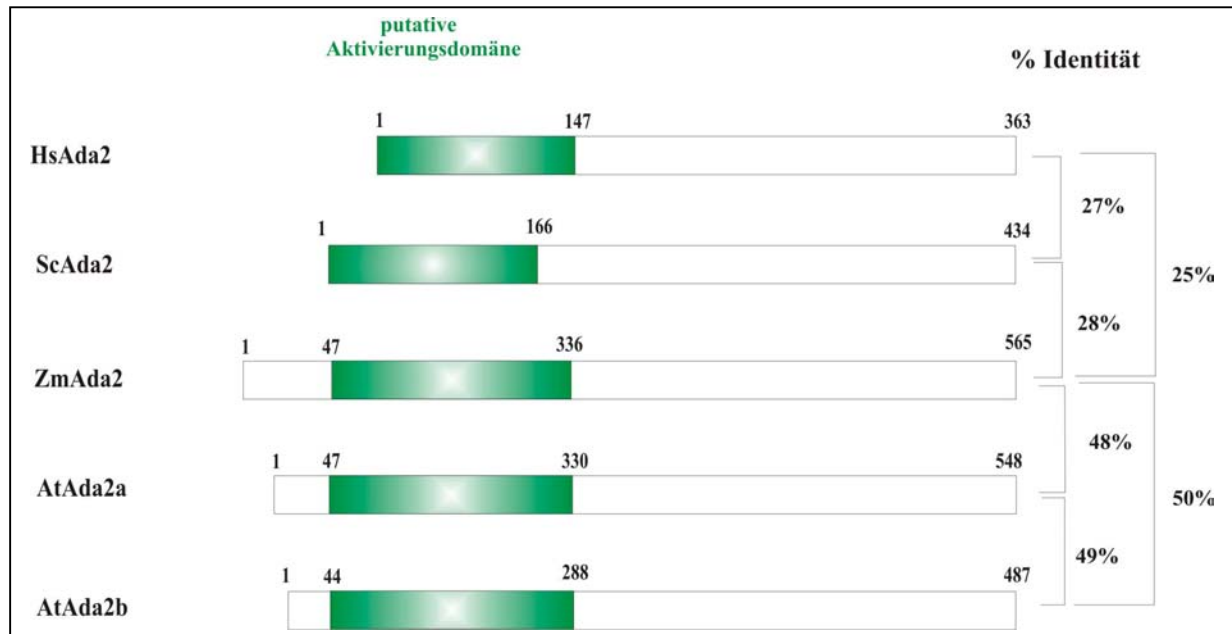
Es wird also deutlich, daß das Volllängen *Ada2*-Protein nicht zu einer Aktivierung des b32/GUS Reporterkonstruktes befähigt ist. Ersetzt man allerdings das Volllängen *Ada2*-Konstrukt durch das *Ada2*-Pollen Konstrukt, so ist eine deutliche Steigerung der GUS-Aktivität messbar. Aufgrund dieser Beobachtungen kann man davon ausgehen, daß der C-Terminus von *Ada2* die Aktivierung des b32/GUS Konstruktes bewirkt und somit eine Aktivierungsdomäne enthält.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen (Candau et al., 1996) überein, in denen beschrieben wird, daß eine gleichzeitige Kotransfektion von *HsAda2* und *HsGCN5* nicht zu einer verstärkten Aktivierung führt. Zur Begründung wurde eine Interaktion dieser Proteine mit anderen Komplexproteinen angeführt, die somit die Aktivität limitiert.

Die in diesem System eingesetzten Expressionsplasmide kommen im *in vivo* System -in den Komplexen- in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Da die Konzentrations-Verhältnisse nicht bekannt sind, wurden die Expressionsplasmide jeweils in gleicher Konzentration in den Assay eingebracht. Eine übermäßige Zugabe eines Transkriptionsfaktors kann zu inhibierenden Effekten führen (squelching). Die gewonnenen Ergebnisse müssen unter diesen Gesichtspunkten analysiert werden.

Die erzielten Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu früheren Ergebnissen (Candau et al., 1996), in denen beschrieben wird, daß die *Ada2*-Proteine aus Hefe und dem Menschen jeweils eine kryptische Aktivierungsdomäne im N-Terminus von *Ada2* enthalten, deren Aktivität durch die Volllängenproteine maskiert wird.

Diese Aussage beruht auf der Fusion von LexA mit verschiedenen *Ada2*-Deletionen und der anschließenden Aktivitätsmessung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Hefezellen. Hierbei zeigte eine Deletion, bei der nur der N-Terminus von *Ada2* mit LexA fusioniert wurde eine wesentlich höhere Aktivität als die Fusion des Volllängenproteins mit LexA. Daraus folgerten (Candau et al., 1996), daß die Aktivität durch die der Volllängenproteine maskiert wird. Aufgrund dieser Daten konnte diese putative Aktivierungsdomäne auch für die anderen Mitglieder der Ada2 Familie übernommen werden (Abb. 5.4.).



**Abb. 5.4. : Vergleich der putativen Aktivierungsdomäne verschiedener Ada2 Proteine.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Identitäten im Vergleich zu ZmAda2 auf Aminosäureebene angegeben. Acc. Nr.: HsAda2 = NP\_001479, ScAda2 = Q02336, AtAda2 = CAB78684, AtAda2b = AAK31320, AtAda2a = AAK31319.

## 5.5. Interaktionsstudien zwischen ZmGCN5 und ZmAda2/ZmAda2-Pollen

Die Histonacetyltransferase GCN5 und der transkriptionelle Adaptor Ada2 wurden als Untereinheiten in mehreren Multiproteinkomplexen identifiziert (Grant et al., 1997; Pollard and Peterson, 1997; Saleh et al., 1997). In den meisten dieser Komplexen kommt Ada2 zusammen mit GCN5 vor. Genetische und biochemische Untersuchungen zeigten zuerst in Hefe, daß GCN5 und Ada2 *in vitro* und *in vivo* miteinander interagieren (Marcus et al., 1994). Später wurde diese Interaktion auch für die anderen Spezies bestätigt. Weitere

Untersuchungen zeigten anschließend, daß GCN5 und Ada2 *in vitro* und *in vivo* miteinander interagieren und daß diese Faktoren mit Hilfe weiterer Aktivatoren bei der Transkriptions-Aktivierung vermitteln (Horiuchi et al., 1995; Candau and Berger, 1996).

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, interagieren die Maisproteine GCN5 und Ada2 ebenso *in vitro* und *in vivo* miteinander (Kapitel 4.2.6. und 4.2.7.).

Als Komponente der Interaktionsdomäne zwischen GCN5 und Ada2 konnte in vorangegangenen Experimenten eine Zink-Bindedomäne im N-Terminus von Ada2 identifiziert werden (Candau and Berger, 1996). Diese Beobachtung konnte auch für das Maisprotein bestätigt werden. Während ZmGCN5 und ZmAda2 *in vitro* und *in vivo* miteinander interagieren konnte eine Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2-Pollen nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Resultat ist mit dem Fehlen der N-terminalen Domäne von ZmAda2-Pollen zu erklären, die im Vollängenprotein die Zink-Bindedomäne enthält. Mit dem Verlust dieser Domäne ist ZmAda2-Pollen nicht mehr in der Lage, mit ZmGCN5 zu interagieren.

Die Interaktion zwischen ZmGCN5 und ZmAda2 konnte auch im Pflanzensystem (in Protoplasten) mittels der "FRET"-Technik nachgewiesen werden (Riyaz Bhat, persönliche Mitteilung).

## 5.6. Isolierung von *AtGCN5*

Um zu überprüfen ob die, mit *GCN5* in Mais erzielten Ergebnisse auch im Modellorganismus *Arabidopsis* Gültigkeit besitzen, wurden die Datenbanken nach diesem Protein durchsucht. Es wurde eine *GCN5*-homologe Histonacetyltransferase (AAB92257) aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHAT*) identifiziert, mittels sequenzspezifischer Primer und RT-PCR isoliert, kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert (Kapitel 4.3.).

Im May 2000 wurde eine, zum Hefe-*GCN5* orthologe *Arabidopsis* Sequenz (HAC000003), in der Pflanzen-Chromatindatenbank (The Plant Chromatin Database, <http://www.chromdb.org/>) unter dem Namen *GCN5* und anschließend auch in den anderen Datenbanken (SwissProt, PIR, PRF, PDB, GenBank und RefSeq, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>)) unter dem Namen *HAT1* (CAB77581) hinterlegt. Ebenso wie für *AtHAT* wurden auch für *AtHAT1* sequenzspezifischer Primer "designed" und das Protein mittels RT-PCR isoliert, kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert.

Im April 2001 wurde die Sequenz der Histonacetyltransferase *GCN5* aus *Arabidopsis* (AAK31321) von (Stockinger et al., 2001) veröffentlicht. *AtHAT1* und *AtGCN5*



unterscheiden sich lediglich in einer Insertion von 18 Aminosäuren in der HAT-Domäne von AtHAT1. Alle drei Proteine weisen über die gesamte Sequenz ein offenes Leseraster auf.

### **5.7. Vergleich der HAT-Aktivität von AtGCN5, AtHAT und AtHAT1**

Wie bei allen anderen Mitgliedern der GCN5 Familie konnte bereits auch für ZmGCN5 HAT-Aktivität nachgewiesen werden (Riehl, 1999). Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität der beiden isolierten Histonacetyltransferasen AtHAT und AtHAT1 wurden beide Proteine in *E.coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert. Als Substrat für die Acetylierungsreaktion wurden Kalbs-Thymus Histone verwendet. Wie sich herausstellte weisen weder AtHAT noch AtHAT1 im Gegensatz zu ZmGCN5 HAT-Aktivität auf (Kapitel 4.3.3.). Gegen Ende der Erstellung dieser Arbeit wurde dann die AtGCN5 Sequenz von (Stockinger et al., 2001) publiziert. Dieses, in *E.coli* exprimierte AtGCN5 Protein zeigt im Gegensatz zu AtHAT und AtHAT1 Histonacetyltransferase-Aktivität. AtGCN5 unterscheidet sich von AtHAT1 lediglich in der Insertion von 18 Aminosäuren innerhalb der HAT-Domäne. Diese Insertion scheint für die HAT-Aktivität zwingend erforderlich zu sein. AtHAT zeigt einen wesentlich kürzeren N-Terminus und einen, im Vergleich mit den beiden anderen Sequenzen, veränderten C-Terminus. Weiterhin sind in der AtHAT Sequenz die oben angesprochenen 18 Aminosäuren ebenfalls nicht vorhanden, was sich vermutlich in einer fehlenden HAT-Aktivität auswirkt. Durch die Insertion der 18 Aminosäuren könnte es zu einer anderen Faltung des Proteins und somit zum Funktionsverlust kommen.

### **5.8. Isolierung von *AtAda2a* und *AtAda2b***

Um zu überprüfen ob die, mit *Ada2* in Mais erzielten Ergebnisse auch im Modellorganismus *Arabidopsis* Gültigkeit besitzen, wurden die Datenbanken nach diesem Protein durchsucht. Es wurde eine Transkriptionsadaptor-ähnliche Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (*AtAda2* = CAB78684) identifiziert, mittels sequenzspezifischer Primer und RT-PCR isoliert, kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert (Kapitel 4.4.).

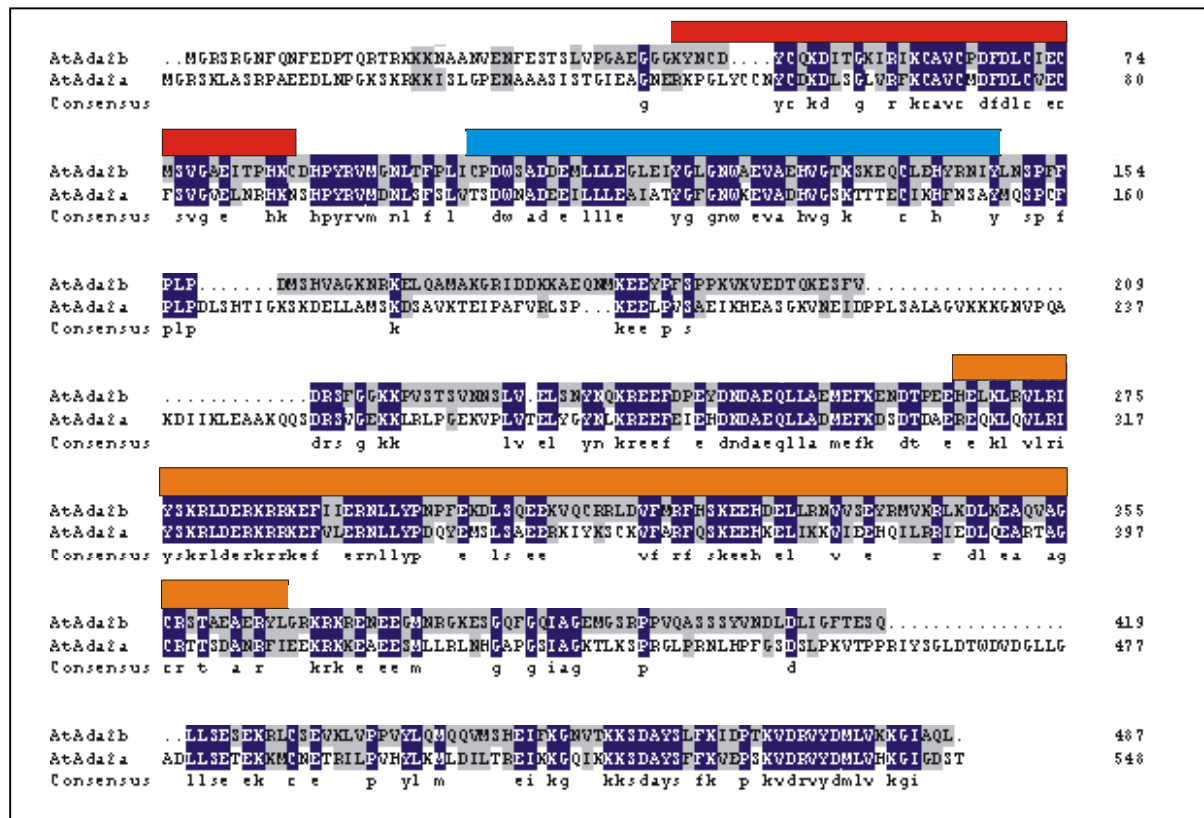
Später wurden von (Stockinger et al., 2001) zwei *Ada2*-Sequenzen (*AtAda2a* = AAK31319 und *AtAda2b* = AAK31320) publiziert. Wie sich herausstellte, ist die zuvor isolierte *AtAda2* Sequenz mit *AtAda2b* fast identisch. Lediglich der N-Terminus und ein Intron von 14 Aminosäuren, das von den Datenbankprogrammen nicht identifiziert wurde, unterscheidet die

beiden Sequenzen. Mittels sequenzspezifischer Primer und RT-PCR wurden sowohl *Ada2a*, als auch *Ada2b* isoliert, kloniert und als GST-Fusionsproteine exprimiert.

Ob die beiden Ada2 Proteine in *Arabidopsis* unterschiedliche Funktionen ausüben ist noch nicht bekannt. Eventuell kommen sie in unterschiedlichen Komplexen vor.

### 5.9. Charakterisierung von *AtAda2a* und *AtAda2b*

In Southernblot-Analysen von *AtAda2a* und *AtAda2b*, konnte jeweils nur eine Bande nachgewiesen werden, was auf ein Gen mit nur einer Kopie hindeutet (Kapitel 4.4.2.). Beide Gene kreuzhybridisieren nicht miteinander. Vergleicht man die Proteinsequenz beider Gene, so ergibt sich eine Identität von 49%, was die fehlende Kreuzhybridisierung allerdings erklärt (Abb. 5.9.).



**Abb. 5.9. : Vergleich der Aminosäuresequenzen von *AtAda2a* und *AtAda2b*.** Die Zink-Bindedomäne ist mit rot, die Myb-ähnliche Bindedomäne mit blau und die Ada3 Interaktionsdomäne mit orange markiert. Acc. Nr.: *AtAda2a* = AAK31319, *AtAda2b* = AAK31320.

Bei der, in den Datenbanken vorhandenen *Ada2* (CAB78684) Sequenz und *Ada2b* (AAK31320), scheint es sich um das gleiche Gen zu handeln. Eine Southernblot-Analyse mit

Hilfe der beiden isolierten Sequenzen ergab jeweils nur eine einzelne Bande. Das differierende Intron wurde von den Datenbankprogrammen nicht erkannt und der N-Terminus von *AtAda2* wurde anscheinend falsch erkannt. Außer *AtAda2a* und *AtAda2b* wurde bis zur Erstellung dieser Arbeit weder *AtAda2*, noch eine andere *Ada2* verwandte Sequenz aus *Arabidopsis* isoliert oder kloniert.

Im Rahmen der Northern-Blot Untersuchungen in verschiedenen Maisgeweben konnte, zusätzlich zu dem universell vorkommenden 2kb Transkript, in Mais-Pollen ein kleineres Transkript von *ZmAda2* mit einer Größe von 1.7kb identifiziert werden (Kapitel 4.2.1.). Ausgehend von dieser Beobachtung sollte auch *Arabidopsis*-Pollen auf das Vorhandensein eines kleineren Transkripts von *AtAda2* untersucht werden. Dieser Versuch konnte nicht durchgeführt werden, da es auch mit großen Mengen an Pflanzenmaterial nicht gelang, eine ausreichende Menge an Pollen zu sammeln, die für eine entsprechend große mRNA Präparation ausgereicht hätte. Hierbei bereitete vor allem die Isolierung und Aufreinigung der Pollen Schwierigkeiten.

Um dennoch einen Hinweis auf ein eventuell kürzeres *AtAda2* Transkript in *Arabidopsis*-Pollen zu erhalten, wurde mRNA aus ganzen Blüten mit Pollen präpariert. Nach der Hybridisierung mit der *AtAda2b*-Probe konnte dennoch kein kleineres Transkript identifiziert werden. Ausgehend von diesem Resultat kann man darauf schließen, daß im Gegensatz zu Mais, kein kürzeres *Ada2* Transkript in *Arabidopsis*-Pollen vorhanden ist.

## 5.10. Analyse transgener *AtGCN5* und *AtAda2* Pflanzen

Zur Identifizierung einer biologischen Funktion von *AtGCN5* und *AtAda2* wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit Hilfe des Agrobakteriumsystems hergestellt. Es wurden sowohl das *AtGCN5* Transkript, als auch das *AtAda2* Transkript in sense und antisense Orientierung sowie jeweils Linien mit einem FLAG Peptid (DYKDDDDK, Stratagene) erzeugt.

Die Pflanzen wurden in der F<sub>2</sub>-Generation analysiert. Alle Linien wurden durch PCR Analyse mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein des CaMV 35S Promotors untersucht, was einen Hinweis gibt, daß die Pflanzen die Konstrukte in ihr Genom aufgenommen haben.

In Western-Blot Experimenten wurden alle Linien mit verschiedenen Antikörpern untersucht. Hierbei stellte sich allerdings heraus, daß die Proteinkonzentrationen der transgenen Pflanzenlinien keine Unterschiede im Vergleich zu den *Arabidopsis* Columbia-0-Wildtyp-Pflanzen aufweisen. Alle Linien zeigten lediglich die Hintergrund-Proteinexpression des Wildtyps.

Aufgrund der Möglichkeit, Arabidopsis T-DNA-Linien von *GCN5* und *Ada2* zu erhalten, wurden die Arbeiten an den sense und antisense Linien eingestellt. Somit wurde nicht geklärt, ob die unveränderten Proteinkonzentrationen von AtGCN5 und AtAda2 auf Silencing zurückzuführen sind, wie es auch bei Arabidopsis-Mutanten der Histondeacetylase RPD3 (Finnegan, 2001) der Fall ist, oder andere Faktoren eine Rolle spielen.

### 5.11. Charakterisierung der *AtGCN5* T-DNA Insertionslinien

Die T-DNA-Insertionslinien der Histonacetyltransferase *AtGCN5* zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp wie CASH Pflanzen (Kapitel 4.5.2.)(Tian and Chen, 2001). Bei der *CASH* Mutante handelt es sich um antisense Pflanzen der Histondeacetylase *AtHDI*(Tian and Chen, 2001). Die Insertion der T-DNA-Kopie in der Bromodomäne von AtGCN5 könnte das gesamte Protein zerstören, aber auch die Korruption der Bromodomäne könnte zu irreversiblen Schädigungen des Proteins führen, da die Bromodomäne zuerst die acetylierten Histonden erkennt und bindet um weitere Acetylierungen zu ermöglichen (Jacobson et al., 2000). Somit wird durch die Zerstörung der Bromodomäne das gesamte GCN5 Protein in seiner enzymatischen Funktion blockiert.

Aufgrund der sehr zentralen Rolle von Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen während der Transkription ist der ähnliche Phänotyp der entsprechenden Mutanten nicht weiter überraschend. Anhand der essentiellen Rolle während der eukaryotischen Genregulation würde man Letalität der Nachkommen erwarten. Allerdings sind seit einiger Zeit sowohl Histonacetyltransferasen, als auch Histondeacetylasen bekannt, die zum gewissen Teil die Aufgaben von *AtGCN5* und *AtHDI* übernehmen können, so daß man mit einer starken Schädigung der Mutanten, allerdings nicht von Letalität ausgehen kann.

Die Funktion von AtGCN5 könnte zum Beispiel durch die Proteine p300/CBP (Bordoli et al., 2001), die ebenfalls über HAT-Aktivität verfügen, ersetzt werden. Bei NuRD und SIN3 handelt es sich um zwei Histondeacetylase-Komplexe, die ebenfalls die Funktion anderer Histondeacetylasen übernehmen könnten (Ahringer, 2000).

Sowohl bei den CASH Pflanzen, als auch bei den *AtGCN5* T-DNA Insertionslinien handelt es sich jeweils um die ersten beschriebenen Mutanten von pflanzlichen Histonacetyltransferase- und Histondeacetylase-Mutanten.

Da die *AtGCN5* T-DNA Insertionslinien noch nicht vollständig molekularbiologisch untersucht sind, gibt der Phänotyp jedoch einen starken Hinweis, daß es sich bei den isolierten Linien tatsächlich um die Mutanten der Histonacetyltransferase *AtGCN5* handelt.

Wie diese, zeigen auch die CASH Pflanzen ein stark verzögertes Wachstum und einen verzögerten Blühzeitpunkt, asymmetrische Blätter und Blüten, teilweise fünf Blütenblätter, sowie den Verlust der Apikaldominanz. Im Gegensatz zu den CASH Pflanzen zeigen die *AtGCN5* T-DNA Pflanzen keine männliche und weibliche Sterilität. Bei den CASH Pflanzen sind verschieden stark ausgeprägte Phänotypen zu beobachten, was bei den *AtGCN5* T-DNA Pflanzen nicht der Fall ist.

Um sicherzustellen, daß es sich bei der isolierten T-DNA Insertionspflanze tatsächlich um eine *AtGCN5*-Mutante handelt, muß noch eine Komplementationsanalyse durchgeführt werden. Hierzu soll eine intakte Kopie des mutierten Gens in die Mutante transformiert werden, um den Wildtyp-Phänotyp wieder herzustellen.

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß *ZmGCN5* die Hefemutante im *GCN5*-Gen nicht komplementieren kann (Stephen Slocombe, persönliche Mitteilung). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß weder *HsGCN5*, noch *TgGCN5* die *ScGCN5*-Mutante komplementieren konnten (Anafi et al., 2000) (Hettmann and Soldati, 1999). Im Falle von *TgGCN5* wurde allerdings gezeigt, daß die HAT-Domäne für eine Komplementation ausreicht (Hettmann and Soldati, 1999).

## 5.12. Charakterisierung der *AtAda2a* T-DNA Insertionslinien

Anhand der durchgeführten PCR-Experimente konnte gezeigt werden, daß die T-DNA 51 Basenpaare vor dem Startcodon von *AtAda2* inseriert ist (Kapitel 4.5.5.).

Die T-DNA Insertion vor *AtAda2a* führt zu einem verzögerten Wachstum der Mutante. Die Rosette der Mutante weist im Vergleich zum Wildtyp wesentlich mehr Blätter auf. Im späteren Entwicklungsstadium ist deutlich zu erkennen, daß die Mutanten einen stark entwickelten Hauptsproß besitzt. Die verzögerte Entwicklung ist weiterhin sichtbar.

Da die *AtAda2a* T-DNA Insertionslinien noch nicht vollständig molekularbiologisch untersucht sind, konnte noch nicht nachgewiesen werden, daß es sich bei den isolierten Linien tatsächlich um die Mutanten des Adaptorproteins *AtAda2a* handelt. Um sicherzustellen, daß es sich bei der isolierten T-DNA Insertionspflanze tatsächlich um eine *AtAda2a* Mutante handelt, muß noch eine Komplementationsanalyse durchgeführt werden.

Es konnte bisher gezeigt werden, daß menschliches *Ada2* nicht in der Lage ist, eine *Ada2* Mutante aus Hefe zu komplementieren (Anafi et al., 2000).

## 6. Zusammenfassung

Transkriptionsfaktoren sind lediglich mit Hilfe einer weiteren Gruppe von Proteinen, die als Adaptoren, Mediatoren oder Coaktivatoren bezeichnet werden (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990; Pugh and Tjian, 1990) in der Lage, ihre Funktionen in der geordneten Durchführung der Transkription, auszuüben. Eine konservierte Komponente dieser Komplexe ist die Histonacetyltransferase GCN5, die in fast allen bisher untersuchten Komplexen mit dem Adaptorprotein Ada2 zusammen vorkommt (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990; Pugh and Tjian, 1990). In Hefe konnte gezeigt werden, daß isoliertes GCN5 verschiedene Lysine einzelner Histone acetyliert und in Komplexen mit anderen Proteinen auch in der Lage ist, Nucleosomen zu acetylieren (Utley et al., 1998; Grant et al., 1999).

Nachdem GCN5 und Ada2 aus Mais isoliert und die enzymatische Aktivität von ZmGCN5 nachgewiesen werden konnte (Riehl, 1999), wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß ZmGCN5 in der Lage ist, alle vier Lysin-Reste (5, 8, 12 und 16) des Histons H4 zu acetylieren. Abweichend von Ergebnissen früherer Arbeiten in Hefe die zeigten, daß isoliertes GCN5 sowohl verschiedene Lysine einzelner Histone, als auch Nucleosomen unter speziellen Salzbedingungen acetyliert (Tse et al., 1998), konnten diese Beobachtungen in Mais nicht reproduziert werden. Neueste Untersuchungen in Hefe konnten diese Beobachtungen ebenfalls nicht bestätigen (Balasubramanian et al., 2001).

Es konnte nachgewiesen werden daß ZmGCN5, wie auch die anderen Mitglieder der GCN5-Familie, nicht alleine sondern in großen Multiproteinkomplexen vorkommt (Review: Naar et al., 2001) und seine Aufgabe dort als Histonacetyltransferase vom Typ HAT-A erfüllt.

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Geweben konnte nachgewiesen werden, daß in Mais-Pollen sowohl ein kleineres ZmAda2 Transkript, als auch ein kleineres ZmAda2 Protein exprimiert werden. ZmAda2 und ZmAda2-Pollen unterscheiden sich lediglich in einer N-terminalen Deletion, wodurch in ZmAda2-Pollen die Zink-Bindedomäne sowie die Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne nicht mehr vorhanden sind. Durch den Verlust der N-terminalen Domäne ist ZmAda2-Pollen im Gegensatz zu ZmAda2 nicht mehr in der Lage, *in vitro* oder *in vivo* mit ZmGCN5 zu interagieren.

Um zu überprüfen ob die, mit GCN5 und Ada2 in Mais erzielten Ergebnisse auch im Modellorganismus *Arabidopsis* Gültigkeit besitzen, wurden anhand von Datenbanksequenzen eine GCN5-homologe Histonacetyltransferase (AtHAT = AAB92257) und eine Transkriptionsadaptor-ähnliche Sequenz (AtAda2 = CAB78684) aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert, mittels sequenzspezifischer Primer und RT-PCR isoliert, kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert.

Gegen Ende der Erstellung dieser Arbeit wurde eine weitere AtGCN5 Sequenz von (Stockinger et al., 2001) publiziert. Dieses, in *E.coli* exprimierte AtGCN5 Protein unterscheidet sich von AtHAT lediglich in der Insertion von 18 Aminosäuren innerhalb der HAT-Domäne, weist allerdings im Gegensatz zu AtHAT Histonacetyltransferase-Aktivität auf.

Mit Hilfe der Reversen Genetik wurde eine Kollektion von T-DNA-Insertionslinien im Labor von Burkhard Schulz (MPI für Züchtungsforschung Köln) gescreent und Insertionslinien von *AtGCN5* und *AtAda2a* isoliert. Die T-DNA-Linien der Histonacetyltransferase *AtGCN5* zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp wie antisense Pflanzen der Histondeacetylase AtHD1 (CASH Pflanzen) (Tian and Chen, 2001). Die T-DNA Insertion vor *AtAda2a* führt zu einem verzögerten Wachstum der Mutante, einer stark beblätterten Rosette und einem stark entwickelten Hauptsproß.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aasland, R., Stewart, A.F. and Gibson, T.: The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem Sci* 21 (1996) 87-8.
- Agre, P., Johnson, P.F. and McKnight, S.L.: Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP. *Science* 246 (1989) 922-6.
- Ahringer, J.: NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* 16 (2000) 351-6.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A.E.: Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51 (1964) 786-794.
- Allis, C.D., Chicoine, L.G., Richman, R. and Schulman, I.G.: Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 8048-52.
- Alting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M.: pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol* 216 (1992) 483-95.
- Anafi, M., Yang, Y.F., Barlev, N.A., Govindan, M.V., Berger, S.L., Butt, T.R. and Walfish, P.G.: GCN5 and ADA adaptor proteins regulate triiodothyronine/GRIP1 and SRC-1 coactivator-dependent gene activation by the human thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 14 (2000) 718-32.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N.: The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 10148-52.
- Azpiroz-Leehan, R. and Feldmann, K.A.: T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet* 13 (1997) 152-6.
- Balasubramanian, R., Pray-Grant, M.G., Selleck, W., Grant, P.A. and Tan, S.: Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J Biol Chem* (2001).
- Bannister, A.J. and Miska, E.A.: Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 1184-92.
- Bannister, A.J., Miska, E.A., Gorlich, D. and Kouzarides, T.: Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* 10 (2000) 467-70.
- Barlev, N.A., Candau, R., Wang, L., Darpino, P., Silverman, N. and Berger, S.L.: Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *J Biol Chem* 270 (1995) 19337-44.
- Bartels, D. and Thompson, R.D.: The characterization of cDNA clones coding for wheat storage proteins. *Nucleic Acids Res* 11 (1983) 2961-77.



- Baumann E, L.J., Saedler H, Schulz B, Wisman E: Successful PCR based reverse genetic screens using an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generated via single seed descent. *Theor Appl Gen* in press (1998).
- Benson, J.D., Benson, M., Howley, P.M. and Struhl, K.: Association of distinct yeast Not2 functional domains with components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes. *Embo J* 17 (1998) 6714-6722.
- Berger, S.L., Cress, W.D., Cress, A., Triezenberg, S.J. and Guarente, L.: Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61 (1990) 1199-208.
- Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapite, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J. and Guarente, L.: Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* 70 (1992) 251-65.
- Bevan, M.: Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12 (1984) 8711-21.
- Bonner, W.M. and Laskey, R.A.: A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 46 (1974) 83-8.
- Bordoli, L., Netsch, M., Luthi, U., Lutz, W. and Eckner, R.: Plant orthologs of p300/CBP: conservation of a core domain in metazoan p300/CBP acetyltransferase-related proteins. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 589-97.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y. and Ogryzko, V.: Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396 (1998) 594-8.
- Bradbury, E.M.: Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 14 (1992) 9-16.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- Brownell, J.E. and Allis, C.D.: Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6 (1996) 176-84.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D.: Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84 (1996) 843-51.
- Buratowski, S.: The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77 (1994) 1-3.
- Burnette, W.N.: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112 (1981) 195-203.
- Candau, R. and Berger, S.L.: Structural and functional analysis of yeast putative adaptors. Evidence for an adaptor complex in vivo. *J Biol Chem* 271 (1996) 5237-45.

- Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A. and Berger, S.L.: Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 593-602.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D. and Evans, R.M.: Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98 (1999) 675-86.
- Cheung, W.L., Briggs, S.D. and Allis, C.D.: Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2000) 326-33.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. and Goodman, R.H.: Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365 (1993) 855-9.
- Clarke, D.J., O'Neill, L.P. and Turner, B.M.: Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 294 (1993) 557-61.
- Collart, M.A. and Struhl, K.: CDC39, an essential nuclear protein that negatively regulates transcription and differentially affects the constitutive and inducible HIS3 promoters [published erratum appears in *EMBO J* 1993 Jul;12(7):2990]. *Embo J* 12 (1993) 177-86.
- Collart, M.A. and Struhl, K.: NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev* 8 (1994) 525-37.
- de la Barre, A.E., Gerson, V., Gout, S., Creaven, M., Allis, C.D. and Dimitrov, S.: Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *Embo J* 19 (2000) 379-91.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M.: Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399 (1999) 491-6.
- Dilkes, B.P. and Feldmann, K.A.: Cloning genes from T-DNA tagged mutants. *Methods Mol Biol* 82 (1998) 339-51.
- Drysdale, C.M., Jackson, B.M., McVeigh, R., Klebanow, E.R., Bai, Y., Kokubo, T., Swanson, M., Nakatani, Y., Weil, P.A. and Hinnebusch, A.G.: The Gcn4p activation domain interacts specifically in vitro with RNA polymerase II holoenzyme, TFIID, and the Adap-Gcn5p coactivator complex. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 1711-24.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T. and Tjian, R.: Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66 (1991) 563-76.
- Eberharter, A., John, S., Grant, P.A., Utley, R.T. and Workman, J.L.: Identification and Analysis of Yeast Nucleosomal Histone Acetyltransferase Complexes. *Methods* 15 (1998) 315-321.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C.: A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 1349.

- Eisenmann, D.M., Arndt, K.M., Ricupero, S.L., Rooney, J.W. and Winston, F.: SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 6 (1992) 1319-31.
- Elfring, L.K., Daniel, C., Papoulas, O., Deuring, R., Sarte, M., Moseley, S., Beek, S.J., Waldrip, W.R., Daubresse, G., DePace, A., Kennison, J.A. and Tamkun, J.W.: Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148 (1998) 251-65.
- Feix, G. and Quayle, T.: Structure and expression of zein genes of maize. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12 (1993) 112-127.
- Fields, S. and Song, O.: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (1989) 245-6.
- Finnegan, E.J.: Is plant gene expression regulated globally? *Trends Genet* 17 (2001) 361-5.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. and Ausio, J.: Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* 270 (1995) 17923-8.
- Georgakopoulos, T. and Thireos, G.: Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *Embo J* 11 (1992) 4145-52.
- Gill, G. and Tjian, R.: Eukaryotic coactivators associated with the TATA box binding protein. *Curr Opin Genet Dev* 2 (1992) 236-42.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G.: The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14 (2000) 121-41.
- Goldstein, R.E., Jimenez, G., Cook, O., Gur, D. and Paroush, Z.: Hucklebein repressor activity in *Drosophila* terminal patterning is mediated by Groucho. *Development* 126 (1999) 3747-55.
- Goodman, R.H. and Smolik, S.: CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14 (2000) 1553-77.
- Goodrich, J.A., Cutler, G. and Tjian, R.: Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84 (1996) 825-30.
- Grabher, A., Brosch, G., Sendra, R., Lechner, T., Eberharter, A., Georgieva, E.I., Lopez-Rodas, G., Franco, L., Dietrich, H. and Loidl, P.: Subcellular location of enzymes involved in core histone acetylation. *Biochemistry* 33 (1994) 14887-95.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. and Workman, J.L.: Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11 (1997) 1640-50.
- Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R.G., Turner, B.M. and Workman, J.L.: Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* 274 (1999) 5895-900.

- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates, J.R., 3rd and Workman, J.L.: A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation [see comments]. *Cell* 94 (1998a) 45-53.
- Grant, P.A., Sterner, D.E., Duggan, L.J., Workman, J.L. and Berger, S.L.: The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin- modifying complexes. *Trends Cell Biol* 8 (1998b) 193-7.
- Grunstein, M.: Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* 93 (1998) 325-8.
- Gu, W. and Roeder, R.G.: Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90 (1997) 595-606.
- Guenther, M.G., Barak, O. and Lazar, M.A.: The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 6091-101.
- Hansen, J.C., Tse, C. and Wolffe, A.P.: Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37 (1998) 17637-41.
- Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fonzo, N., Motto, M., Salamini, F. and Thompson, R.: The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *Embo J* 8 (1989) 2795-801.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M. and Grunstein, M.: Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80 (1995) 583-92.
- Hettmann, C. and Soldati, D.: Cloning and analysis of a toxoplasma gondii histone acetyltransferase: a novel chromatin remodelling factor in apicomplexan parasites [In Process Citation]. *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4344-52.
- Hoffman, C.S. and Winston, F.: A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene* 57 (1987) 267-72.
- Hope, I.A. and Struhl, K.: Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46 (1986) 885-94.
- Horiuchi, J., Silverman, N., Marcus, G.A. and Guarente, L.: ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 1203-9.
- Horiuchi, K. and Fujimoto, D.: Use of phosph-cellulose paper disks for the assay of histone acetyltransferase. *Anal Biochem* 69 (1975) 491-6.
- Hung, H.L., Lau, J., Kim, A.Y., Weiss, M.J. and Blobel, G.A.: CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 3496-505.

- Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P. and Ge, H.: Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7 (1997) 689-92.
- Izawa, T., Foster, R. and Chua, N.H.: Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol* 230 (1993) 1131-44.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. and Tjian, R.: Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288 (2000) 1422-5.
- Jones, P., Qui, J. und Rickwood, D.: RNA Isolation and Analysis. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford (1994).
- Kaufman, P.D.: Nucleosome assembly: the CAF and the HAT. *Curr Opin Cell Biol* 8 (1996) 369-73.
- Kelleher, R.J.d., Flanagan, P.M. and Kornberg, R.D.: A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61 (1990) 1209-15.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J.: ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13 (1999) 2339-52.
- Kodrzycki, R., Boston, R.S. and Larkins, B.A.: The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* 1 (1989) 105-14.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y.: Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999) 148-51.
- Kouzarides, T.: Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* 19 (2000) 1176-9.
- Kouzarides, T. and Ziff, E.: Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* 340 (1989) 568-71.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D.: Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bio Essays* 20 (1998) 615-626.
- Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D.: Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383 (1996) 269-72.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E. and Allis, C.D.: Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* 12 (1998) 627-39.
- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R. and Goodman, R.H.: Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB [see comments]. *Nature* 370 (1994) 223-6.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- Lal, S.K. and Sachs, M.M.: Cloning and characterization of an anaerobically induced cDNA encoding glucose-6-phosphate isomerase from maize. *Plant Physiol* 108 (1995) 1295-6.

- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L.: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240 (1988) 1759-64.
- Laskey, R.A. and Mills, A.D.: Enhanced autoradiographic detection of <sup>32</sup>P and <sup>125</sup>I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett* 82 (1977) 314-6.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P.: A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72 (1993) 73-84.
- Lewin, B.: Commitment and activation at pol II promoters: a tail of protein- protein interactions. *Cell* 61 (1990) 1161-4.
- Lohmer, S.: Funktionelle Untersuchung des Opaque-2 Gens aus *Zea mays* L., Genetik. Universität zu Köln, Köln, 1992.
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Di Fonzo, N., Hartings, H., Salamini, F. and Thompson, R.D.: The maize regulatory locus Opaque-2 encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the b-32 gene. *Embo J* 10 (1991) 617-24.
- Luger, K. and Richmond, T.J.: The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8 (1998) 140-6.
- Ma, J. and Ptashne, M.: Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48 (1987) 847-53.
- MacRae, T.H.: Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244 (1997) 265-78.
- Maddaloni, M., Barbieri, L., lohmer, S., Motto, M., Salamini, F. and Thompson, R.D.: Characterisation of an endosperm-specific developmentally regulated protein synthesis inhibitor from maize seeds. *J. Genet. & Breed.* 45 (1991) 377-380.
- Maliga, P., Sz-Breznovits, A. and Marton, L.: Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nat New Biol* 244 (1973) 29-30.
- Marcus, G.A., Horiuchi, J., Silverman, N. and Guarente, L.: ADA5/SPT20 links the ADA and SPT genes, which are involved in yeast transcription. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 3197-205.
- Marcus, G.A., Silverman, N., Berger, S.L., Horiuchi, J. and Guarente, L.: Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *Embo J* 13 (1994) 4807-15.
- Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. and Kouzarides, T.: Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 19 (2000) 662-671.
- Mitchell, P.J. and Tjian, R.: Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245 (1989) 371-8.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C.D.: The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87 (1996) 1261-70.

- Moehs, C.P., McElwain, E.F. and Spiker, S.: Chromosomal proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11 (1988) 507-515.
- Motto, M., Maddaloni, M., Ponziani, G., Brembilla, M., Marotto, R., Di Fonzo, N., Soave, C., Thompson, R.D. and Salamini, F.: Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. *Oxford surveys of Plant molecular and cell biology* 6 (1988) 87-114.
- Naar, A.M., Lemon, B.D. and Tjian, R.: Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu Rev Biochem* 70 (2001) 475-501.
- Neuberg, M., Schuermann, M., Hunter, J.B. and Muller, R.: Two functionally different regions in Fos are required for the sequence- specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. *Nature* 338 (1989) 589-90.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y.: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87 (1996) 953-9.
- Olsen, O., Potter, R. and Kalla, R.: Histo-differentiation and molecular biology of developing cereal endosperm. *Seed Science res.* 2 (1992) 117-131.
- O'Neill, L.P. and Turner, B.M.: Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *Embo J* 14 (1995) 3946-57.
- Peterson, C.L. and Tamkun, J.W.: The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci* 20 (1995) 143-6.
- Pina, B., Berger, S., Marcus, G.A., Silverman, N., Agapite, J. and Guarente, L.: ADA3: a gene, identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of ADA2. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 5981-9.
- Pollard, K.J. and Peterson, C.L.: Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 6212-22.
- Pollard, K.J., Samuels, M.L., Crowley, K.A., Hansen, J.C. and Peterson, C.L.: Functional interaction between GCN5 and polyamines: a new role for core histone acetylation. *Embo J* 18 (1999) 5622-5633.
- Ptashne, M.: Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 322 (1986) 697-701.
- Ptashne, M. and Gann, A.A.: Activators and targets. *Nature* 346 (1990) 329-31.
- Pugh, B.F. and Tjian, R.: Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61 (1990) 1187-97.
- Reese, J.C., Apone, L., Walker, S.S., Griffin, L.A. and Green, M.R.: Yeast TAFIIS in a multisubunit complex required for activated transcription. *Nature* 371 (1994) 523-7.
- Riehl, M.: Isolierung von transkriptionellen Coaktivatoren aus *Zea mays* L., Genetik. Justus Liebig Universität Gießen, Gießen, 1999, pp. 89.

- Roberts, S.M. and Winston, F.: SPT20/ADA5 encodes a novel protein functionally related to the TATA-binding protein and important for transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 3206-13.
- Robles, J.a.D., M.: pGEM-T Vector Systems troubleshooting guide. Promega Notes 45 (1994) 19.
- Roeder, R.G.: The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci* 16 (1991) 402-8.
- Roth, S.Y. and Allis, C.D.: Histone acetylation and chromatin assembly: a single escort, multiple dances? *Cell* 87 (1996) 5-8.
- Roth, S.Y., Shimizu, M., Johnson, L., Grunstein, M. and Simpson, R.T.: Stable nucleosome positioning and complete repression by the yeast alpha 2 repressor are disrupted by amino-terminal mutations in histone H4. *Genes Dev* 6 (1992) 411-25.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J. and Allfrey, V.G.: Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190 (1975) 117-28.
- Saleh, A., Lang, V., Cook, R. and Brandl, C.J.: Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J Biol Chem* 272 (1997) 5571-8.
- Salinovich, O. and Montelaro, R.C.: Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156 (1986) 341-7.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 ed, 1989.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 5463-7.
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W. and Verma, I.M.: Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* 336 (1988) 692-5.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukerman, M.J. and Burr, B.: Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 46-50.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A. and Burr, B.: Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. *Science* 238 (1987) 960-3.
- Schmitz, D., Lohmer, S., Salamini, F. and Thompson, R.D.: The activation domain of the maize transcription factor Opaque-2 resides in a single acidic region. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 756-63.
- Schulz B, B.M., Dilkes BP, Feldmann KA: T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*: cloning by gene disruption, *Plant Molecular Biology Manual*, 1995.
- Sheen, J.: Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize pyruvate, orthophosphate dikinase genes. *Plant Cell* 3 (1991) 225-45.



- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. and Galbraith, D.W.: Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* 8 (1995) 777-84.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. and Huse, W.D.: Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 7583-600.
- Silverman, N., Agapite, J. and Guarente, L.: Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 11665-8.
- Simon, J.H. and Becker, W.M.: A polyethylene glycol/dextran procedure for the isolation of chromatin proteins (histones and nonhistones) from wheat germ. *Biochim Biophys Acta* 454 (1976) 154-71.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S.: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67 (1988) 31-40.
- Smith, E.R., Belote, J.M., Schiltz, R.L., Yang, X.J., Moore, P.A., Berger, S.L., Nakatani, Y. and Allis, C.D.: Cloning of *Drosophila* GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 2948-54.
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 (1975) 503-17.
- Southern, E.M. and Roizes, G.: The action of a restriction endonuclease on higher organism DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 38 (1974) 429-33.
- Spiker, S.: High-mobility group chromosomal proteins of wheat. *J Biol Chem* 259 (1984) 12007-13.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L.: Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2000) 435-59.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L.A., Winston, F., Workman, J.L. and Berger, S.L.: Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 86-98.
- Sterner, D.E., Wang, X., Bloom, M.H. and Berger, S.L.: The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex. *J Biol Chem* (2002).
- Stockinger, E.J., Mao, Y., Regier, M.K., Triezenberg, S.J. and Thomashow, M.F.: Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 1524-33.
- Syntichaki, P. and Thireos, G.: The Gcn5.Ada complex potentiates the histone acetyltransferase activity of Gcn5. *J Biol Chem* 273 (1998) 24414-9.

- Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C. and Kennison, J.A.: *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68 (1992) 561-72.
- Thiriet, C. and Albert, P.: Rapid and effective western blotting of histones from acid-urea-Triton and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels: two different approaches depending on the subsequent qualitative or quantitative analysis. *Electrophoresis* 16 (1995) 357-61.
- Tian, L. and Chen, Z.J.: Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 200-5.
- Tjian, R. and Maniatis, T.: Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77 (1994) 5-8.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. and Steinbiss, H.H.: A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 5890.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 4350-4.
- Tse, C., Georgieva, E.I., Ruiz-Garcia, A.B., Sendra, R. and Hansen, J.C.: Gen5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J Biol Chem* 273 (1998) 32388-92.
- Utley, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Cote, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S. and Workman, J.L.: Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394 (1998) 498-502.
- Varagona, M.J., Schmidt, R.J. and Raikhel, N.V.: Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell* 4 (1992) 1213-27.
- Vashee, S. and Kodadek, T.: The activation domain of GAL4 protein mediates cooperative promoter binding with general transcription factors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 10683-7.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B. and McKnight, S.L.: Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246 (1989) 911-6.
- Wade, P.A., Pruss, D. and Wolffe, A.P.: Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* 22 (1997) 128-32.
- Wang, L., Liu, L. and Berger, S.L.: Critical residues for histone acetylation by Gen5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev* 12 (1998) 640-53.

- Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244 (1969) 4406-12.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blazquez, M.A., Borevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E.J., Neff, M.M., Nguyen, J.T., Sato, S., Wang, Z.Y., Xia, Y., Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Yanofsky, M.F. and Chory, J.: Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122 (2000) 1003-13.
- Xu, W., Edmondson, D.G. and Roth, S.Y.: Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino- terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates [In Process Citation]. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 5659-69.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y.: A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382 (1996) 319-24.
- You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L.: CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 1454-8.
- Zawel, L., Lu, H., Cisek, L.J., Corden, J.L. and Reinberg, D.: The cycling of RNA polymerase II during transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58 (1993) 187-98.
- Zhang, W. and Bieker, J.J.: Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 9855-60.

## 8. Anhang

### 8.1 Aminosäuresequenz von ZmAda2-Pollen (Acc. Nr.: AJ430386)

```
1      SEQZMADAPO KEYWORDPRO TEINORIGIN MAKVQGESKK GTSLLPGELT
51     PKAESPFSPS RVKVEDALGE GLAGRSPSHI AVGANKKASN VGHIKDGSNV
101    SKVEDGHVDR SVGVKKPRYS ADEGPSLTEL SGYNAKRHEF DPEYDNDAEQ
151    ALAEMEFKET DSETDRELKL RVLRIYLSRL DERKRRKEFI LERNLLFPNP
201    LEKDLTNEDE EVYHRYKVFM RFLSKEEHEA LVRSVIEERK IRRRIQELQE
251    CRSAGCRTLA EAKIHIEQKR KKEYELNAQK AKESNHLIAN TKLVQKMNRP
301    MKIESDGNLD PKKGGVALDS PKTTGLTSVK QWDDWDIVGL PGAKLLSASE
351    KLLCCQNRLI PSHYLRMQEV LMQEIFKGSV LKKEDAHVLF KVDPTKVDSV
401    YDMVTKKLGN HVELPTV
```

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Francesco Salamini danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Abteilung.

Priv.-Doz. Dr. Richard D. Thompson danke ich für die Themenstellung und sehr gute Betreuung während der Arbeit. Sein reges Interesse, die ständige Ansprechbarkeit und seine Diskussionsbereitschaft haben mich stets ermutigt und voran gebracht.

Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Burkhard Schulz danke ich für die Bereitstellung der Arabidopsis T-DNA Population. Er stand mir mit Rat, Tat und Ideen jederzeit zur Seite.

Bei Dr. Heinz-Albert Becker, Dr. Timothy O'Connell, Dr. Antonio Serna Sanz und Riyaz Bhat möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und vor allem für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Christoph Rudolf danke ich für die konstruktiven Diskussionen und Ideen, insbesondere während der Wochenend-Heimfahrten oder beim Kölsch.

Sonja Vorwerk, Ursula Pfordt, Brigitte Piegeler, Dr. Li Yubin, Dr. Violeta Andjelkovic sowie den Kollegen im Labor und der Abteilung danke ich für die hilfreichen Diskussionen und das gute Arbeitsklima, welche das Arbeiten so angenehm gemacht haben.

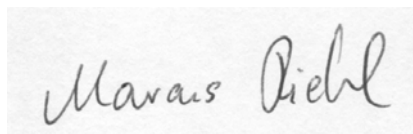
Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zum Schluß möchte ich mich bei Dir - Kerstin - bedanken, daß Du immer für mich da warst, auch wenn unsere gemeinsame Zeit sehr begrenzt war.

"Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv.-Doz. Dr. Richard D. Thompson betreut worden."

Köln, im Februar 2002

A rectangular box containing a handwritten signature in cursive script that reads "Marais Diehl".

**Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:**

**Heinz-Albert Becker, Marcus Riehl, Riyaz A. Bhat, Geraldina Santandrea, Stephen Slocombe, Richard D. Thompson**

Evidence for the biological functions of ZmGCN5, a plant type-A histone acetyltransferase  
Plant Cell - zur Veröffentlichung eingesendet -

**Riehl, M, Dresselhaus, T, McCormick, S, Thompson, RD**

Maize pollen expresses a truncated version of the transcriptional coactivator Ada2  
Maize Genetics Cooperation Newsletter Volume 76:09, 2002

**Sequenzen:**

ZmAda2-Pollen = Acc. Nr.: AJ430386

## Abstract

Transcription factors function together with transcriptional coactivators in transcriptional regulation (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990; Pugh and Tjian, 1990). The histone acetyltransferase GCN5 is localized in nearly all complexes together with the adaptor protein Ada2 (Berger et al., 1990; Kelleher et al., 1990; Pugh and Tjian, 1990). It could be shown in yeast that isolated GCN5 acetylates histones at specific N-terminal lysine residues and acetylates nucleosomes whilst in complexes together with other proteins (Utley et al., 1998; Grant et al., 1999).

After isolating GCN5 and Ada2 from maize as well as analysing the enzymatic activity of ZmGCN5 (Riehl, 1999) it could be shown that the lysin residues (5, 8, 12 and 16) of histone H4 are acetylated by ZmGCN5. In contrast to earlier results obtained in yeast (Tse et al., 1998) it could be shown that even under special salt conditions ZmGCN5 is not able to acetylate nucleosomes. These results are consistent with recent results in yeast (Balasubramanian et al., 2001). ZmGCN5 is part of multiprotein complexes, as are all other members of the GCN5 family (Review: (Naar et al., 2001)) and functions as type A nuclear histone acetyltransferase.

In contrast to all other tissues analysed, it could be shown that maize pollen expresses a smaller transcript as well as a smaller protein of ZmAda2. ZmAda2-Pollen has an N-terminal deletion that removes a zinc binding domain and a myb DNA binding domain. Because of this deletion ZmAda2-Pollen is not longer able to interact with ZmGCN5 *in vitro* or *in vivo*.

To show that the results obtained from maize are also valid in the model organism *Arabidopsis thaliana*, a GCN5-homologous histone acetyltransferase (AtHAT = AAB92257) and a transcriptional adaptor homologous sequence (AtAda2 = CAB78684) were identified in the databases. Both sequences were isolated by RT-PCR with sequence-specific primers, cloned and expressed as GST-fusion proteins.

Whilst completing this thesis, a further AtGCN5 sequence was published (Stockinger et al., 2001). In contrast to AtHAT, the *E.coli* expressed AtGCN5 protein shows a insertion of 18 amino acids in the HAT domain, and also possesses histone acetyl transferase activity *in vitro*.

Using “reverse genetics” a collection of T-DNA insertion lines curated by Burkhard Schulz (MPI für Züchtungsforschung, Köln) was screened and *AtGCN5* as well as *AtAda2a* insertions could be isolated. The putative T-DNA insertion mutant at the *GCN5* locus displayed a similar phenotyp to *Arabidopsis thaliana* plants containing an antisense construct for the histone deacetylase *AtHDI* (CASH plants) (Tian and Chen, 2001). Lines bearing a T-DNA insertion at *AtAda2a* showed reduced growth rate, increased rosette leaf number an a strong main shoot with a strong apical dominance.



# Lebenslauf

## Daten zur Person

Name: Marcus Riehl  
Anschrift: Kolibriweg 14  
50829 Köln  
Tel.: 0221/ 5002683  
Email: marcus.riehl@web.de  
Geburtsdatum / -ort: 08.09.71 in Schwalmstadt  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

09/78 – 06/82 Grundschule in Schwalmstadt-Rommershausen  
09/82 – 07/88 Gymnasium in Schwalmstadt-Treysa  
09/88 – 06/91 Berufliches Gymnasium in Alsfeld  
Schwerpunkt: Technik / Agrarwirtschaft  
Abschluß: Abitur

## Berufsausbildung

09/91 - 06/92 Ausbildung zum Chemisch-Technischen-Assistenten am Beruflichen  
Gymnasium in Alsfeld

## Wehrdienst:

07/92 – 09/93 Heeresmusikkorps 300 in Koblenz

## Studium:

10/93 – 01/99 Studium der "Biologie" an der Justus-Liebig-Universität Gießen mit  
den Schwerpunkten Genetik, Mikrobiologie, Botanik und  
Molekularbiologie

Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln  
in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Richard D. Thompson  
Thema: "Isolierung von transkriptionellen Coaktivatoren aus  
*Zea Mays* L."

02/99 - ca. 05/02 Promotion am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in  
der Arbeitsgruppe von PD Dr. Richard D. Thompson