

Zur Bedeutung der polyTC-Motive in den Promotoren
und 5'-UTR-Bereichen konstitutiv exprimierter
Pflanzengene

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

2004

vorgelegt von

Diplom-Biologe Manfred Jugold

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Manfred Jugold
aus Köln

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Zur Bedeutung der polyTC-Motive in den Promotoren
und 5'-UTR-Bereichen konstitutiv exprimierter Pflanzengene

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Rausch
Prof. Dr. Michael Wink

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung & Summary	1
2	Einleitung	3
2.1	Promotoren in transgenen Nutzpflanzen.....	3
2.2	Allgemeine Bedeutung von Polypyrimidin-Sequenzen.....	5
2.2.1	Hoogsteen DNA.....	5
2.2.2	Splicing.....	6
2.3	Der GAGA-Faktor.....	8
2.4	Entdeckung einer Polypyrimidin/Polypurin bindenden Protein-Familie.....	10
2.4.1	Das GAGA-Binding-Protein <i>Gbp</i>	10
2.4.2	Das Barley Brain Protein BBR.....	10
2.4.3	Anzahl und Verteilung von (GA/TC) ₈ -Polypurin/Polypyrimidin- Sequenzmotiven im Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
3	Zielsetzung der Dissertationsarbeit:	14
4	Material und Methoden	15
4.1	Pflanzenmaterial und –anzucht.....	15
4.1.1	<i>Beta vulgaris</i> Zellsuspensionskultur.....	15
4.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Zellsuspensionskultur.....	15
4.1.3	Anzucht von WT <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen.....	16
4.2	Bezugsquellen.....	16
4.3	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	17
4.3.1	Bakterienanzucht.....	17
4.3.2	Blau/Weiß Selektionierung.....	18
4.3.3	Aufschluss von Bakterien mit der „French Press“.....	18
4.4	DNA-Techniken.....	19
4.4.1	Plasmid-Isolation aus <i>Escherichia coli</i>	19
4.4.2	Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
4.4.3	Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR.....	19
4.4.4	Herstellung biotinylierter Sonden.....	20
4.4.5	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	20
4.4.6	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	20
4.4.7	Reinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR.....	21
4.4.8	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	22
4.4.9	Ethidiumbromid-Färbung.....	22
4.4.10	Methylenblau-Färbung.....	22
4.4.11	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	22
4.4.12	Klonierung von PCR-Amplifikaten mit dem pGEM-T [®] Cloning System.....	23
4.4.13	DNA-Sequenzierung.....	23
4.5	Modifizierung von Nukleinsäuren.....	23
4.5.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	23
4.5.2	Ligation von DNA.....	23
4.5.3	T ₄ -Polynukleotidkinase.....	23
4.5.4	Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP).....	24
4.5.5	S1-Nuklease.....	24
4.5.6	„Blunten“ von DNA.....	24
4.5.7	DNA-Einzelstrangdegradation mit der „Mung Bean“ Nuklease.....	25
4.5.8	DNA-Mutation mit dem Quick Change Kit.....	25
4.5.9	Fällung von DNA.....	25
4.6	Ballistische Transformation.....	25
4.6.1	Aufbau und Funktionsweise der Partikel-Kanone.....	26
4.6.2	Präparation der Mikrocarrier.....	26

4.6.3	Beladen der Mikrocarrier	27
4.6.4	Sonifikation der Mikrocarrier und Beladung der Makrocarrier	27
4.6.5	Transformation mit der Partikel-Kanone	27
4.6.6	Ballistische Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	28
4.6.7	Transfer von Zellsuspensionskulturen auf Agar-Platten	28
4.6.8	Inkubation nach Transformation	29
4.6.9	Herstellung der Proteinextrakte	29
4.6.10	Bestimmung der Luciferase-Aktivität	30
4.6.11	β -Glucuronidase-Aktivitätsbestimmung	30
4.6.12	Messung der Blindwerte	31
4.6.13	Auswertung der Messergebnisse und RLU-Abgleich	32
4.7	Mikroskopischer GFP / RFP Nachweis transient transformierter Pflanzen	33
4.8	Gel-Retentionsanalyse oder EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	33
4.8.1	Funktionsweise	33
4.8.2	Ansetzen einer EMSA-Reaktion	34
4.8.3	Kapillartransfer von biotinylierten DNA-Sonden nach EMSA	35
4.8.4	Detektion biotinylierter DNA-Sonden	35
4.9	Überexpression rekombinanter Proteine	36
4.10	Proteinaufreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie	36
4.11	Denaturierende Polyacrylamid (PAA) Gelelektrophorese	36
4.12	Bakterienstämme	37
4.13	DNA-Vektoren	37
4.14	Herstellung biotinmarkierter Sonden zur Gelretardationsanalyse (EMSA)	42
4.15	RNAi-silencing	43
4.16	Verwendete Computerprogramme	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 im Promotor und der 5'UTR des BVA c1 Gens	44
5.2	Die Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors sind entscheidend für dessen Aktivität	47
5.3	Einzelbasenmutation der Polypyrimidin-Box1 des pBVA c1-Promotors kann zu starken Aktivitätsverlusten führen	48
5.3.1	Die Mutation des 2. Thymins in der Polypyrimidin-Box1 des c1-Promotors führt zu einem Aktivitätsverlust von über 60%	49
5.3.2	S1-Nuklease Behandlung der c1- und PPase1-Promotoren zur Untersuchung auf Hoogsteen-DNA Motive	49
5.4	Dam-Methylierung des c1-Promotors hat keinen Einfluss auf die Promotoraktivität	50
5.5	Versuche zur in vivo Competition der c1-Promotoraktivität	52
5.6	Cobombardment von pBVA c1 mit dem GAGA-Transkriptionsfaktor bewirkt keine spezifische Erhöhung der Luciferase-Aktivität	55
5.7	AtBR-Transkriptionsfaktoren können im Cobombardment mit dem c1-Promotor dessen Aktivität erhöhen	55
5.8	Das Fusionsprotein GFP:AtBR1 ist kernlokalisiert	57
5.8.1	Cobombardment pFF19-GFP-AtBR1 mit pWEN143	57
5.9	Überexpression und Aufreinigung von Trx-AtBR Fusionsproteinen	59
5.10	Das rekombinante Trx-AtBR4 Fusionsprotein bindet spezifisch an die Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors	60
5.10.1	Rekombinantes Trx-AtBR4 Fusionsprotein bindet an biotinmarkierte c1-Promotor-Sequenzen	61

5.10.2	Spezifische Kompetition der Bindung von Trx-AtBR4 an die Polypyrimidin-Motive der c1-EMSA-Box1-Sonde durch doppelsträngige Polypyrimidin-Box1 und -Box2 Oligonukleotide	62
5.10.3	Trx-AtBR4 bindet spezifisch an die Polypyrimidin-Box1 des BVA c1-Promotors	63
5.10.4	Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet präferentiell Polypyrimidin-Box1	63
5.10.5	Trx-AtBR1 bindet an c1-Promotor-Teilsequenz.....	64
5.11	Viral induziertes Gen-Silencing von AtBR1-3 in <i>Arabidopsis thaliana</i> auf „whole plant“-Ebene	65
5.11.1	Aufbau und Replikation des SIPV-Konstrukts	66
5.11.2	Silencing von AtBR1-3 durch Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit SIPV	66
5.11.3	Indirekter Nachweis eines systemischen RNA Silencings durch GFP	69
5.11.4	Aktivitätstest des BVA c1- und des BVP1-Promotors in gegen AtBR1, 2 und 3 gesilenceten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	71
6	Diskussion	72
6.1	Die Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors sind für dessen Aktivität essentiell ...	72
6.2	Die Mutationen der Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors sind unerheblich für eine sequenzinduzierte Beugung der DNA	74
6.3	Die Mutation einzelner Basen innerhalb der Polypyrimidin-Box1 resultiert in starke Verluste der Promotoraktivität	75
6.4	Die Aktivität des c1-Promotors ist unabhängig von der dam-Methylierung der eingesetzten Plasmid-DNA im Particle Bombardment.....	76
6.5	Die Insertion eines Polypyrimidin-Box1 Oligonukleotids in den schwachen At-C/VIF-1 Promotor führt zu dessen Aktivitätsverlust.	77
6.6	Die c1-Proromotoraktivität kann im Cobombardment mit 100fachen Überschuss von ds c1-Promotorfragmenten nicht kompetiert werden.....	78
6.7	Der GAGA-Transkriptionsfaktor aus <i>D. melanogaster</i> bewirkt im Cobombardment auf <i>Beta</i> -Suspensionskultur keine spezifische Aktivitätserhöhung des BVA c1-Promotors	80
6.8	Die Beschreibung einer Proteinfamilie Polypyrimidin-bindender Transkriptionsfaktoren	81
6.9	Spezifische Interaktion von AtBR-Proteinen mit den Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors	82
6.9.1	Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet an BVA c1-Promotor-Sequenzen	82
6.9.2	Hitzebehandeltes Trx-AtBR4 Protein besitzt keine Bindeaffinität zur c1-Sonde	83
6.9.3	Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet in vitro spezifisch die Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors	83
6.9.4	Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet präferentiell Polypyrimidin-Box1	83
6.10	In vivo Evidenzen für eine funktionale Beteiligung der AtBR-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Promotoraktivität des c1-Promotors	84
6.10.1	Transaktivierung des BVA c1-Promotors durch AtBR1.....	85
6.11	RNA Silencing	86
6.11.1	RNA Silencing von AtBR1, 2 und 3 reduziert die c1- Promotoraktivität in vivo	88
6.12	Ausblick:	89
7	Abkürzungen	91
8	Literaturverzeichnis.....	94
9	Danksagung.....	101
10	Anhang	102

1 Zusammenfassung

Das Gen der V-ATPase UE c1 aus der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) besitzt im Promotor und der 5'UTR je eine Polypyrimidinbox. Solche Motive aus sich häufenden TC-Alternierungen sind in pflanzlichen Promotoren und 5'UTRs ein häufig auftretendes Motiv mit bislang weitgehend ungeklärter Funktion.

Am Beispiel des Promotors Y11037 des konstitutiv exprimierten V-ATPase c1 Gens wurden in dieser Arbeit gezeigt, dass die enthaltenen Polypyrimidin-Boxen ein funktional notwendiger Bestandteil des c1-Promotors sind. Die c1-Promotoraktivität fiel nach der Mutation der Polypyrimidin-Box1 (Box1 5'seitig der TATA-Box) um 95%, beziehungsweise nach Mutation der Polypyrimidin-Box2 (Box2 Position +44 – +63 in 5'UTR) um 37%. Weitere Versuche zeigten jedoch, dass allein die Existenz einer Polypyrimidin-Box nahe der TATA-Box nicht hinreichend ist um eine verstärkte Promotoraktivität zu gewährleisten.

Es konnten aus *Arabidopsis thaliana* homologe Proteine des Polypyrimidin-bindenden Transkriptionsfaktors BBR aus der Gerste (*Hordeum vulgare*, Santi 2003) und Gbp aus der Sojabohne (*Glycine max*, Sangwan 2002) kloniert und aufgereinigt werden. Diese AtBR-Proteine mit einer stark homologen, jedoch bislang unbekanntenen DNA-, beziehungsweise Polypyrimidin-bindenden Domäne (Sangwan 2002) sind Vertreter einer gemeinsamen Familie von Transkriptionsaktivatoren.

Für die AtBR-Transkriptionsfaktoren wurden zunächst die Voraussetzungen für eine spezifische Interaktion mit den Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors belegt.

Eine subzelluläre Lokalisation eines N-terminalen GFP-AtBR1-Fusionsproteins ergab eine spezifische Akkumulation im Zellkern transient transformierter *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur.

Zusätzlich konnte durch ein Cobombardment eines c1-Promotor-LUC-Konstrukts mit AtBR-Expressionsvektoren eine Aktivitätserhöhung des c1-Promotors in vivo festgestellt werden.

Mittels Gelretentionsanalyse (EMSA) wurden in vitro für zwei AtBR-Transkriptionsfaktoren (AtBR1 und AtBR4) eine spezifische Interaktion mit den Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors nachgewiesen, wobei die Polypyrimidin-Box1 eine mindestens zweifach größere Affinität zu den AtBR-Transkriptionsfaktoren besitzt als die Polypyrimidin-Box2. Dieser Befund legt im Zusammenhang mit dem drastischen Aktivitätsverlust nach der Inaktivierung der Polypyrimidin-Box1 eine, in Abhängigkeit von der Bindeaffinität der AtBR-Transkriptionsfaktoren mit den Polypyrimidin-Motiven vorliegende Promotoraktivität (Transkriptionseffektivität) nahe.

Weiterhin ergab ein in *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführtes Gen-Silencing für die AtBR-Transkriptionsfaktoren AtBR1, AtBR2 und AtBR3 erste Evidenzen für eine AtBR beeinflusste c1-Promotoraktivität.

Alle Ergebnisse implizieren, dass die Frage nach der funktionalen Bedeutung von Polypyrimidin-Boxen und deren Rolle als Bindemotiv in den Promotoren und 5'UTRs sich durch eine Interaktion von Vertretern der Proteinfamilie der AtBR-Transkriptionsfaktoren erklärt.

Der wirtschaftliche Einsatz des c1-Promotors oder allgemein von Promotorsequenzen mit Polypyrimidin-Motiven zur Expression von Nutzgenen in transgenen Pflanzen muss die Zusammenhänge durch die Wechselwirkung von AtBR-Transkriptionsfaktoren für den gezielten Einsatz berücksichtigen.

Weitere Grundlagenforschung, insbesondere die Suche nach mit AtBR interagierenden Proteinen und die Bedeutung der einzelnen AtBR-Isoformen, sind für ein tieferes Verständnis unerlässlich.

Functional characterization of polyTC-motives in the promoters and 5'UTRs of constitutively expressed plant genes

Summary

The gene encoding the V-ATPase subunit c1 from sugar beet (*Beta vulgaris*) includes polypyrimidine-boxes in the promoter region (Box 1) and in the 5'UTR (Box 2), respectively. Such sequence motives are frequently found in plant promoters and 5'UTRs, but their function(s) remain so far largely unknown.

For the promoter of the constitutively expressed V-ATPase c1 gene (Y11037) it was shown in this work that the polypyrimidine-boxes 1 & 2 are functionally important components of the c1 gene. For the c1 promoter, a 95% decrease of activity was observed when the polypyrimidine-box 1 was mutated (Box 1: immediately 5'upstream of the TATA-box), whereas mutation of box 2, located in the 5'UTR caused a 37% decrease of reporter gene activity (Box 2 position +44 - +63 in 5'UTR). However, further experiments demonstrated that introducing a box 1-sequence motif into an unrelated promoter close to the TATA box did not per se increase promoter activity.

Arabidopsis thaliana homologs of the polypyrimidine binding transcription factors BBR from barley (*Hordeum vulgare*; Santi 2003) and Gbp from soybean (*Glycine max*; Sangwan 2002) were cloned and expressed as recombinant proteins in *E.coli*. These so called AtBR proteins contain a highly conserved, previously unknown polypyrimidine tract binding domain (Sangwan 2002) and are representatives of a larger family of transcription activators.

First, the conditions for AtBR transcription factor binding to the polypyrimidine-boxes of the c1 promoter were analysed. The subcellular compartmentation of an N-terminal GFP::AtBR1-fusion protein as analyzed by transient transformation of *Beta vulgaris* suspension-cultured cells indicated exclusive nuclear localization. Second, cobombardment of a c1-promotor::luciferase construct with an AtBR1 expression vector resulted in an increase of c1 promoter activity *in vivo*. By means of electrophoretic mobility shift assay (EMSA), a specific interaction of two AtBR-transcription factors (AtBR1 and AtBR4) with the polypyrimidine-boxes of the c1 promoter was demonstrated. Here, the AtBR-transcription factors showed a preferential binding to polypyrimidine-box 1 as compared with polypyrimidine-box 2. These observations suggest that the promoter activity of the c1 gene is most likely under the control of AtBR transcription factors via binding to the polypyrimidine-motives. Finally, RNAi-mediated silencing of AtBR expression (AtBR1, AtBR2 and AtBR3) in *Arabidopsis* provided preliminary evidence for an AtBR affect on c1 promoter activity *in planta*.

In summary, the results presented here strongly support the hypothesis that binding of AtBR proteins to polypyrimidine boxes in the promoter regions and/or 5'UTR of plant genes may affect gene expression. Any biotechnological application of the c1 promoter, or, more generally, of promoter sequences with polypyrimidine-motives to express genes of interest in transgenic crop plants must consider the effects of AtBR-like transcription factors on promoter activity. Further basic research, in particular the search for proteins interacting with AtBR and elucidating the roles of individual AtBR isoforms, will be required to properly address the biological significance of this novel transcription factor family.

2 Einleitung

2.1 Promotoren in transgenen Nutzpflanzen

Gentechnisch veränderte Nutzpflanzen erlangen immer größere wirtschaftliche Bedeutung. Trotz ethischer Bedenken großer Teile der Bevölkerung und kontroverser Meinungen von Naturschützern und Industrie wird diese Entwicklung schon aus ökonomischen Gründen und im Rahmen der Globalisierung der Weltwirtschaft langfristig nicht aufzuhalten sein.

Im Jahre 2002 waren weltweit etwa 90 transgene Pflanzensorten zugelassen, die auf einer Gesamtfläche von über 58 Millionen Hektar angebaut wurden. Dabei handelte es sich insbesondere um herbizid- und insektenresistente Pflanzensorten. Der Umsatz mit transgenen Pflanzen und biotechnologischen Pflanzenschutzmitteln betrug im Jahr 2002 ca. 4,25 Milliarden Euro. Innerhalb des Jahres 2003 stieg die weltweite Anbaufläche um weitere 16% auf 67,7 Millionen Hektar (James 2004).

Gleichzeitig steigt das Interesse der Industrie, die Verbraucherakzeptanz gentechnisch veränderten Produkten gegenüber zu erhöhen und Verantwortungsbewusstsein für diese neue Technik der Pflanzenzüchtung zu demonstrieren, wobei trotz vieler Kompromisse seitens der Wirtschaft neue Produkte zum Teil aus einer Pauschalisierung und Unaufgeklärtheit der Bevölkerung heraus keinen Anklang finden. (Hoban 1999, Transgen 2002, Schwägerl 2002). Im Rahmen dieser Debatte wird angestrebt transgene Pflanzen zu erzeugen, die möglichst keine unnötigen oder bedenklichen DNA-Sequenzen wie z.B. Gene für Antibiotika-Resistenzen, Reste von Vektoren oder andere letztendlich nicht unbedingt erforderlichen Fremdgenen oder Genfragmenten beinhalten. Die Hauptargumente, die zu dieser Entwicklung führen, sind der Nachweis der Ausbreitung von Transgenen aus Kulturpflanzen in die freie Natur durch horizontalen Gentransfer und Auskreuzung und das verstärkte Auftreten von Allergien beim Menschen (Ellstrand 2003, Dunwell et al., 1998, 2000).

Zukünftig sollen daher u.a. in der Gentechnik virale Promotoren wie der CaMV 35S Promotor durch alternative starke pflanzliche Promotoren ersetzt werden. Um solche Sequenzen effektiv nutzen und gezielt einsetzen zu können, rückt eine detaillierte Aufklärung der Funktionsweisen dieser Promotoren auf molekularer Ebene in das wirtschaftliche Interesse und gewinnt dadurch auch zunehmend für den Endverbraucher an Bedeutung.

Zur Expression von Transgenen in Pflanzen wird daher ein großer Bedarf an starken und konstitutiven Promotoren bestehen, die unter typischen Stressbedingungen wie Salzstress, Trockenstress oder Kälte in ihren Aktivitäten nicht einbrechen und die Expression der gewünschten Transgene gewährleisten.

Zwei vielversprechende Kandidaten für solcherart gesuchte Promotoren sind die der vakuolären ATPase Untereinheit c1 (BVA c1, Y11037) und der vakuolären PPase1 (BVP1, L32792) aus der halotoleranten Zuckerrübe (*Beta vulgaris*). Pflanzenzellen verbrauchen bis zu 50% ihrer Gesamtenergiesourcen zur Aufrechterhaltung des Protonengradienten an internen Membransystemen (Nelson 1994) (siehe Exkurs1). Gerade in Zucker akkumulierenden Pflanzen wie die gemeine Zuckerrübe werden große Mengen stark osmolytisch wirksamer Saccharose gegen das Konzentrationsgefälle in die Zentralvakuole transportiert und dort gespeichert. Zur Bewältigung solcher Transportleistung über die tonoplastidäre Membran ist ein erheblicher Energieaufwand und eine entsprechend starke Expression der V-ATPase und V-PPase erforderlich, da der Saccharose-Transport wahrscheinlich durch Protonen-Antiport-Prozesse energetisiert wird (Chiou et al., 1996). Versuche mit transient transformierten *Beta vulgaris* Zellsuspensionskulturen belegen für beide Promotoren eine mindestens doppelt so starke Promotoraktivität wie der CaMV 35S-Promotor (Holtorf et al., 2002, Jugold 2000).

Somit sind diese Promotoren aus der Zuckerrübe besonders interessant, um die dazugehörigen molekularen Grundlagen der Wechselwirkung verschiedener Promotorelemente mit interagierenden Transkriptionsfaktoren aufzuklären, um damit wirtschaftlich nutzbare Promotoren zur effektiven Expression von Transgenen in Pflanzen zu entwickeln. Auffällig sind die in den Promotoren und 5'-UTR-Bereichen der V-ATPase Untereinheit c1 und der V-PPase1 vorkommenden Polypyrimidin-Sequenzen. Solche Motive von 18 – 50 Basenpaaren Länge, die ausschließlich aus den Basen Thymin und Cytosin aufgebaut sind, kommen häufig in eukaryotischen Genomen vor, wo sie in verschiedenen Funktionen, u.a. Silencing, Splicing und Transkriptionsaktivierung involviert sein können (s.u.). Die Funktion dieser Sequenzmotive in Promotoren ist jedoch bisher für V-ATPase- und PPase-Promotoren nicht untersucht worden. Jedoch gibt es massive Hinweise auf sequenzspezifische Interaktionen bestimmter Transkriptionsfaktoren mit in Promotoren lokalisierten Polypyrimidin-Sequenzen (Xu et al., 1999, Zahedi et al., 1999).

2.2 Allgemeine Bedeutung von Polypyrimidin-Sequenzen

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* findet man mehrere hundert Polypyrimidin-Boxen die sowohl in den Promotoren und den 5'UTRs, als auch in den transkribierten Bereichen vorkommen (Santi et al., 2003). Dabei sind die Rollen von Polypyrimidin-Motiven bei Mensch und Tier näher untersucht worden (Black 2003, Lu et al., 1993). Polypyrimidin-Sequenzen fallen nicht nur als gewöhnliche Bindemotive für eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren und RNA-Bindeproteinen auf, sondern es können auch unterschiedliche Arten von DNA-Strukturen gebildet werden. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit zur Ausbildung einer intramolekularen Faltung der DNA zu einer Hoogsteen-DNA (Htun 1988).

2.2.1 Hoogsteen DNA

Die DNA ist ein fädiges bewegliches Molekül, welches in Abhängigkeit der Sequenz, des pH-Wertes und des Grades der Verdrillung unterschiedliche Konformationen ausbilden kann. Unter physiologischen Bedingungen liegt die DNA normalerweise in der B-Form vor und ist mit Histon-Komplexen assoziiert. Das Zusammenspiel mehrerer Faktoren kann jedoch u.a. zur Ausprägung einer Triplex-Helix (Hoogsteen-DNA, H-DNA) von Polypyrimidin-Motiven führen. Für *negative supercoiled* Plasmid-DNA mit H-DNA-Sequenzen konnte eine Relaxierung nachgewiesen werden, die durch diese intramolekulare Konformationsänderung erklärt werden kann. Es wird vermutet, dass erst durch diese ungewöhnliche

Exkurs 1: Die Vakuole

Die Vakuole ist ein für die meisten pflanzlichen Zellen essentielles Organell. Sie wird von einer einfachen Membran, dem Tonoplast begrenzt und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Sie dient u.a. der Bildung des Zellurgors, der Aufrechterhaltung des cytoplasmatischen pH-Wertes, der reversiblen Lagerung von organischen und anorganischen Stoffen sowie der Entsorgung von Schadstoffen und Ionen aus dem Cytoplasma.

Um diese vielfältigen Stoffwechselfvorgänge zu ermöglichen muss der Tonoplast energetisiert werden. Dies geschieht durch die Bildung eines elektrochemischen Gradienten (engl. „proton motif force“) an der Membran durch Protonentranslokation aus dem Cytoplasma in die Vakuole, was zu einer Ansäuerung des Zellkompartiments führt. Für den Protonentransport zeichnen zwei sehr verschiedene Protonen-Pumpen an der Tonoplasten-Membran verantwortlich: Die V-ATPase und die V-Pyrophosphatase.

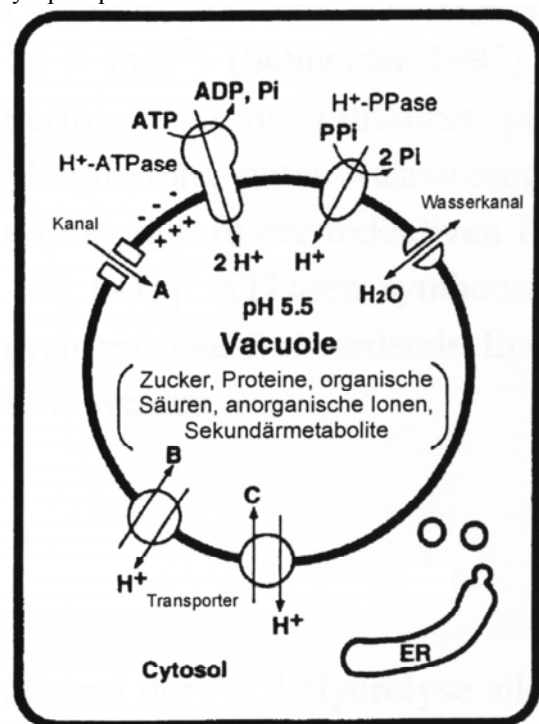


Abb.1: Akkumulation von Ionen und Metaboliten in der pflanzlichen Vakuole als sekundäre Transportvorgänge angetrieben durch den elektrochemischen Protonengradienten der von V-ATPase und V-PPase aufgebaut wird. (verändert nach Maeshima et al., 1996)

Faltung der DNA bestimmte Transkriptionsfaktoren räumlich zueinander finden. Weiterhin könnte die Knickbildung dazu dienen, eine stabile Einbindung eines Promotors in das

Chromatingerüst zu unterbinden, wodurch die DNA transkribierbar bleibt (Htun 1988).

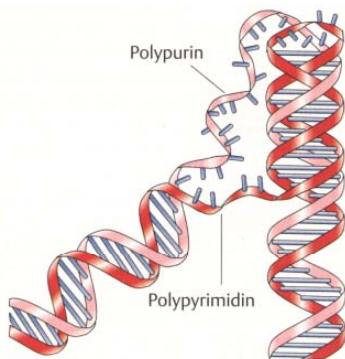


Abb. 1.2.1a: Modell einer intramolekularen Triplex-Helix.

Teilweise Trennung eines Polypurin-Stranges von einem Polypyrimidin-Strang: Der Polypyrimidin-Strang faltet sich zurück und lagert sich in die große Rinne der DNA-Helix, wo Hoogsteen-Paarungen mit den Purin-Resten entstehen. Niedrige pH-Werte begünstigen diese Umlagerung, da protoniertes Cytosin eine Hoogsteen-Basenpaarung eingehen kann, wodurch freie einzelsträngige Sequenzabschnitte entstehen. (Wells et al., 1988, Knippers 1997). Diese ungepaarten Basen der Hoogsteen-DNA sind das Substrat der S1-Nuklease und bilden den typischen S1-Nuklease sensiblen Bereich. (Htun 1988).

2.2.2 Splicing

Polypyrimidin-Sequenzen spielen auch bei dem für Eukaryoten typischen Splicing eine Rolle. Das PTB-Protein (Polypyrimidine Tract Binding Protein) ist ein in Säugern identifiziertes Protein, welches spezifisch an Polypyrimidin-Motive in den Introns

Exkurs 2: Die V-ATPase

Aufbau und Funktion:

Die V-ATPase spielt eine fundamental wichtige Rolle im eukaryotischen Stoffwechsel und ist daher sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene ein hochgradig regulierter Enzymkomplex. Die V-ATPase besteht aus über zehn verschiedenen Untereinheiten (UE) (Sze et al., 1995), die in zwei Komplexe eingeteilt werden; den cytoplasmatischen V_1 -Komplex der die Spaltung von ATP in ADP + P_i katalysiert und den membrangebundenen V_0 -Komplex welcher mit seinen c-Untereinheiten eine Pore formt durch die Protonen aus den Cytoplasma in Zellkompartimente wie die Zentralvakuole, das endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat transportiert werden (Dietz et al., 2001).

Regulation des V-ATPase Enzymkomplexes :

Wichtige Regulationen der V-ATPase-Aktivität erfolgen über die Dissoziation des V_1 -Komplexes vom in der Membran verbleibenden V_0 -Komplex (Forgac 1998), welche durch chaotrope Substanzen oder Kältebehandlung hervorgerufen werden kann (Yoshida 1991; Ward 1992 b; Sze 1992; Kane et al. 1992). In Hefezellen konnte eine reversible Separierung der beiden Komplexe in Abhängigkeit von der angebotenen Glucosekonzentration beobachtet werden (Kane 1995). Cl^- -Ionen wirken auf die V-ATPase stimulierend (Mettler et al. 1982; Mandala & Taiz, 1985), während NO_3^- - und SO_4^{2-} - Ionen die Pumpleistung hemmen. Auch ADP bewirkt als V-ATPase-Endprodukt eine kompetitive Hemmung des Enzymkomplexes (Rausch et al. 1985). Die Kopplungsrate aus ATP-Hydrolyse und Pumpleistung ist nicht konstant sondern variiert in Abhängigkeit des zu überwindenden Protonengradienten beim Pumpvorgang und kann von 1,75 bis 3,28 $H^+/1ATP$ betragen (Davis et al. 1994).

Weitere mögliche Regulationen der V-ATPase werden über die Bildung von Disulfidbrücken, differentielles Targeting bestimmter Untereinheiten (Forgac 1998) und nicht näher bekannte Interaktionen mit regulatorischen Proteinen vermutet (Zhang et al. 1992).

Kirsch et al. (1996) zeigte in *B. vulgaris* eine entwicklungs- und salzstressabhängige selektive Regulation einzelner V-ATPase-Untereinheiten. In *B. vulgaris*-Zellsuspensionskultur führte Salzstress zu einem Anstieg der Promotor-Aktivität der Untereinheit c1 der V-ATPase (Lehr et al. 1999). Ratajczak (1994) konnte in *M. crystallinum* einen reversible Induktion der V-ATPase-Konzentration durch Salzstress beobachten. Für drei Isoformen der Untereinheit (UE) c1 (AVA-P1, AVA-P2 und AVA-P3) aus *Arabidopsis thaliana* und *Beta vulgaris* konnte eine "Housekeeping"-Funktion durch konstitutive Expression nachgewiesen werden

von prä-mRNA bindet und direkt in das Assembly des Spliceosoms involviert ist. Die Polypyrimidin-Bindestelle liegt dabei vor dem 3'-Ende des entsprechenden Introns und wird somit aus der reifenden mRNA herausgespliced.

Mutationen der Polypyrimidin-Motive, die zu einer Verringerung der Affinität zu PTB führen, bewirken gleichzeitig eine verringerte Effektivität des *Assemblies* der zum *Splicing* notwendigen enzymatischen Komponenten (Gil et al., 1991, Smith et al., 1989). Für das Protein PTB konnten außerdem weitere Funktionen wie die Beteiligung an der Polyadenylierung der mRNA nachgewiesen werden. Durch seine Bindung an Polypyrimidin-Sequenzen von Boten-RNA (mRNA) spielt es auch eine Rolle beim Transport der mRNA aus dem Kern in das Cytoplasma und beeinflusst dort durch Interaktionen mit der ribosomalen mRNA-Eingangssequenz die Translation (Kamath et al., 2001).

Weitere RNA-Bindeproteine im Tierreich sind der PTB-associated Splicing-Faktor (PSF) (Patton et al., 1993), das Intron-Bindeprotein (Tazi et al., 1986), hnRNP C (Swanson et al., 1988), U2 snRNP auxiliary Faktor (U2AF) (Zamore et al., 1989) und der Splicing Regulator sex-lethal (Sosnowski et al., 1989) aus *Drosophila melanogaster*.

Für alle diese RNA-Bindeproteine wurden verschiedene Polypyrimidin-Bindesequenzen ermittelt, wobei die Anzahl der vorhandenen Uridine und die Gesamtlänge der entsprechenden Polypyrimidin-Box maßgeblich zur Affinität beitragen.

Introns aus tierischen Organismen werden in transgenen Pflanzen nicht gespliced (Lopato et al., 1996). Pflanzliche Introns besitzen zwar ebenfalls stark konservierte GU und AG Sequenzen welche die Introns flankieren, jedoch konnten bisher weder

(Sze et al. 1999, Lehr et al. 1999). Untersuchungen der Promotoraktivitäten in Deletionspromotor-konstrukten der V-ATPase-Untereinheiten A und c (Viereck 1999) lassen auf das Vorhandensein mehrerer Transfaktor-Bindestellen schließen, da die Promotoraktivitäten mit sinkender Promotorgröße stufenweise abfallen.

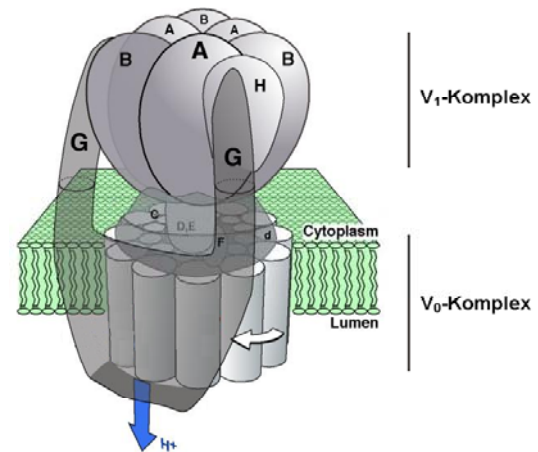


Abb.2: Modell der V-ATPase
(Verändert nach Grabe et al., 2000)

Exkurs 3: Die V-PPase

Aufbau und Funktion:

Die vakuoläre Pyrophosphatase (V-PPase od. V-PPase) kommt in allen höheren Pflanzen, aber auch in Moosen, Farnen, Algen und photosynthetisch aktiven Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky 1984; Nakanishi 1998) eine ähnlich wichtige Funktion wie der V-ATPase zu. Diese viel einfacher gebaute Protonenpumpe, deren funktionelle Einheit sich aus Homodimeren zusammensetzt, ist ebenfalls auch an der Tonoplastenmembran lokalisiert und in der Lage, einen der V-ATPase vergleichbaren Protonengradienten aufzubauen (Yang et al., 1999). Die V-PPase ist ebenfalls stressinduzierbar. Kältestress und Anaerobiose z.B. kann Auslöser für eine verstärkte Expression sein (Gaxiola et al., 1998, Darley et al., 1995 Carystinos). Salzstress dagegen führt in in *M. crystallinum* nicht zu einer erhöhten V-PPase-Produktion (Bremberger et al., 1988). Das Substrat der V-PPase bildet anorganisches Pyrophosphat in einem Komplex mit Mg^{2+} , in dem es in der Stöchiometrie von zwei Magnesium-Ionen zu einem Pyrophosphat (PP_i) vorliegt (Baykov et al. 1993). Pyrophosphat entsteht als Nebenprodukt bei vielen verschiedenen essentiellen biosynthetischen Prozessen, wie z.B. der Transkription von Nucleinsäuren. Die ermittelte Kopplungsrate der Pyrophosphat-Hydrolyse zur Anzahl über die Tonoplastenmembran translozierten Protonen liegt bei 1 (Zancani 1998; Schmidt 1993).

Konsensussequenzen für die Polypyrimidin-Boxen, noch für die Verzweigungsstelle (engl. *branch point*) ermittelt werden. Pflanzen scheinen durch das Zusammenspiel einer größeren Anzahl von Faktoren eine komplexere und somit vielfältiger regulierbare Form des Splicings entwickelt zu haben (Goodall et al., 1989).

Die Aminosäuresequenzen erlauben den Schluss, dass die Pyrophosphatase dreizehn Transmembranhelices besitzt (Rea et al. 1992).

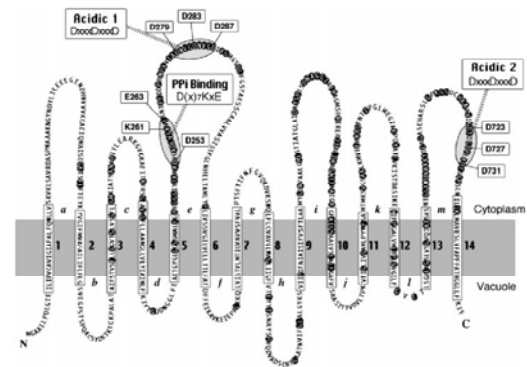


Abb.3: Transmembrane Darstellung der V-PPase

2.3 Der GAGA-Faktor

In *Drosophila melanogaster* wurde ein Transkriptionsaktivator beschrieben, welcher spezifisch an die Polypurin/Polypyrimidin-Sequenz GAGAGAG bindet (Biggin und Tijan 1988, Soeller et al., 1993). Der danach benannte GAGA-Faktor wird durch das Gen Trithorax-like (Trl) codiert (Accession number L22205) und kann sowohl einzelsträngige als auch Hoogsteen-DNA (H-DNA) binden (Azorin et al., 1998). Das GAGA-Protein gehört zur Familie der Trithoraxgene und besitzt zwei charakteristische Domänen:

Ein Zinkfinger-Motiv (BTB-Domäne), welches die DNA-bindende Eigenschaften besitzt, und eine N-terminale POZ-Domäne. Über diese POZ-Domäne können sich mehrere GAGA-Faktoren zu einem Homomultimer verbinden. Durch die Bindung des GAGA-Faktors werden die Histone von der DNA verdrängt. Die gleichzeitige Bindung der GAGA-Faktoren untereinander über die POZ-Domäne resultiert in einer lokalen Beugung des DNA-Strangs. Der entsprechende Sequenzbereich wird aus dem Chromatingerüst exponiert und damit für weitere Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II zugänglich (Verrijzer et al., 1999).

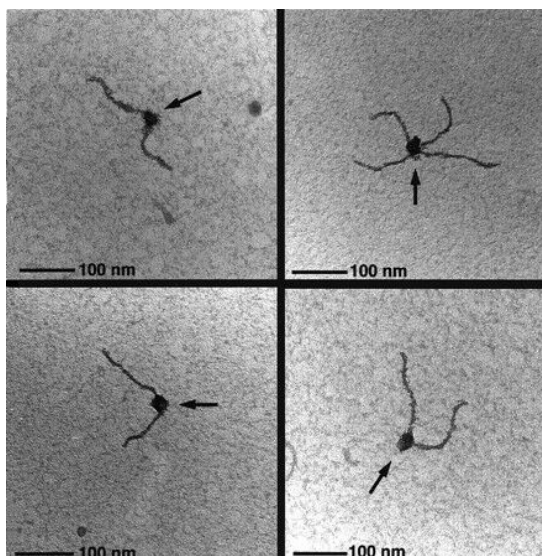


Abb. 1.3a: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Komplexes aus mehreren GAGA-Faktoren mit einem 1055bp langen Ubx-Promotorfragment. Die DNA besitzt vier Polypyrimidin-Motive. Diese GAGA-Bindemotive befinden sich innerhalb einer 163bp langen Sequenz verteilt die mittig in dem Konstrukt liegt. Die Proteinkomplexe sind mit Pfeilen markiert. In 70% der beobachteten GAGA-Ubx-Komplexe betrug die Beugung der DNA mehr als 100°. (Nach Verrijzer et al., 1999).

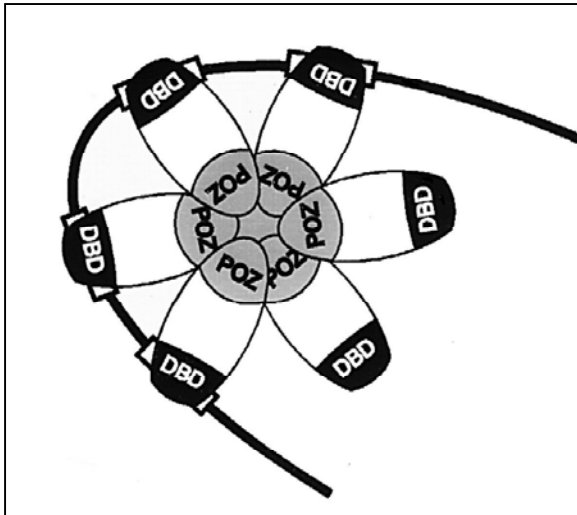


Abb 1.3b: Speklatives Modell der Bindung von GAGA-Multimeren an DNA. Die Boxen zeigen die GA/TC Polypyrimidin-Boxen auf der DNA an. Die Graphik soll die Oligomerisierung mehrerer GAGA-Faktoren über die N-terminale POZ-Domäne und die gleichzeitige Bindung an die GAGA-Bindemotive des Ubx-Promotorfragments veranschaulichen. (Nach Verrijzer et al., 1999).

Eine Bindung von drei und mehr GAGA-Faktoren an entsprechende Motive im Promotorbereich von Genen kann die Transkriptionsrate erheblich verstärken (Azorin et al., 1999). Die Aktivierung von Promotoren nach der Bindung des GAGA-Faktors wird jedoch erst durch die Wechselwirkung von weiteren Transkriptionsfaktoren mit dem Promotor an anderen Bindemotiven erreicht. Eine ausschließliche Bindung von GAGA-Faktoren an einen entsprechend konstruierten Promotor ist für eine Transkriptionsaktivierung nicht ausreichend. Daher kommt dem GAGA-Faktor eher eine Rolle als Antirepressor denn als Transkriptionsaktivator zu (Okada et al., 1998).

Der GAGA-Transkriptionsfaktor besitzt vielfältige Funktionen in der Regulation der Genexpression sowohl in der Keimesentwicklung und der Regulation des Zellzyklus, als auch in stressinduzierten Genen und in Genen, welche „housekeeping“-Funktionen besitzen (Elgin et al., 1995, Lis et al., 1997).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der GAGA-Faktor durch Wechselwirkung mit Polycomb-Proteinen in das Silencing von Genen involviert ist. Der GAGA-Faktor ist somit erheblich an der Dynamik des Chromatin-Gerüsts beteiligt (Mishra et al., 2001).

Obwohl in dem Genom von *Arabidopsis thaliana* hunderte potentielle GAGA-Bindemotive vorkommen ist ein pflanzliches GAGA-Homolog nicht gefunden worden. Erst in jüngster Zeit wurde in Gerste (*Hordeum vulgare*) der Polypyrimidin-Motiv-bindende Transkriptionsaktivator BBR beschrieben (Santi et al., März 2003).

2.4 Entdeckung einer Polypyrimidin/Polypurin bindenden Protein-Familie

Während den Arbeiten an dieser Dissertation fanden zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander in der Sojabohne (*Glycine max*) (Sangwan et al., 2002) und in der Gerste (*Hordeum vulgare*) (Santi et al., 2003) Vertreter einer bisher nicht beschriebenen Protein-Familie, welche mit den im pflanzlichen Genom häufig auftretenden Polypyrimidin/Polypurin-Sequenzen interagieren können und hier in Kürze vorgestellt werden.

2.4.1 Das GAGA-Binding-Protein *Gbp*

Das *Gsa1*-Gen codiert für das Häm- und Chlorophyll-Synthese-Gen Glu1-semialdehyde aminotransferase (Frustraci et al., 1995) in dessen Promotor ein perfektes [(GA)₉/(TC)₉]-Motiv lokalisiert ist.

Sangwan (2002) beschreibt das 282 Aminosäuren lange GAGA-Binding-Protein (*Gbp*) (GenBank accessin no. AF502431), welches durch seine Affinität mit dem verdreifachten Polypyrimidin/Polypurin-Motiv der Promotorsequenz des *Gsa1*-Promotors in einem Yeast One-Hybrid Screen als Interaktionsprotein identifiziert werden konnte. In der Mitte der Aminosäuresequenz befindet sich eine funktionale Kernlokalisierungssequenz (NLS). Das *Gbp* wurde als Fusionsprotein mit dem Maltose-binding Protein (MBP) überexprimiert und im EMSA mit ³²P-markierten DNA-Sonden +/- 18 Basen langen Polypyrimidin/Polypurin-Motiven eingesetzt, wobei in vitro eine spezifische Bindung des *Gbp*-MBP an diese Motive nachgewiesen wurde. Weiterhin konnte via Northern-Blot gezeigt werden, dass die Expression sowohl das *Gbp* als auch des *Gsa1*-Gens miteinander corellieren. Sangwan schließt daraus auf eine transkriptionssteigernde Funktion der *Gbp*-Bindung auf den *Gsa1*-Promotor und postuliert, dass das Auftreten eines Polypyrimidin/Polypurin-Motivs in einer Promotorsequenz gleichbedeutend mit einer *Gbp*-beeinflussten Transkriptionskontrolle ist.

2.4.2 Das Barley Brain Protein BBR

Bei der Untersuchung der molekularen Grundlagen des „hooded“ Phänotyps in Gerste (*Hordeum vulgare*, Deutscher Name: Kapuzinergerste), der durch abnorm geformte Infloreszenzen auffällt, fand man eine Verdopplung einer 305 bp langen Sequenz im Intron IV des Knox Homeoproteins BKn3 (Müller et al., 1995). Dieser Sequenzbereich besitzt, 5'-seitig vor einen 35S-Minimalpromotor kloniert, die Eigenschaft zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und zur Initiierung der Transkription.

Mithilfe eines Yeast One-Hybrid Screens wurden mehrere DNA-Bindeproteine isoliert, die eine Bindeaffinität zu der 305bp langen Sequenz aufweisen. Darunter befand sich ein Protein mit 350 AS Länge in dessen C-terminalen Proteinsequenz eine putative DNA-bindende Domäne lokalisiert werden konnte (243-350). Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenz mit entsprechenden Datenbanken ergab nur für einen Bereich von 53 AS eine 40%ige Homologie mit Brain1, einem im menschlichen Hirn beschriebenen DNA-bindenden Kernprotein

(Accession Number Q16650, Bulfone et al., 1995), woraufhin das Protein Barley Brain (BBR) benannt wurde.

Eine Cotransformation eines BBR-Expressionsvektors mit der 305bp langen Intronsequenz vor einem 35S Minimalpromotor mit GUS als Reportergen ergab in Tabak-Blatt-Protoplasten durchschnittlich eine um den Faktor 5,7fach erhöhte GUS-Aktivität im Vergleich zu den Daten aus Experimenten ohne den BBR-Expressionsvektor. Santi deutet den BBR-Transkriptionsfaktor durch diesem Befund als einen Transkriptionsaktivator was sich mit den Schlussfolgerungen Sangwans bezüglich dem homologen *Gbp*-Protein (s.o.) deckt.

5'-seitig verkürzte Deletionsmutanten des BBR-ORF ergaben funktionale DNA-bindende Proteine von minimal 128 AS Länge. Der Aufbau dieser DNA-bindenden Domäne ist unbekannt und besitzt keine Homologie zu bekannten DNA-Bindeproteinen wie Leucin-Zipper- oder Zink-Finger-Bindemotiven. Des weiteren ergab die AS-Sequenz einen Bereich mit stark erhöhtem Glutaminaufkommen. Solche glutaminreichen Domänen sind als potentielle homo- und hetero-Protein - Protein Interaktionsbereiche beschrieben worden (Wilkins et al., 1999, Pinto und Lobe 1996). Zwischen AS 198 und AS 219 befindet sich eine funktionale Kernlokalisierungssequenz (NLS) wie eine transiente Transformation von Tabak-Protoplasten in vitro mit BBR::GFP und BBR::RFP ergeben hat (Santi et al., 2003).

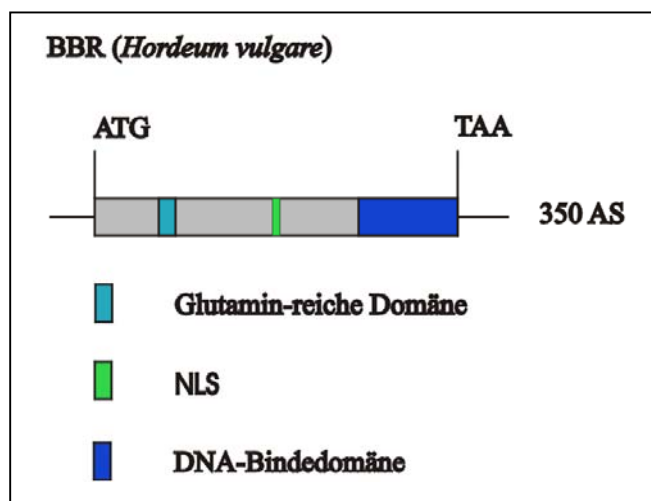


Abb. 1.4.2a: Schematische Darstellung von BBR aus Gerste (*Hordeum vulgare*). (Nach Santi et al., 2003) Das Protein besitzt eine unbekannte Art DNA-Bindedomäne (blau), ein NLS (grün) und eine auffällig Glutamin-reiche Domäne die als putativer Protein-Protein Interaktionsbereich dienen könnte. (Wilkins et al., 1999)

Auffällig ist das Fehlen von Introns in der genomischen BBR-Sequenz in Gerste. Die cDNA-Sequenz ist mit der genomischen Sequenz identisch (Wang 2001). Die Tatsache, dass BBR aus cDNA isoliert wurde, widerlegt die Vermutung, dass es sich um ein Pseudogen handeln könnte. In den BBR-homologen Genen in Reis, Tomate und Sojabohne wurden ebenfalls keine Introns gefunden (Santi et al., 2003). In *Arabidopsis thaliana* konnten insgesamt sieben BBR-homologe Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Alle weisen eine große Homologität in ihrer C-terminalen DNA-bindenden Domäne auf.

Durch die Verwendung sukzessiv kürzerer ³²P-markierter Fragmente der 305 bp langen Sequenz im Intron IV des Knox Homeoproteins als Sonde im EMSA konnte schließlich TCTCTCTCTCTCTC (TC)₈ als alleiniges DNA-Bindemotiv für BBR eingegrenzt werden.

1.4.3 Anzahl und Verteilung von (GA/TC)₈-Polypurin/Polypyrimidin-Sequenzmotiven im Genom von *Arabidopsis thaliana*

Auffallen ist das stark vermehrte Vorkommen von (GA/TC)₈-Motiven in den Promotorsequenzen von *Arabidopsis thaliana*.

	Gesamtzahl	In Exons		In Introns		In Promotoren von -1500 bis ATG		In nicht codierenden Sequenzen	
		N	%	N	%	N	%	N	%
(GA/TC) ₈	547	5	< 1	72	13	344	63	126	23
Anzahl bp zwischen zwei (GA/TC) ₆₋₁₁ Wiederholungen	69068	775000		60476		38943		99068	

Tabelle 1.4.3a: Dargestellt ist die Verteilung der (GA/TC)₈-Motive in kodierenden und nicht codierenden Regionen im Genom von *Arabidopsis thaliana*, sowie deren prozentuales Vorkommen entsprechend ihrer Anzahl. Die unterste Zeile zeigt die durchschnittliche Anzahl Basenpaare zwischen zwei (GA/TC)₆₋₁₁ Wiederholungen (Nach Santi et al., 2003).

3 Zielsetzung der Dissertationsarbeit:

Im Rahmen des steigenden Interesses der Wirtschaft an nicht viralen Promotorsequenzen zur Expression von Nutzgenen in Pflanzen, sollte am Beispiel des konstitutiven und sehr starken V-ATPase Promotors Y11037 (BVA c1) aus *Beta vulgaris*, die Bedeutung der Polypyrimidin-Sequenzen im Promotor und im 5'UTR-Bereich für die Gesamtpromotoraktivität untersucht werden. Polypyrimidin-Sequenzen (TC)_n sind im Genom vieler pflanzlicher Promotoren weit verbreitet. Daher wurde für diese Motive eine funktionale Bedeutung postuliert.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Klonierung von für die Genregulation potentiell verantwortlichen Transfaktoren, welche mit diesen Polypyrimidin-Sequenzen interagieren. Dazu sollten diese DNA-bindenden Proteine überexprimiert und nativ aufgereinigt werden.

Darauf aufbauend sollte durch vergleichende Interaktionsassays der identifizierten Transfaktoren mit markierten BVA c1-Promotorsequenzen deren spezifischen Bindeeigenschaften an die Polypyrimidin-Boxen nachgewiesen werden.

Des weiteren sollte in vivo der Nachweis der Funktionalität dieser Transfaktoren erbracht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Pflanzenmaterial und –anzucht

4.1.1 *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur

Bei den für die ballistische Transformation verwendeten *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur handelt es sich um eine undifferenzierte, heterotrophe *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur Typ VRB (Vereinigte Republik Bulgarien) und stammt von der Gesellschaft Planta (Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie, Einbeck). Die Kultur wird bei 19-23°C im Dauerdunkel auf einem Schüttler mit ca. 150Upm gehalten. Die Zellen aus einem Ansatz mit ca. 67ml werden in 300ml Erlenmeyerkolben kultiviert und wöchentlich steril auf drei Kolben mit je 50 ml frischen Gamborg B5-Medium aufgeteilt. Die Zellen besitzen 3-4 Tagen nach dem Umsetzen in frisches Medium die höchste Transformationseffizienz für die ballistische Transformation (Jugold 2000) und wurden immer innerhalb dieses Alters verwendet.

4.1.1.1 Gamborg B5-Medium zur Kultivierung von *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur

Ansatz für einen Liter Medium:

3,17 g/l Gamborg B5 Medium (SERVA), 0,5 g/l Casein Hydrolysat, 30 g/l Saccharose
Zugesetzte Phytohormone je 100 µl: Kinetin (2 mg/ml in 1 M NaOH), NAA (5 mg/ml EtOH), IAA (5 mg/ml EtOH), 2, 4-D (20 mg/ml EtOH). Gegebenenfalls auf pH 5,5 einstellen. Das Medium wird im 300ml Erlenmeyerkolben zu je 50 ml aliquotiert, mit Aluminiumfolie verschlossen und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen ist das Medium gebrauchsfertig und kann mehrere Monate ungekühlt gelagert werden.

4.1.1.2 Gamborg B5-Agar für *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur

Um die Zellen während und nach der Transformation mit Nährstoffen, Phytohormonen und Wasser zu versorgen, werden die Zellen vor dem Beschuss auf Agarplatten transferiert. Das Agar-Medium entspricht dem Flüssig-Medium mit zusätzlich 10 g/l Select-Agar (Becton Dickinson), 22,7 g/l Mannitol und 22,7 g/l Sorbitol. Die Lösung wird für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in kleine Petrischalen (53 mm Ø) gegossen. Nach dem Erhärten des Agars werden die B5-Platten ca. 20 Minuten unter der Sterilbank mit geöffnetem Deckel getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.1.2 *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionskultur

Bei der zur ballistischen Transformation verwendeten *Arabidopsis*-Zellkultur handelt es sich um eine heterotrophe Zellsuspension, die aus Wurzelgewebe gewonnen wurde (Terzzini et al., 1993). Die Zellen werden mit 120Upm geschüttelt und im Dauerdunkel bei ca. 23°C kultiviert.

Herstellung von einem Liter Murashigge & Skoog-Medium (MS-Medium):

4,3g MS salt mixture (Sigma M5524), 1ml 2.4D Stammlösung (1mg/ml EtOH), 1ml Vitaminstocklösung (5g Inositol, 25mg Nikotinsäure, 25mg Pyridoxin-HCl, 25mg Thiamin-HCl in 50ml A. bidest lösen und zu je 1ml bei -20°C lagern), 20g Glucose, pH 5.7 mit 1N KOH oder 1N HCl einstellen.

Das Medium wird zu jeweils 100ml in ausgeglühte 500ml Erlenmeyerkolben aliquotiert und mit Aluminiumfolie verschlossen für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. 6g Zellen müssen nach einer Woche in einen frischen Kolben überführt werden. Dazu werden die Zellen in einem autoklavierten Metallsieb abgegossen und mit einem ausgeglühten Metalllöffel in die frischen Kolben übersetzt. Das Umsetzen kann entweder auf einer Waage erfolgen oder das Gewicht wird nach dem Umsetzen überprüft.

Herstellung von einem Liter Murashigge & Skoog-Agar (MS-Agar):

Einem Liter MS-Medium (s.o.) werden 10g Select-Agar (Becton Dickinson) zugegeben. Die Lösung wird für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in kleine Petrischalen (53mm Ø, Greiner) gegossen. Nach dem Aushärten des Agars werden die MS-Agar-Platten ca. 20 Minuten unter der Sterilbank mit geöffnetem Deckel getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.1.3 Anzucht von WT *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Für die Anzucht der *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurde Saatgut des Typ Columbia (Col.0) auf Sand dünn ausgesät und unter einer Klarsichthaube zum Schutz vor Trauermücken-Befall bei 23°C unter Kurztagbedingungen bis zum Vier-Blatt-Stadium herangezogen. Die jungen Pflanzen wurden dann in mit Sand gefüllte Pflanzgefäße (6 x 6 cm) vereinzelt. Dem Sand wurde vorher der Langzeit-Dünger Blusana (LEWATIT® HD5, 6g Gramm/10l Sand, Firma: Leni) zugesetzt. Die Pflanzen wurden weiterhin unter den gleichen Bedingungen 7-10 Wochen bis zur Transformation kultiviert und mit Leitungswasser gegossen. Für die Versuche wurden immer Pflanzen vergleichbarer Größe und physiologischen Zustands verwendet. Angesetzte Infloreszenzen wurden frühzeitig entfernt.

4.2 Bezugsquellen

Alle verwendeten Chemikalien waren mindestens analyserein und stammen von den Firmen Roche, Fluka, Baker, Merk, Sigma-Aldrich, sowie Schleicher und Schüll. Die DNA-Längenstandards „Smart Ladder“ sowie „1kb-Ladder“ wurden von den Firmen Eurogentec beziehungsweise Gibco-BRL bezogen. Die Chemolumineszenz-Reagenzien für die Luciferaseassays und zur Detektion der biotinylierten Sonden zusammen mit den entsprechenden Materialien zur Detektion wurden von Promega beziehungsweise Stratagene bestellt. Die Herkunft aller weiterer verwendeter Chemikalien und Geräte sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen, oder den entsprechenden Methoden vermerkt.

4.3 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.3.1 Bakterienanzucht

Bakterien-Flüssigkultur (LB-Medium)

Die Vermehrung von *E. coli* erfolgt in autoklaviertem LB-Medium (10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.4 mit 1N NaOH), dem nachträglich je nach den Resistenzen der Bakterien die entsprechenden Antibiotika frisch beigelegt werden (100 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Tetracyclin, 50 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol).

LB-Agarplatten (LB-Agar)

LB-Agar entspricht dem LB-Medium mit zusätzlich 20g Select-Agarose (Firma)/l. Um gegebenenfalls benötigte Antibiotika in ihrer Wirkung nicht zu beeinträchtigen werden diese erst zugegeben wenn die Lösung auf unter 60°C abgekühlt ist. (Ca. 20 ml des LB-Agars können dann sofort in sterile Petrischalen (89 mm Ø, Greiner) gegossen werden. Nach dem Erstarren des Agars werden die Petrischalen mit geöffnetem Deckel noch ca. 20 Minuten bei laufender Flow getrocknet und sind anschließend bei 4°C mehrere Wochen lagerfähig.)

4.3.1.1 Herstellung von Bakterien –Stammkulturen (Glycerolstock)

1ml einer Bakterien-Übernachtskultur werden mit 400µl sterilem Glycerol in einem 2ml Eppendorfgefäß 10 Sekunden gevortext und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei –80°C. Die Lebensfähigkeit auf diese Weise behandelte Bakterien liegt bei über 2 Jahren.

4.3.1.2 Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* –Zellen

Um Bakterien elektrisch kompetent zu machen, müssen sie möglichst frei von Salzen und Medienrückständen sein, um während der Elektroporation ein Durchschlagen der elektrischen Ladung und damit das Abtöten der meisten Bakterien zu verhindern.

5ml einer Übernachtskultur werden zum Animpfen von 500ml LB-Flüssigmedium in einen 2l Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 – 0,6 heftig geschüttelt. Dem LB-Medium wurden entsprechend der Resistenzen der Bakterien Antibiotika zugesetzt. Der Kolben wird in Eiswasser 15 Minuten unter leichtem Rühren abgekühlt und die Bakterien bei 4°C mit 4000g abzentrifugiert. Zweimal wird das Bakterienpellet in 500ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und abzentrifugiert. Danach wird das Pellet in 40ml ebenfalls steriler, eiskalter 10% (v/v) Glycerinlösung aufgenommen, resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wird wieder in 40 ml 10% (v/v) Glycerinlösung gelöst. Danach werden 50µl Aliquots in vorgekühlte und beschriftete sterile Eppendorfgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Transformation erfolgt bei –80°C.

4.3.1.3 Elektroporation von *Escherichia coli*

Zur Transformation elektrokompenter *Escherichia coli* werden die bei -80°C gelagerten Bakterienaliquots auf Eis aufgetaut und mit 0.5 – 1.5 μl Ligationreaktion oder verdünnter Plasmidlösung (10 – 200 ng DNA) versetzt. Die Bakterien werden anschließend in eine vorgekühlte saubere Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 mm pipettiert und mit dem „Genepulser II“-System (Biorad, Einstellungen: 1.8 kV, Widerstand 200 Ω , Kapazität 25 μF) transformiert. Sofort danach werden in die Elektroporationsküvette 1 ml SOC Medium (0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Bactotrypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose, autoklaviert) gegeben und die Bakterienlösung 30 – 40 Minuten bei 37°C geschüttelt. Anschließend können die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum für das auf dem Plasmid codierten Resistenzmarker ausplattiert werden. Nach ca. 16 Stunden sind einzelne Bakterienkolonien erkennbar, die auf die eingebrachten Plasmide hin untersucht werden können.

4.3.2 Blau/Weiß Selektionierung

Zur Identifizierung von zur Transformation verwendeten pGEM-T Vektoren mit potentiell inseriertem Insert wurde standardmäßig eine blau/weiß Selektionierung durchgeführt. Dazu wurden auf einer LB-Amp-Platte (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) 50 μl X-Gal (25mg/ml Dimethylformamid) und 50 μl IPTG (23mg/ml A. bidest) ausgestrichen und 50 – 300 μl der Transformationsansätze ausplattiert. Nach 15 – 20 Stunden Inkubation sind blaue und weiße Bakterienkolonien zu sehen. Die weißen Kolonien sind die potentiell positiven Klone. Der Grund dafür liegt in der Insertion des PCR-Produktes in die MCS des pGEM-T Vektors, wodurch das Leseraster der β -Glucuronidase unterbrochen wurde. Diese Bakterien sind nicht in der Lage, das Dimethylformamid umzusetzen und erscheinen weiß.

4.3.3 Aufschluss von Bakterien mit der „French Press“

Die „French Press“ ist ein Gerät, mit dem Bakterien schnell und effektiv aufgebrochen werden können. Diese Methode ist sehr schonend und generell gut geeignet, Proteine nativ aufzureinigen. 0,5 – 2 Liter Bakterienkultur werden für 15 Minuten mit 3500g bei 4°C abzentrifugiert, in 100ml Aufschlusspuffer resuspendiert und erneut mit 3500g bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wird in 15 bis maximal 30 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und bis zum Aufschluss in der „French Press“ auf Eis gelagert. Es ist an dieser Stelle auch möglich, die Bakterien in flüssigem Stickstoff einzufrieren und mehrere Monate bei -20°C zu lagern.

Der Aufschluss der Bakterien erfolgt bei einem Druck von 105bar. Die Bakterien-Lösung wird in das Gerät gesaugt und unter großem Druck langsam durch eine sehr enge Austrittsöffnung gepresst. Die dabei entstehenden Scherkräfte brechen die Bakterien-Zellwände auf. Nach 2 – 3 Wiederholungen erscheint die Bakterien-Lösung nicht mehr gelblich und milchig sondern dunkler und klarer. Es ist darauf zu achten, dass sich die Lösung durch mehrmaliges Aufschließen nicht zu stark erwärmt. Der Auffangbehälter sollte daher immer eisgekühlt sein.

Aufschlusspuffer

Als Aufschlusspuffer wurde der im EMSA beschriebene Reaktionspuffer mit 40mM KCL verwendet (siehe: 3.7.1). Zum Schutz der Proteine wurde pro 25ml Lysat ½ Tablette Protease-Inhibitor (complete Inhibitor Cocktail Tablets, Firma: Roche) zugesetzt und alle weiteren Schritte bei der Aufreinigung der überexprimierten Proteine auf Eis oder bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

4.4 DNA-Techniken**4.4.1 Plasmid-Isolation aus *Escherichia coli***

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Kits der Firmen Machery-Nagel (Nucleospin) und Qiagen (Qiaprep) verwendet. Beide Kits beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien und einer Aufreinigung der Plasmid-DNA durch eine selektive Bindung an Glasfasersäulen.

4.4.2 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzenanzucht erfolgte wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben. Die DNA-Isolation wurde nach Murray (1980) durchgeführt.

4.4.3 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt pro Reaktionszyklus die Verdopplung einer DNA-Sequenz die von zwei Oligonukleotid-Primern flankiert wird. Die beiden Primer werden in ihrer Sequenz so gewählt, dass sie jeweils 3'-seitig in Richtung der zu amplifizierenden Sequenz mit dem Templat hybridisieren können. Die verwendeten hitzestabilen DNA-Polymerasen katalysieren die Synthese eines komplementären DNA-Stranges entsprechend der Templat-Vorlage. Die verwendeten PCR-Programme sind stark von den Eigenschaften der jeweiligen Primer, der entsprechenden DNA-Polymerase und der Länge des Templats abhängig. Ein typischer PCR-Ansatz ist im Folgenden exemplarisch beschrieben:

1µl DNA-Templat	(5 – 100ng)
5µl 10x PCR-Reaktionspuffer	(200mM Tris HCl (pH 8.0), 500mM KCl, Firma: Invitrogen)
1µl dNTP-Gemisch	(0,05mM je dNTP)
1.5µl MgCl ₂	(50mM)
0.2µl Taq DNA-Polymerase	(5u/µl Firma Invitrogen)

mit autoklaviertem Aqua dest. auf 50µl Gesamtvolumen bringen.

Zyklus 1

Denaturierung	2 min	97°C
---------------	-------	------

Zyklus 2

Denaturierung	30 s	97°C
Primer-Annealing	35 s	45 – 65°C
Elongation	0.5 - 2 min	72°C

(35x Wiederholung des Zyklus 2)

Zyklus 3

Elongation	5 min	72°C
------------	-------	------

Alle PCR-Reaktionen sind mit dem Robocycler (Gradient 40) der Firma Stratagene durchgeführt worden.

4.4.4 Herstellung biotinylierter Sonden

Biotinylierte DNA-Sonden wurden mittels PCR mit bereits ein- oder mehrfach biotinylierten Primern (MWG, Ebersberg) hergestellt, um eine homogene Markierung der Sonden zu gewährleisten. Auf diese Weise sind die zentralen Bereiche der jeweiligen Sonden frei von Biotinmarkierungen, so dass eine optimale Wechselwirkung mit potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren im EMSA (siehe Punkt 3.7) möglich ist.

4.4.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um doppelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide zu erhalten, können komplementäre Nukleinsäuren miteinander hybridisiert werden.

Lyophilisierte Oligonukleotide (Oligos) werden in DEPC-Wasser gelöst (Endkonzentration: 50µM) und je 30µl der entsprechenden Oligos mit 15µl 5x Hybridisierungspuffer (1x Hybridisierungspuffer: 30mM HEPES-KOH pH 7.4, 100mM Kaliumacetat, 2mM Magnesiumacetat) in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert. Die Lösung wird für 5 Minuten auf 85°C im Heizblock erhitzt, wobei die Oligonukleotide aufschmelzen. Sofort im Anschluss erfolgt die Hybridisierung für 15 Minuten bei 37°C. Die Endkonzentration der annealten Oligonukleotide beträgt 20µM. Um ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, wird die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.4.6 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Werden die Nukleinsäuren in ein Agarose-Gel geladen und eine Spannung angelegt, so trennen sie sich nach ihrer Größe auf, wobei größere Fragmente stärker retardiert werden als kleinere. Die Agarose-Konzentration wurde den aufzutrennenden Fragmentgrößen angepasst und variiert zwischen 0,7% Agarose bei großen und bis zu 3% Agarose (jeweils in 1x TAE-Puffer) bei kleinen Fragmenten. Wenn nicht anders beschrieben wurden standardmäßig 1%ige Agarose-Gele verwendet.

Durch zehnmütiges Färben des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (0,5µg/ml in Wasser) und anschließendem fünfminütigem Entfärben in Wasser können die mit Ethidiumbromid interkalierten Nukleinsäuren unter UV-Licht (UVT-20 M/W, Herolab) sichtbar gemacht und mit einem Digitaldokumentationssystem (Herolab) dokumentiert werden.

Elektrophoresepuffer TAE

2M Tris-Base

1M Natriumacetat trihydrat

50mM Na₂EDTA

pH 7,2 mit Eisessig eingestellt

1x TAE-Puffer wird durch 50fache Verdünnung von 50x TAE-Stammlösung (242 g Tris Base, 136.1 g NaOAc \cdot 3H₂O, 18.6 g EDTA, pH 7.2 HOAc konz.) mit VE-Wasser angesetzt.

5x DNA-Auftragspuffer

5x TAE-Laufpuffer

50% Glycerin

0,1% (w/v) Bromphenolblau

Mit diesem Auftragspuffer wurde standardmäßig alle mittels Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Lösungen versetzt (Endkonzentration 1x).

4.4.7 Reinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR

4.4.7.1 Reinigung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit

Um nach einer PCR das Amplifikat klonieren oder mit Restriktionsenzymen schneiden zu können, ist meist eine Reinigung der PCR-Amplifikate von Oligonukleotiden, dNTPs, Mg²⁺-Ionen und weiteren Pufferbestandteilen erforderlich. Hierfür wurde der QIAquick™ PCR Purification Kit der Firma Qiagen® verwendet. Der Kit beruht auf der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an die Glasfaserfritte der Säulen. Nukleinsäuren mit einer Länge unter 60 bp (Primer) und alle weiteren Reagenzien werden durch die Waschschriffe entfernt. Die gebundene DNA kann dann mit Wasser oder einem geeigneten Puffer (pH 7.5) eluiert werden.

4.4.7.2 Reinigung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese

Um nach einer PCR-Reaktion das Amplifikat von dem eingesetzten Templat abzutrennen, oder nach einem Verdau ein einzelnes DNA-Fragment sauber zu isolieren, ist eine Aufreinigung über Agarosegelelektrophorese nötig. Dazu wird ein mit Methylenblau gefärbtes Agarosegel mit dem DNA-Gemisch beladen und die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch die positive Ladung des Methylenblau kommt es zu einer sichtbaren Interaktion mit der negativ geladenen DNA und das entsprechende DNA-Fragment kann aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Aus dem Gelstück kann dann mit Hilfe des Gel Purification Kit (Qiagen®) die DNA extrahiert werden.

4.4.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um DNA aus Agarose-Stücken zu extrahieren, wurde das Gelextraktionskit der Firma Qiagen den Angaben entsprechend verwendet. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus den Agarose-Gelen erfolgte mit verschiedenen Methoden (s.u.).

4.4.9 Ethidiumbromid-Färbung

Bei der Anfärbung der DNA im Gel mit Ethidiumbromid und dem anschließenden Ausschneiden der fluoreszierenden DNA-Bande (590 nm) aus dem Agarosegel unter UV-Licht wurde die DNA häufig für die Klonierung unbrauchbar. Dies beruht auf der Sensibilität von mit EtBr interkalierter DNA unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm.

4.4.10 Methylenblau-Färbung

Hierbei wird die Agarose und der verwendete Laufpuffer mit Methylenblau eingefärbt (10mg/100ml). Methylenblau ist ein positiv geladenes Molekül und wandert im elektrischen Feld zur Kathode. Bei dem Gellauf interagiert die DNA mit dem Methylenblau aufgrund der unterschiedlichen Ladung und die DNA erscheint trotz stark blauem Hintergrund als deutlich sichtbare Bande. Voraussetzung ist, dass die DNA-Menge pro Bande mindestens 300 – 500ng beträgt. Um die Signale stärker hervorzuheben, kann das Gel nach der Auftrennung der DNA 10 Minuten in VE-Wasser entfärbt werden. Eine UV-Exposition ist nicht nötig. Die DNA wird bei dieser Methode der Anfärbung nicht geschädigt.

Nachteile dieser Methode sind die niedrige Sensitivität bei geringen DNA-Konzentrationen und die schlechte Dokumentierbarkeit der Agarosegele mit dem verwendeten Kamerasystem (Herolab). Ein nachträgliches Anfärben des Gels mit EtBr ist durch die starke Absorption des Methylenblau nicht möglich.

4.4.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Vergleichende Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA im EtBr gefärbten Agarosegel kann die Konzentration von Nukleinsäuren definierter Längen durch Vergleich mit einem Standard-DNA Marker abgeschätzt werden. Verwendet wurde dafür der DNA Marker „Smart Ladder“ der Firma Eurogentec. Die Konzentrationen der zu vermessenden DNA sollte dabei zwischen 20-100µg/µl liegen, was der kleinsten beziehungsweise größten DNA-Konzentration einzelner Markerbanden entspricht.

Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Messung der optischen Dichte

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260nm. Durch Messung der Extinktion kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration der Nukleinsäuren in wässriger Lösung errechnet werden. Eine gemessene Extinktion von 1 bei 1 cm Schichtdicke

entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA, beziehungsweise 40µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Die Messungen erfolgten in Quarzkyvetten und wurden mit dem Photometer UVT-20 M/W der Firma Herolab durchgeführt.

4.4.12 Klonierung von PCR-Amplifikaten mit dem pGEM-T[®] Cloning System

PCR-Produkte, die mit einer Taq-Polymerase amplifiziert wurden, weisen an ihren jeweiligen 5'-Enden einen einzelnen Adenin-Überhang auf. Der pGEM-T Vector Kit (Promega) nutzt diese Eigenschaft zur Erhöhung der Ligationseffizienz aus, indem die linearisierten pGEM-T Vektoren Thymin-Überhänge besitzen.

3µl (50 - 200ng) des gereinigten PCR-Amplifikates (siehe Reinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR Reaktionen) wurden mit 1µl pGEM-T-Vektor (50ng), 5µl Rapid Ligation Buffer und 1µl T₄-DNA-Ligase über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 1µl des Ligationsansatzes in *E. coli* transformiert.

4.4.13 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firmen Seqlab (Göttingen) und MWG (Ebersberg) nach Sanger durchgeführt.

4.5 Modifizierung von Nukleinsäuren

4.5.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, mit denen Nukleinsäuren an (für die Endonuklease) charakteristischen Basensequenzen gespalten werden kann. Die verwendeten sogenannten Restriktionsenzyme stammen von New England Biolabs (NEB) und wurden entsprechend der Vorschrift eingesetzt.

4.5.2 Ligation von DNA

Nukleinsäureenden können mit Hilfe der T₄-Ligase miteinander verknüpft werden, sofern die Enden komplementär zueinander sind. DNA-Ligasen katalysieren unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer gegenüberliegenden 3'-Hydroxylgruppe. Die Ligationen wurden mit dem 2x Rapid Ligation Buffer (60 mM Tris HCl, pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 10% PEG, 20 mM DTT) des pGEM[®]-T Klonierungssystems (Promega) bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die Ligationseffizienz bei Verwendung dieses 2x-Ligations-Puffers ist sehr hoch.

4.5.3 T₄-Polynukleotidkinase

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfordert an mindestens einem der beiden zu verbindenden Fragment-Enden 5'-seitig eine Phosphorylierung des 5'-OH-Terminus. Die T₄-

Polynukleotidkinas katalysiert den Transfer eines Phosphates von ATP auf diese 5'-OH-Enden von DNA oder RNA. Die Reaktionen mit T₄-Polynukleotidkinase sind entsprechend den Angaben des Herstellers (Stratagene) durchgeführt worden.

4.5.4 Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP)

Um eine Rezirkularisierung eines mit einem Restriktionsenzym geschnittenen Vektors zu verhindern, können die 5'-OH-seitigen Phosphatgruppen der DNA-Enden durch das Enzym SAP (engl.: *shrimp alkaline phosphatase*, Roche) entfernt werden. Trotzdem kann in diesen Vektor ein DNA-Fragment inseriert werden, wenn an diesem die 5'-OH-seitigen Phosphatgruppen intakt sind. Auf diese Weise kann die Anzahl von Vektoren ohne das gewünschte Insert erheblich verringert werden.

4.5.5 S1-Nuklease

Die S1-Nuklease ist ein Metallo-Glycoprotein mit einer Molmasse von 38 kDa und wurde aus *Aspergillus oryzae* isoliert. Es spaltet mit Zn²⁺-Ionen als Cofaktor bei einem pH von 4 – 4.3 selektiv einzelsträngige Nukleinsäuren. Das Enzym erlaubt sowohl das „Blunten“ (Punkt 3.5.6) von doppelsträngigen DNA-Fragmenten, als auch einen Nachweis auf DNA-Strukturen bei denen einzelsträngige DNA vorliegt. Weiterhin können Gemische von doppelsträngiger DNA oder RNA von einzelsträngigen Nukleinsäuren befreit werden. Das Enzym wurde den Herstellerangaben (Promega) entsprechend verwendet. Abweichungen sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

4.5.6 „Blunten“ von DNA

Um zwei DNA-Fragmente miteinander verbinden zu können, die mit unterschiedlichen Restriktionsnukleasen geschnitten wurden, ist es nötig, die entsprechenden DNA-Enden so zu modifizieren, dass sie zueinander passen. Dies geschieht gewöhnlich durch ein so genanntes „blunten“ der DNA. Dabei werden 5'- oder 3'-Überhänge, die nach dem Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen entstanden sind, aufgefüllt beziehungsweise abgespalten.

4.5.6.1 Klenow-Enzym

Das verwendete Klenow-Enzym besteht aus der großen Untereinheit der DNA Polymerase I (*Escherichia coli*), der die 5'→3'-Exonucleaseaktivität des nativen Enzyms fehlt. Mit Hilfe dieses Enzyms können u.a. selektiv die 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten entfernt werden, indem die Polymerase Phosphodiester-Bindungen komplementärer dNTPs unter Abspaltung von Pyrophosphat an das freie 3' Hydroxyl-Ende des kürzeren DNA-Stranges katalysiert. Das Enzym wurde den Herstellerangaben (Promega) entsprechend verwendet. Abweichungen sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen beschrieben.

4.5.7 DNA-Einzelstrangdegradation mit der „Mung Bean“ Nuklease

Die „Mung Bean“-Endonuklease ist ein Zink-Metalloenzym und wurde ursprünglich aus Sprösslingen der Mung-Bohne isoliert. Es spaltet einzelsträngige DNA und entfernt sowohl 5'- als auch 3'-DNA-Überhänge. Da doppelsträngige Nukleinsäuren bei sehr hohen Enzymkonzentrationen angegriffen werden können wurde das Enzym den Angaben des Herstellers (Promega) entsprechend verwendet.

4.5.8 DNA-Mutation mit dem Quick Change Kit

Mit Hilfe des Quick Change Kit (Stratagene) ist es möglich, innerhalb eines Vektors ein- oder mehrere Basen selektiv zu mutieren. Dazu werden zwei selbstkomplementäre Primer entworfen, die in ihrer Mitte die gewünschte veränderte Basensequenz besitzen. Mit diesen Primern und dem unmodifizierten Vektor als Templat wird entsprechend der Kit-Anleitung eine PCR-Reaktion durchgeführt wobei der gesamte Vektor amplifiziert wird. Anschließend wird die PCR-Reaktion mit *Dpn* I verdaut. *Dpn* I spaltet nur DNA, die auf beiden Strängen die methylierte Sequenz GA^mTC besitzen. Dabei wird das Templat, welches aus Dam⁺-Bakterien isoliert wurde und Methylierungen trägt, degradiert. Übrig bleibt der mutierte Vektor, mit dem die Bakterien dann transformiert werden können. Für die Reaktion wird die PfuTurboTM DNA-Polymerase (2.5U/μl, Stratagene) verwendet. Diese DNA-Polymerase besitzt eine hohe Prozessivität und kann PCR-Produkte von 10 – 15 kb Länge amplifizieren. Das Primerdesign und die Durchführung der Reaktionen wurde nach den Anweisungen der Quick Change Kit-Anleitung durchgeführt.

4.5.9 Fällung von DNA

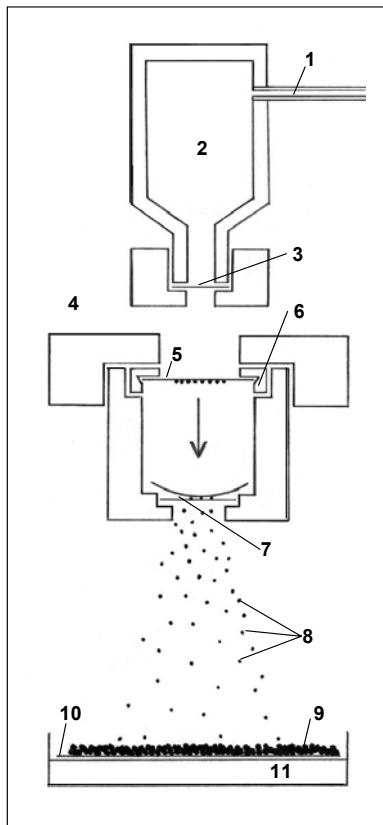
Um DNA-Lösungen aufzukonzentrieren oder von Salzen und Puffern zu befreien, können Nukleinsäuren ausgefällt werden. Dazu wird der Lösung 1/10 Volumen Natriumacetat (3M pH 7.2) und 0.5 Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und 30 Minuten bei 4°C und 13000rpm pelletiert. Sollte die DNA-Menge sehr gering sein (unter 1μg/1μl) so kann 1μl einer Glycogen-Lösung (1μg/μl) zugegeben werden. Glycogen erleichtert die Präzipitation und stört weitere Reaktionen nicht. Nach der Fällung wird der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und unter einem Abzug getrocknet. Das Pellet kann nun in Wasser oder einem geeigneten Puffer rückgelöst werden.

4.6 Ballistische Transformation

Die Methode der ballistischen Transformation (Particle Gun Bombardment) ermöglicht eine transiente Transformation von Zellen und Geweben durch das direkte Einbringen von Nukleinsäuren mittels beschleunigter Metallpartikel. Diese mit den entsprechenden Nukleinsäuren behafteten Mikroprojekte durchschlagen Zellwände und Membranen und bringen so DNA oder RNA in die Zellen. Die Transformationseffizienz ist bei dieser Methode sehr gering und beträgt weniger als 0,5 % der beschossenen Zellen (Lehr 1998, Viereck, Kallwas, unveröffentlichte Ergebnisse). Aufgrund dessen werden sensitive Nachweismethoden benötigt, um die Transformationen durch die Expression spezifischer

Reportergene wie Glucuronidase, Luciferase, GFP oder RFP nachweisen zu können. Die ballistische Transformation besitzt aber den großen Vorteil, sehr schnell und mit geringem Platz- und Arbeitsaufwand eine Vielzahl von Promotor-Reporter-Konstrukten, Oligonukleotiden RNAi-Konstrukten in vivo auf mögliche Effekte zu testen.

4.6.1 Aufbau und Funktionsweise der Partikel-Kanone



Die ballistischen Transformationen wurden mit dem Biolistic PDS-1000/He System der Firma BIO-RAD durchgeführt.

Funktionsprinzip: Aus einer Gasflasche wird Helium über einen Druckschlauch (1) der Kanone zugeleitet. Der Gasdruck baut sich in der Überdruckkammer (2) in der Kanone auf. Die Überdruckkammer wird zum Innenraum mit einer Berstscheibe (3) verschlossen. Die Berstscheibe zerreißt, wenn eine definierte Druckdifferenz auf ihr lastet. Wenn sie gerissen ist, schießt das komprimierte Helium in die vorher evakuierte Unterdruckkammer (4). Das Gas trifft auf die Rückseite eines Makrocarriers (5), der in einer Halterung (6) befestigt wurde. Der Makrocarrier erfährt über eine kurze Strecke eine starke Beschleunigung und schlägt schließlich auf dem Stoppnetz (7) auf. Die auf der Unterseite des Makrocarriers haftenden und mit Nukleinsäure beladenen Partikel (8) können die Maschen des Stoppnetzes passieren und dringen ungebremst in die unter ihnen platzierten Zellen (9) ein. Die Zellen liegen hier auf einem Rundfilter (10), durch den sie aus dem Agar (11) mit Wasser, Nährstoffen und

Phytohormonen versorgt oder durch Stressoren wie z.B. Schwermetalle oder hohe Salzkonzentrationen belastet werden können.

Bei allen Beschüssen wurden Berstscheiben benutzt, die bei einer Druckdifferenz von 1350psi bersten. Bei der Transformation von Zellsuspensionskulturen wurden die Zellen immer in Position 3 in der Particle-Gun positioniert. Das Alter der verwendeten *Beta vulgaris* oder *Arabidopsis thaliana* Zellsuspensionskulturen betrug zwischen 3 – 4 Tagen nach der letzten Überführung in frisches Medium. Die Zellen weisen in diesem Alter eine optimale Transformationseffizienz auf (Jugold 2000).

4.6.2 Präparation der Mikrocarrier

30 mg Wolframpartikel (M20 Mikrocarrier der Firma BIO-RAD mit einer durchschnittlichen Größe von 1,318 μm) werden in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 1ml 70%igem Ethanol 30 Sekunden gevortext. Die Partikel werden dann bei 4000g 30 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μl Wasser aufgenommen. Die

Partikel werden erneut bei 4000g 30 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand abgetrennt und in 50%igem Glycerin resuspendiert. Die so vorbehandelten Partikel können sofort verwendet oder bei -20°C gelagert werden, bevor sie mit DNA oder RNA beladen werden.

4.6.3 Beladen der Mikrocarrier

Für die einzelnen Versuche waren pro Versuchsbedingung unterschiedliche Anzahlen von Schüssen derselben Bedingungen erforderlich. Daher beziehen sich hier alle Angaben auf einen Schuss. Zuerst werden die entsprechenden Mengen Nukleinsäuren, 0,3-1,5 μg gelöst in 1-3 μl Wasser, in Eppendorfgläsern vorgelegt, bevor 9 μl Partikel-Suspension unter Vortexen zugegeben werden. Alle weiteren Reagenzien werden auf Eis und möglichst schnell zugegeben und sofort durch kurzes Vortexen mit den Partikeln homogen vermischt. Zugegeben werden nacheinander 9 μl 2,5M CaCl_2 , 3,6 μl 1,2mM Spermidin und 20 μl Ethanol absolut. Die Partikellösung wird auf Eis für mindestens 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit fallen die Nukleinsäuren aus und werden durch das Spermidin an die Partikel gebunden. Die Suspension wird kurz anzentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Den Partikeln werden pro Schuss 6,4 μl Ethanol absolut zugegeben und verbleiben bis zum Sonifizieren auf Eis.

4.6.4 Sonifikation der Mikrocarrier und Beladung der Makrocarrier

Die Partikel bilden nach der ethanolischen Fällung große Aggregate und müssen vor der Beladung der Makrocarrier vereinzelt werden. Dies geschieht durch mehrmalige hochfrequente Ultraschallpulse. Die Partikel werden durch Fingervortexen grob aufgeschlämmt und 7x bei maximaler Einstellung sonifiziert (LABSONIC 2000U B. BRAUN). Die Partikel werden durch Fingervortexen weiter homogen in Suspension gehalten und in 5 μl Aliquots auf die in Ethanol getauchten und getrockneten Makrocarrier pipettiert. Dabei sollten die Partikel nicht auf einen Punkt pipettiert werden, sondern möglichst fein im mittleren Bereich des Makrocarriers verteilt werden. Auf diese Weise erreicht man eine höhere Transformationseffizienz, da eine breitere Streuung des Schusses erfolgt und weniger Zellen durch örtlich zu starken Beschuss abgetötet werden. Solange die Partikel in reinem Alkohol vorliegen sind sie als keimfrei anzusehen. Ab diesem Schritt muss jedoch unter der Sterilbank gearbeitet werden um eine Kontamination der sterilen Zellsuspensionskulturen zu vermeiden.

4.6.5 Transformation mit der Partikel-Kanone

Die gesamte Partikelkanone, besonders der Innenraum werden vor den Beschüssen gründlich mit Ethanol gereinigt. Auch alle anderen Teile, die direkt oder indirekt in der Partikelkanone verwendet werden oder mit den zu transformierenden Zellen in Berührung kommen, werden mit Ethanol behandelt. Berstscheiben, Stoppnetze, Makrocarrierhalterungen, Pinzetten und andere Kleinteile werden durch kurzes Eintauchen in Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet. Die Sterilbank wird mit autoklavierten Papiertüchern ausgelegt auf denen die Makrocarrier zum Beladen ausgebreitet werden.

Sind alle Vorbereitungen abgeschlossen, wird die Überdruckkammer mit einer Berstscheibe verschlossen und ein Makrocarrier in seine Halterung eingesetzt. Diese Halterung wird kopfüber in einem Schlitten fixiert, der unmittelbar unter der Berstscheibe in die Position 1 der Partikelkanone eingeführt wird. Eine Agarplatte mit den zu transformierenden Zellen wird mittig auf einem Schlitten in Position 3 positioniert und der Deckel erst jetzt abgenommen. Die Kanone wird geschlossen und bis zu einem Unterdruck von 25 inches (Hg) evakuiert. Die Verbindung zu der Unterdruckpumpe wird mit einem Schalter geschlossen und dann der „fire“-Schalter gedrückt gehalten. Das daraufhin in die Überdruckkammer geleitete Helium führt schließlich zu einem Zerreißen der Berstscheibe. Der explosionsartig freigesetzte Gasstrom gibt seine kinetische Energie durch den mitgerissenen Makrocarrier an die Mikrocarrier weiter, die so beschleunigt in die Zellen eindringen können und zur Transformation führen. Nach dem Schuss wird das Vakuum aus der Kammer abgelassen und die Zellen bis zur Herstellung der Proteinextrakte bei RT im Dauerdunkeln steril inkubiert.

4.6.6 Ballistische Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Je nach Versuch wurden die zu transformierenden Pflanzen unterschiedlich vorbereitet. Wenn auf überirdische Pflanzenteile geschossen wird, können die Pflanzen in ihren Anzuchtgefäßen belassen werden. Um ein Austrocknen der verletzten Pflanzenteile zu vermeiden, werden die Pflanzen nach dem Beschuss möglichst schnell wieder unter Klarsichthauben verbracht.

Wenn die gesamte Pflanze beschossen werden soll, wird die Pflanzen samt Topf unter Wasser durch vorsichtiges Schütteln vom Substrat befreit. Auf diese Weise können die Wurzeln schonend vom Sand gesäubert werden. Die noch nassen Pflanzen werden bis zur Transformation in Petrischalen vor Austrocknung geschützt. Unmittelbar vor jedem einzelnen Schuss werden insbesondere die Wurzeln vorsichtig mit einem Stück Küchenrollenpapier von anhaftendem Wasser befreit. Die Mikrocarrier können so ungebremst in die Zellen eindringen. Jede Pflanze wird, wie in den einzelnen Versuchen im Detail beschrieben, aus verschiedenen Orientierungen mehrfach beschossen. So sollen Fehler durch unterschiedliche Partikelmengen pro individuellem Schuss vermieden und die Transformationseffizienz erhöht werden.

4.6.7 Transfer von Zellsuspensionskulturen auf Agar-Platten

Alle hier verwendeten Materialien und Geräte werden entweder mit EtOH abs. gründlich gereinigt oder autoklaviert. Der Zelltransfer findet unter der Sterilbank statt. Um die Zellen in der Partikelkanone beschießen zu können, müssen sie zuerst auf autoklavierte Rundfilter (45mm Ø) übertragen werden. Diese werden dann auf den vorbereiteten Agar-Platten platziert. Für den Zelltransfer wird ein eigens angefertigter Schöpflöffel verwendet (Jugold 2000), welcher eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Filter und eine gleichbleibende Menge Zellen pro Filter (ca. 1g) gewährleistet. Der Löffel wird auf eine Absaugvorrichtung gehalten und mittels eines Fußschalters Unterdruck angelegt wodurch das restliche Medium von den Zellen entfernt und die Zellen auf dem Filter fixiert. Der Rundfilter kann nun mit einer Pinzette aus dem Löffel gehoben und auf einer Agar-Platte abgelegt werden, auf der die Zellen während des Beschusses bis zur Auswertung inkubiert werden.

4.6.8 Inkubation nach Transformation

Die Inkubation der transformierten Zellen erfolgt bei RT und im Dauerdunkel. Die Inkubationsdauer ist sehr variabel und hängt von den Versuchszielen, den verwendeten Reportergenen und der Art der Zellkultur ab.

Die maximale Lebensdauer von *Beta vulgaris* Zellen auf dem Agar beträgt etwa 7 – 10 Tage, wobei die Zellmenge sichtlich zunimmt. Ab dem 5. Tag beginnen die Zellen sich jedoch langsam dunkel zu verfärben, was ein beginnendes Absterben einzelner Zellen anzeigt. Wenn eine Auswertung der transformierten Zellen mittels Glucuronidase- oder Luciferaseassays erfolgen soll, ist eine Inkubationsdauer von über zwei bis drei Tagen nach Transformation nicht sinnvoll, da erfahrungsgemäß die Homogenität der Werte mit der Dauer der Inkubation abnimmt. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich in der geringen Stabilität des Reportergens Luciferase zu finden. Wenn als Reportergene RFP oder GFP verwendet werden, um mikroskopisch Lokalisationsstudien durchzuführen, ist eine Inkubationsdauer von zwei bis drei Tagen nötig, um eine maximale Signalstärke beobachten zu können.

4.6.9 Herstellung der Proteinextrakte

Aus ballistisch transformierten pflanzlichen Materialien, die auf Ihre Luciferase- und Glucuronidaseaktivität untersucht werden sollen, müssen zuerst Proteinextrakte hergestellt werden, die in den entsprechenden Assays ausgewertet werden können.

Vorbereitungen für die Auswertung transformierter Zellsuspensionskultur:

Der 5x konzentrierte Lysepuffer („Cell Culture Lysis Reagent“ des „Luciferase Assay System“ der Firma Promega) wird 1 : 5 verdünnt (Endkonzentration Lysispuffer: 25mM Tris HCl, pH 7.8 mit H₃PO₄, 2mM CDTA, 2mM DTT, 10% Glycerin, 1% Triton) und verbleibt bis zum Aufschluss der Zellen bei RT. Pro auszuwertender Probe werden ein 1,5ml und ein 2ml Eppendorfgefäß bereitgestellt und beschriftet. Ebenso werden für die Luciferase- und die Glucuronidase-Aktivitätsbestimmung je ein beschriftetes Luminometerröhrchen vorbereitet. Das bei –80°C gelagerte Luciferase-Substrat wird auf RT gebracht.

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Zellsuspensionskultur werden die Zellen einer Agar-Platte (ca. 1g) mit einem Spatel in einen Mörser eingewogen und mit 0,5 Volumen Lysepuffer versetzt. In den Mörser wird etwas flüssiger Stickstoff gegeben und die Probe sofort für 45 Sekunden gemörsert. Die Zellen sollen beim Aufschluss nicht durchfrieren, sondern nur vor Erwärmung geschützt werden. Nach dem Aufschluss wird das Rohproteinextrakt in ein auf Eis vorgekühltes 2ml Eppendorfgefäß überführt. Für jede Probe wird ein frischer Mörser benutzt, um eine Verfälschung der Werte durch Vermischung der Lysate zu vermeiden. Nachdem alle Proben im Mörser aufgeschlossen wurden, werden die Rohproteinextrakte 5 Minuten bei 4°C und 16000g zentrifugiert. Dabei werden größere Zelltrümmer vom Proteinextrakt abgetrennt. 200µl des gelblich-klares Überstandes werden in ein frisches, eisgekühltes 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und bleiben bis zur Auswertung auf Eis.

Die für die Promotoraktivitätsstudien gemessenen Reportergenaktivitäten der Luciferase und β -Glucuronidase können aus dem gleichen Proteinextrakt ermittelt werden, da sich beide Enzyme beim Umsetzen ihrer Substrate nicht beeinflussen.

4.6.10 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde das „Luciferase Assay System“ der Firma Promega benutzt. Das verwendete Reporter-gen Luciferase, welches aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammt, liegt in den Zellen als monomeres Protein mit 62 kDa vor. Die Luciferase katalysiert mit Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor die Reaktion von Luciferin unter O_2 - und ATP-Verbrauch zu Oxyluciferin. Dabei wird AMP und PP_i , CO_2 und Licht mit einer Wellenlänge von 560nm freigesetzt (Bronstein et al., 1994). Die Menge des emittierten Lichts ist direkt proportional zur Menge der gebildeten Luciferase und wird im Luminometer (Lumat 9501, Bertold) 10 Sekunden lang gemessen. Dazu werden von jeder Probe 20 μ l Proteinextrakt in 5ml Luminometerröhrchen (SARSTEDT) vorgelegt, 100 μ l Reaktionspuffer (470 μ M Luciferin, 270 μ M Coenzym A, 530 μ M ATP, 20mM Tricine, 1.07mM $(MgCO_3Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O)$, 2.67mM $MgSO_4$, 0.1mM Na_2EDTA , 33.3mM DTT, pH 7.8) zugegeben und sofort die Lichtemission bestimmt. Das Temperaturoptimum der Luciferase liegt bei RT. Daher werden die Luminometerröhrchen nicht vorgekühlt. Die Menge des im Luminometer gemessenen Lichts wird in „relativen Lichteinheiten“ (RLU) angegeben. Die RLU-Werte werden als indirektes Maß zur vorhandenen Reporter-genmenge und somit zur Ermittlung der Promotorstärke verwendet.

4.6.11 β -Glucuronidase-Aktivitätsbestimmung

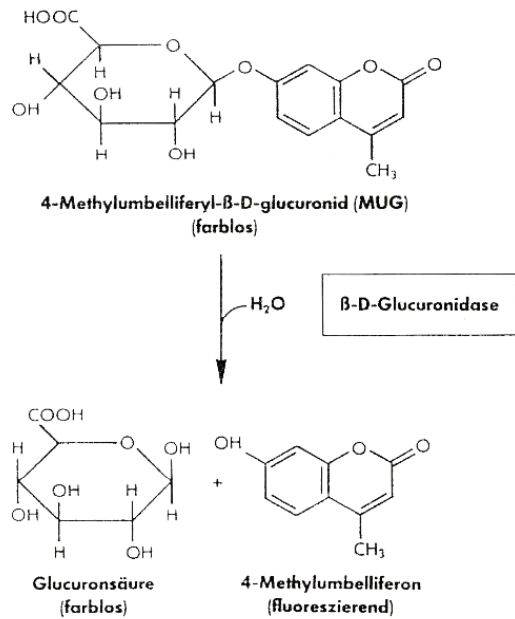
Die Aktivitäten des Reporter-Proteins β -Glucuronidase können entweder mit dem GUS-Light-Kit der Firma Tropix oder mit dem MUG-Assay bestimmt werden. Die qualitativen Aussagen sind vergleichbar.

4.6.11.1 Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität mit dem GUS-Light-Kit (Tropix)

Zu 20 μ l Proteinextrakt wurde in ein Luminometerröhrchen (SARSTEDT) 180 μ l Reaktionspuffer (GUS-Light-Kit Tropix) pipettiert und die Lösung eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Der Reaktionspuffer wird aus dem Substrat Glucuron (Chemiluminescent Substrate) und dem „GUS Reaction Buffer“ (0.1M Na-Phosphat-Puffer, pH 7, 10mM Na_2EDTA) im Verhältnis 1:100 frisch angesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden dem Ansatz 300 μ l Accelerator zugefügt und sofort die Lichtemission im Luminometer (Lumat 9501, Berthold) gemessen.

4.6.11.2 MUG-Assay

In diesem Assay wird durch das Enzym β -Glucuronidase die Reaktion des Substrats MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid) in 4-Methylumbelliferon katalysiert. 4-Methylumbelliferon absorbiert UV-Licht und emittiert daraufhin Licht von 366nm (Jefferson et al., 1987). Diese Fluoreszenz wird im Fluorometer gemessen. Die Intensität emittierten Lichts wird als indirektes Maß zur vorhandenen Menge β -Glucuronidase und somit zur Ermittlung der Transformationseffizienz beziehungsweise der Promotorstärke verwendet.



Durchführung:

In 2ml Eppendorfgefäßen werden 380 μ l Reaktionspuffer vorgelegt, mit 20 μ l des Proteinextrakts (s. o.) gemischt und zwischen 4 – 16 Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1,6ml 0,2M Na₂CO₃ abgestoppt und im Fluorometer (Jasco FP-777 Spectrofluorometer) vermessen (Einstellungen: Absorption (Anregungswellenlänge): 355nm, Emission: 450nm, Photomultiplier: „very low“).

Reaktionspuffer:

50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7
 10 mM β -Mercaptoethanol
 10 mM EDTA
 0.1% Triton
 0.1% SDS
 4 mg MUG/10 ml Reaktionspuffer

4.6.12 Messung der Blindwerte

Sowohl Luciferase- als auch Glucuronidase-Reportergene werden in den entsprechenden Assays nicht direkt sondern nur indirekt über ihre Aktivität nachgewiesen. Um eine Aussage über die durch die Transformation zusätzlich erreichte Enzymaktivität machen zu können, ist es nötig, für jede Versuchsbedingung sowohl für Luciferase als auch für Glucuronidase die entsprechenden Blindwerte von unbeschossenen, aber sonst gleich behandelten Zellen zu bestimmen. Diese Hintergrund-Aktivitäten (jeweils 3 Werte) werden gemittelt und von allen gemessenen Werten der einzelnen Proben abgezogen.

4.6.13 Auswertung der Messergebnisse und RLU-Abgleich

Die absolute Anzahl der bei jedem Schuss transformierten Zellen ist methodisch bedingt starken Schwankungen unterworfen. Um präzise Aussagen über die in den transformierten Zellen exprimierten Reportergene machen zu können, ist es notwendig, diese Schwankungen durch einen internen Abgleich zu extrapolieren (Rustighi et al., 2001). Wenn für ein Promotor-Luciferase-Konstrukt die Promotorstärke über die Menge der gebildeten Luciferase ermittelt werden soll, werden die Mikrocarrier gleichzeitig mit einem Standard-Konstrukt mit Glucuronidase als Reportergen unter der Kontrolle des verstärkten CaMV-35S-Promotors (pFF19G) beladen. Das durchschnittliche Verhältnis der Plasmide pro beladenem Mikrocarrier ist konstant. Die Messergebnisse sowohl der Luciferase-Aktivitäten als auch der Glucuronidase-Aktivitäten variieren mit der jeweiligen Transformationseffizienz jeder einzelnen Probe. Das Verhältnis dieser Werte ist jedoch innerhalb jeder Versuchsbedingung (rel.) konstant und gibt Aufschluss über die Promotoraktivität des zu vermessenden Konstruktes.

Berechnung der Werte:

Nach Abzug der gemittelten Blindwerte von den einzelnen RLU-Werten (Relative Licht Einheiten) werden die GUS-Faktoren der einzelnen Bedingungen errechnet. Dazu wird der Mittelwert aller GUS-Werte einer Bedingung gebildet und jeder einzelne GUS-Wert durch diesen Mittelwert geteilt. Das sich ergebende Verhältnis schwankt um den Wert 1 und gibt Auskunft, wie weit der einzelne gemessene GUS-Wert vom Mittelwert der jeweiligen Versuchsbedingung abweicht. Im nächsten Schritt werden alle Luciferase-Werte nach Abzug der LUC-Blindwerte durch ihren jeweils zugehörigen GUS-Faktor geteilt. Mit dieser Rechenoperation wird die methodisch bedingte Schwankung der einzelnen Transformationseffizienzen ausgeglichen. Man erkennt meist sofort eine größere Annäherung der Aktivitäten an einen gemeinsamen Mittelwert. Luciferase-Werte, die nach dem Abgleich negative sind, fallen aus der Berechnung heraus. Um Werte die selbst nach diesem Abgleich stark vom Mittelwert abweichen auszuschließen, wird innerhalb jeder Bedingung jeweils der höchste und niedrigste Luciferase-Wert verworfen. Weil aber die zu diesen Extremwerten zugehörigen GUS-Werte in die Errechnung des GUS-Faktors eingeflossen sind, wird die ganze Berechnung, die zu den abgeglichenen Luciferase-Werten führte, noch einmal ohne diese Extremwerte wiederholt. Nach dieser Berechnung wird aus den abgeglichenen Luciferase-Werten der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet.

Alle Messungen von Promotoraktivitäten durch die Ermittlung der Reportergenaktivitäten werden immer als Vergleich zu einem in seiner Aktivität bekannten oder unmodifizierten Promotor-Reportergen-Konstrukt bewertet. Es wurde beobachtet, dass die Transformationseffizienz einzelner Versuchsbedingungen schwanken kann. Es ist jedoch legitim, die Aktivitäten des zum Abgleich verwendeten Reportergens β -Glucuronidase unter den einzelnen Bedingungen (meist 10er Gruppen) als konstant anzunehmen, da immer die gleiche Menge Plasmid in die Beschüssen eingesetzt wurde. Dazu wird der nach dem Abzug der Extremwerte ermittelte GUS-Durchschnittswert jeder einzelnen Bedingung mit der GUS-Durchschnittsaktivität der Standard-Vergleichsbedingung ins Verhältnis gesetzt. Die abgeglichenen Luciferase-Durchschnittswerte samt ihren Standardabweichungen werden um die so ermittelte Abweichung korrigiert, in dem sie durch diesen Wert geteilt werden. Die so

errechneten Luciferase-Aktivitäten (in RLU) sind in den einzelnen Diagrammen der Versuche graphisch dargestellt.

4.7 Mikroskopischer GFP / RFP Nachweis transient transformierter Pflanzen

Zur subzellulären Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen wurde *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur transient mit 2µg Plasmidgemisch (1:1 pFF19-GFP-Fusionsproteine / pWen 143) verwendet. Die Inkubationszeit bis zur mikroskopischen Auswertung betrug 48h wobei die Zellen vor dem Anfertigen der Aufnahmen UN protoplastiert wurden.

Puffer zur Protoplastieren pflanzlicher Zellen:

0,5M CaCl₂ x 2H₂O, 9% Mannitol, 97,6 mg/100ml MES, pH 5,7, 2% Zellulase, 0,1% Driselase, 1% Pectinase.

Verwendete Computerprogramme: siehe Punkt 3.16

Verwendete Filter:

RFP-Filter: Excitation 525 – 550nm, Emission 585nm (Omega Optical)

GFP-Filter: Excitation 450 – 490nm, Emission 515nm (Omega Optical)

4.8 Gel-Retentionsanalyse oder EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

4.8.1 Funktionsweise

Um eine direkte Interaktion eines Proteins mit einer spezifischen DNA-Bindedomäne zu demonstrieren, kann eine Gel-Retentionsanalyse (EMSA) durchgeführt werden. Dabei wird eine entsprechende DNA-Sonde durch Verwendung von radioaktiven Isotopen oder durch Biotin markiert und unter geeigneten Reaktionsbedingungen (s.u.) mit nativen Proteinextrakten oder aufgereinigtem rekombinanten Protein inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wird anschließend auf einem nativen Polyacrylamid-Gel geringer Prozentigkeit (4,5 – 6% Acrylamid) im elektrischen Feld aufgetrennt. Erfolgt eine spezifische Bindereaktion des Proteins mit der Sonde, kann eine starke Retardation der Sonde beobachtet werden, da der Komplex aus Protein und Sonde wesentlich langsamer im Gel wandert als freie Sonde allein. Mit verschiedenen Sonden, Kompetitoren und unterschiedlichen Konzentrationen der Reaktionspartner lassen sich so in vitro viele Eigenschaften eines DNA-Bindeproteins untersuchen.

Verwendete Lösungen:

Reaktionspuffer: 10mM Tris HCl, 0.2mM MgCl₂, 40mM KCl, 1% Glycerin, 1mM DTT, pH 7.5

EMSA-Laufpuffer: 10mM Tris HCl, 0.2mM MgCl₂, 1% Glycerin, 1mM DTT, pH 7.5

Ladepuffer: 10mM Tris HCl, 0.2mM MgCl₂, 5% Glycerin, 1mM DTT, 0.01% Bromphenolblau, pH 7.5

Natives 5%tiges EMSA-PAA-Gel: 10mM Tris HCl, 16,6% (v/v) Acrylamidstammlösung (70% Wasser, 29.2% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid), 0.2mM MgCl₂, 1% Glycerin, 1mM DTT, pH 7.5

Die Lösungen sind frisch anzusetzen. Vor dem Gebrauch der Lösungen, insbesondere des Ladepuffers und des nativen EMSA PAA-Gels, vor der Zugabe von TEMED und APS, ist der pH Wert zu kontrollieren.

4.8.2 Ansetzen einer EMSA-Reaktion

Bevor die Bindereaktion angesetzt wird, sind alle Lösungen und das Gel vorzubereiten. Vor dem Beladen wird das Gel mindestens 30 Minuten mit 40 Volt vorgefahren und die Taschen wiederholt ausgespült. Die einzelnen Komponenten der Bindereaktion werden vor der Zugabe des Proteins auf Eis vorbereitet. Als unspezifischer Kompetitor wird jedem Reaktionsansatz 1µl poly dIdC (0,6µg/µl) und 1µl BSA (1µg/µl) zugesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug 30µl.

Zuletzt wird das Protein-Glycerin-Gemisch zugegeben und sofort vorsichtig mit der Reaktionslösung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 25 Minuten Inkubation bei RT werden die Proben nacheinander mit Ladepuffer versetzt und auf das mit 40 Volt laufende Gel geladen. Beim Beladen sind größere Scherkräfte unbedingt zu vermeiden. Zum Pipettieren werden deshalb abgeschnittene Spitzen verwendet. Um einen Zerfall des Binde-Komplexes zu minimieren, wurde der Zeitraum zwischen dem Vermengen der Bindereaktion mit dem Ladepuffer und dem Auftragen auf das Gel so kurz wie möglich gehalten und lag bei ca. 12 Sekunden. Sobald alle Proben geladen sind, wird die Spannung auf 75V erhöht. Innerhalb des Gels sind die Bindekomplexe vor weiterem Zerfall weitestgehend geschützt. Es wird spekuliert, dass die Gelmatrix mit den Reaktionspartnern interagiert und diese so stabilisiert (Fried et al., 1981).

Der Reaktionsansatz muss vor dem Beladen des Gels mindestens 1:5 mit Ladepuffer verdünnt werden, um die Ionenstärke herabzusetzen. Anderenfalls erhitzt sich die Probe durch die angelegte Spannung derart stark, dass der Bindekomplex aus Protein und Sonde zerfällt. Standardmäßig wurden alle Reaktionsansätze vor dem Auftragen auf das Gel 1:6 mit Ladepuffer verdünnt. Durch die Verdünnung des Reaktionsansatzes verringert sich zwangsläufig auch die Signalstärke. Der Verringerung der Signalstärke kann nicht durch ein Auftragen von mehr Probenvolumen auf dem Gel entgegengewirkt werden, da sich sonst keine klaren Signalbanden sondern nur großflächige, diffuse Schmiersignale ohne Aussagekraft bilden. Um trotzdem ausreichend detektierbare Mengen an Proben laden zu können, wurde die Gelstärke von 1 mm auf 3, beziehungsweise 5 mm erhöht. Dadurch kann bei gleicher Fokussierung der Banden eine drei- bis fünffach größere Probenmenge geladen werden. Durch das Blotten wird dann die in dem dickeren Gel verteilte Sonde auf der Membran aufkonzentriert und erreicht eine gut detektierbare Signalintensität. Nach ca. 3 – 4 Stunden hat die Lauffront mit dem Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht. Ungebundene Sonde von über 200 bp Länge ist in dieser Zeit bei einem 5%igen EMSA-Gel ungefähr bis zur Hälfte des Gels gelaufen. Um die Auftrennung weiter zu erhöhen, kann man das Gel noch über 1 Stunde länger fahren.

4.8.3 Kapillartransfer von biotinylierten DNA-Sonden nach EMSA

Während des Gellaufs werden die Vorbereitungen zum Transfer der biotinylierten Sonde aus dem Gel auf eine Duralon UV-Membran (500µg Nukleinsäure /cm² Bindekapazität, Stratagene) getroffen. In einer flachen Schale wird ein offenporiger Schwamm luftblasenfrei in 10x SSC getaucht. 12 Whatman-Papiere, eine Duralon UV-Membran und ein ca. 4 – 6cm dicker Stapel saugfähiges Papier (Papierhandtücher) werden in der Größe des Gels (ohne Taschen) zugeschnitten.

Nach Beendigung des Gellauf werden zunächst 8 Whatman-Papiere in 10x SSC gelegt und mittig auf den Schwamm platziert. Ein 5%iges Polyacrylamid-Gel besitzt nur eine sehr geringe Festigkeit. Um eine Beschädigung des Gels zu vermeiden, wird es mitsamt einer Glasplatte in die Schale mit dem Schwamm und den Whatman-Papieren überführt und dort schwimmend von der Glasplatte gelöst. Das Gel kann nun leicht über die Whatman-Papiere gebracht werden. Von dem 10x SSC-Puffer wird soviel abgesaugt, dass Schwamm und Oberfläche des Puffers die gleiche Höhe haben. Auf das Gel wird die mit 10x SSC benetzte Duralon UV-Membran und zwei ebenfalls in 10x SSC gelegte Whatman-Papiere aufgetragen. Es muss darauf geachtet werden, dass sich innerhalb des gesamten bisherigen Aufbaus keine Luftblasen befinden, da diese den Transfer lokal unterbinden würden. Nun folgen die restlichen (trockenen) Whatman-Papiere, der Stapel Papier und ein Gewicht, welches den Blotaufbau mit ca. 6 g/cm² beschwert. Nach einer Transferdauer von mindestens 10 Stunden kann der Blot abgebaut, die Membran von dem Gel abgehoben und mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben im UV-Statelinker[®]1800 (Stratagene) für 12 Sekunden gecrosslinked werden (Einstellung: Auto). Dabei werden auf der Membran befindliche Nukleinsäuren kovalent auf der Membran fixiert.

4.8.4 Detektion biotinylierter DNA-Sonden

Die gecrosslinkte Membran wird 30 Minuten in Blockpuffer (0.2 % (w/v) I-Block (Casein), 1x PBS, 0,5% (w/v) SDS) geschwenkt. Dem Blockpuffer wird dann HRP-Konjugat zugegeben (Amersham, Verdünnung 1: 10000) und weitere 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wird die Lösung 2 – 4 mal mit Waschpuffer (1x PBS, 0,5% (w/v) SDS) ersetzt. Die Membran wird auf einem Whatman-Papier von überschüssigem Waschpuffer befreit und mit dem HRP-Substrat (SuperSignal[®] ULTRA Chemiluminescent Substrate (34075) der Firma PIERCE) benetzt. Es ist dabei auf eine gleichmäßige Verteilung auf der Membran zu achten. Nach 5 Minuten wird der Membran auf einem Whatman-Papier soviel Substrat-Puffer entzogen bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen ist. Die Membran kann nun zwischen zwei Kunststofffolien eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm exponiert werden. Die Expositionsdauer kann stark variieren und beträgt zwischen 30 Sekunden und 4 Stunden. Bei einer zu geringen Signalintensität oder zu starker Hintergrundbildung kann die Membran wiederholt mit HRP-Konjugat hybridisiert und entsprechend schwächer oder intensiver gewaschen werden.

4.9 Überexpression rekombinanter Proteine

Ausgehend von einer Einzelkolonie Bakterien, transformiert mit dem entsprechenden, für das gewünschte rekombinante Protein codierenden Expressionsvektor, werden 0,5-2l LB-Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 1cm Schichtdicke kultiviert. Der verwendete Expressionsvektor pETM20 besitzt einen T7-Promotor mit einem Lac-Operatoresequenz und ist daher durch IPTG induzierbar. Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Induktion nach dem Herunterkühlen der Bakterienlösung auf ca. 16°C mit 0,5mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) Endkonzentration. Die Inkubationszeit nach der Induktion betrug zwischen 4 und 16h im Schüttelschrank (CH-4103 Infors AG) bei 160-180upm. Die Bakterien wurden anschließend bei 4°C 15 Minuten mit 3500g abzentrifugiert, in 1x EMSA Reaktionspuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert (s.o.) und das Pellet auf Eis bis zum Aufschluss in der French Press (siehe Punkt 3.3.3) höchstens 1h lang gelagert.

4.10 Proteinaufreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine kann durch Ni-Affinitätschromatographie erfolgen wenn das aufzureinigende Protein über ein sogenanntes His-Tag (sechs aufeinander folgende Histidine) in seiner Aminosäuresequenz verfügt. Zum Schutz der Proteine vor Abbau wurden alle Schritte bei 4°C und mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

Das mittels „French Press“ hergestellte Bakterienlysat (15-30ml) mit den aufzureinigenden nativen, Histidin markierten Proteinen wurde 15min bei 4000g abzentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen auf eine Säule mit Nickel-Agarose gegeben (1ml Nickel-Agarose/l Bakterienkultur). Die Säule wurde je 2x mit 10ml 10mM, 10ml 40mM und 10ml 70mM Imidazol in 1x EMSA-Reaktionspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 0,5ml Aliquots mit 250mM Imidazol in 1x EMSA-Reaktionspuffer. Die Eluate wurden 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

4.11 Denaturierende Polyacrylamid (PAA) Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gele werden in unterschiedlichen Konzentrationen und der damit einhergehenden Porengröße der Gelmatrix zur Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren verwendet. Zur Größenanalyse von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-PAA-Gele verwendet. Die Prozentigkeit der Trenngele lag je nach Größe der aufzutrennenden Proteine zwischen 9 bis 14% Acrylamid. Die Prozentigkeit des Sammelgele lag bei 4.5% Acrylamid.

Zuerst wird das Trenngel (exemplarisch für 15ml 13%iges SDS-PAA-Gel: 4,75ml H₂O, 3,75ml Trenngelpuffer (4xSDS-Trenngelpuffer: 1,5M Tris Base, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8), 6,5ml Rotiphorese[®] Gel 30 (Roth) nach Zugabe von 15 μ l TEMED und 100 μ l einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung (APS) zum Starten der Polymerisation in die Gelapparatur (Biometra) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol dient der Ausbildung einer gleichmäßigen und geraden Geloberfläche. Nach dem Aushärten wird das Isopropanol unter laufendem Wasser gründlich entfernt und das Sammelgel (5ml Sammelgel

mit 4,5% Acrylamid: 3ml H₂O, 1,25ml Sammelgelpuffer (4xSDS-Sammelgelpuffer: 0,5M Tris Base, 0,4% SDS, pH 6,8), 0,75ml Rotiphorese[®] Gel 30 (Roth) 10µl TEMED und 60µl 10% APS) aufgetragen. Zur Ausbildung der Taschen wird sofort ein Gelkamm in das Sammelgel getaucht. Nach vollständigem Aushärten des Sammelgels wird der Gelkamm entfernt, das Gel in die Gelapparatur eingespannt und die Taschen mit SDS-Laufpuffer (10xSDS-EP 200mM Glycin, 25mM Tris-Base, 1% (w/v) SDS) gespült.

Probenvorbereitung

Proteinhaltige Proben wurden mit Roti-Load 2 (4fach-Konz.) entsprechend den Angaben des Herstellers (Roth) für den Gellauf vorbereitet. Die Lösung wurde daraufhin für 5min bei 95°C denaturiert und unmittelbar danach auf ein PAA-Gel aufgetragen.

4.12 Bakterienstämme

***E.coli* XL1-Blue (Stratagene)**

recA1 (endA1, lac⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]. Dieser Bakterienstamm wurde hauptsächlich zur Amplifikation von Plasmiden eingesetzt.

***E.coli* Top10 (Invitrogen)**

F⁻ *mcrA Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)(φ80dlacZΔ M15) ΔlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*.

***E.coli* K12 GM2163 (NEB)**

F⁻ *ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA5 mtl-1 mcrB1 hsdR2*

Dieser Bakterienstamm ist Dam1- und Dcm1-defizient und wird vom Hersteller ausdrücklich zur Gewinnung unmethylierter Plasmid-DNA empfohlen.

***E.coli* Rosetta[™] (Novagen)**

BL21 *lacZY*

Dieser Bakterienstamm wird zur Expression von eukaryotischen Proteinen genutzt in deren DNA-Sequenz seltene Codons für entsprechende Aminosäuren vorkommen. Die entsprechenden tRNA codierenden Sequenzen liegen auf dem Plasmid pACY184 welches ein Chloramphenicolresistenzgen trägt.

4.13 DNA-Vektoren

pBluescript II SK⁺ (Amp^r) (Stratagene)

pGEM-T (Amp^r) (Promega)
(siehe Punkt 3.4.12)

pCLN (Amp^r)

Expressionsvektor mit dem 35S „cauliflower mosaic virus“-Promotor und dem Reporter gen Luciferase (*Photinus pyralis*, de Wet et al., 1987) sowie die Nos 3'-Polyadenylierungsregion des Nopalin Synthase Gens. Für die Konstruktion des pCLN-Vektors (pCaMVLN) wurde ein 1.8kb cDNA Fragment (5'-*Bam*HI – 3'*Bg*II) der kodierenden Region des Luciferase (Accession Nr: M15077) zwischen den CaMV 35S-Promotor und die Nos-Polyadenylierungsregion kloniert (Fromm et al., 1986). Der 2.7kb Vektoranteil (pUCPiAN7) enthält das Ampicillinresistenzgen.

pFF19 (Amp^r)

Dieser Vektor, mit dem 35S „cauliflower mosaic virus“-Promotor wurde zur Expression von Genprodukten in Pflanzen konstruiert (Timmermans et al., 1990). Der Vektor besitzt eine verdoppelte „Enhancer“-Sequenz (Benfey et al., 1989) was eine 10-fache Verstärkung der transkriptionellen Aktivität zur Folge hat (Key et al., 1987). Weiterhin besitzt der Vektor das CaMV 35S Polyadenylierungssignal. (MCS, siehe Anhang)

pFF19-GFP (Amp^r)

pFF19-Vektor (s.o.) zur cytosolischen Expression der Reporter gens GFP. Die codierende Sequenz für GFP wurde (5'*Kpn*I, 3'*Pst*I) zwischen den verstärkten CaMV 35S-Promotor und das CaMV 35S Polyadenylierungssignal kloniert.

pFF19G (Amp^r)

pFF19-Vektor (s.o.) zur Expression des Reporter gens β -Glucuronidase (aus *E.coli*, Jefferson et al., 1986, 1987a,b, 1989). Die codierende Sequenz für das Gen β -Glucuronidase wurde zwischen den verstärkten CaMV 35S-Promotor und das CaMV 35S Polyadenylierungssignal kloniert.

pBVA c1-LUC (Amp^r)

pBlueskript-Vektor mit dem Y11037-Promotor der vakuolären ATPase Untereinheit c1 aus *Beta vulgaris* und dem Reporter gen Luciferase. (Viereck, 2000)

pBVP1 (Amp^r)

pBlueskript-Vektor mit dem Promotor der vakuolären PPase Isoform1 L32792 aus *Beta vulgaris*. Der 1,7kb lange Promotor wurde *Bam*HI / blunt vor das Reporter gen Luciferase kloniert (Hong, unveröffentlicht).

pWEN143RFP (Amp^r)

Pflanzlicher Expressionsvektor codierend für ein kernlokalisiertes RFP-Histon-Fusionsprotein. (Freundliche Gabe von Benedikt Kost.)

pPAC-GAGA (Tet^r)

Vektor mit dem ORF des Transkriptionsfaktors GAGA. (Freundliche Gabe von Prof. Kornberg University of California, San Francisco.)

pETM40 (Amp^r)

Vektor zur Überexpression von Proteinen in *E.coli* siehe Anhang. (Freundliche Gabe des EMBL Heidelberg.)

pETM20 (Amp^r)

Vektor zur Überexpression von Proteinen in *E.col* siehe Anhang *i*. (Freundliche Gabe des EMBL Heidelberg.)

Klonierung von pFF19-GFP-AtBR1

Die Amplifikation von GFP aus pFF19-GFP bei gleichzeitigem Einfügen von *Xba*I-Schnittstellen und Mutation des Stop-Codons TAA durch folgende Primer:

GFPsense	5' GTCGACCC <u>TCTAGA</u> TGGGTGAGCAAGGGCG 3'
GFPantisense	5' GCTTGCAT <u>TCTAGA</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGC 3'

Tabelle 3.13a: Verwendete Primer zur Amplifikation von GFP aus pFF19-GFP. Die inserierten *Xba*I-Schnittstellen sind unterstrichen und das mutierte Stoppcodon grau unterlegt.

Das GFP-Amplifikat von 742bp Länge wurde mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) gereinigt, *Xba*I verdaut, erneut gereinigt und „in frame“ in den mit *Xba*I geschnittenen und dephosphorylierten pFF19AtBR1-Vektor über die *Xba*I-Site zwischen dem *CaMV*35S-Promotor und dem AtBR1-ORF ligiert. Die Orientierung des GFP-Amplifikates mehrerer Klone wurde durch Particle Bombardment funktional ermittelt und anschließend der Übergang von GFP zu AtBR1 ansequenziert. Der entstandene ORF codiert für das Fusionsprotein GFP:AtBR1.

Klonierung von pFF19-AtBR1 und pFF19-AtBR2

AtBR1 sense	5' <u>C</u> <u>TCTAGA</u> ATCTTTGAAATGGATGACG 3'
antisense	5' <u>ACTGCAG</u> ACAGAATTTTTGAAAAGGTCAC 3'
AtBR2 sense	5' CT <u>TCTAGA</u> GCCGTTTAGACCAAACCC 3'
antisense	5' <u>GCTGCAG</u> TTTTGTTGTTATATACACG 3'

Tabelle 3.13b: Verwendeten Primer zur Amplifizierung der codierenden Sequenzen AtBR1 und AtBR2 aus genomischer *A. thaliana*-DNA (über pGEM-T) in den Expressionsvektor pFF19. Die Oligonukleotide wurden so entworfen, dass die sense-Primer eine *Xba*I- und die antisense-Primer eine *Pst*I-Schnittstelle beinhalten. Die entsprechenden Schnittstellen sind unterstrichen.

Die Amplifikate wurden in pGEM-T kloniert, sequenziert und in den Expressionsvektor pFF19 über die Schnittstellen *Xba*I und *Pst*I umkloniert.

Klonierung von pETM20-Trx-AtBR1, pETM20-Trx-AtBR2 und pETM20-Trx-AtBR4

AtBR1 sense	5' TTG <u>CCATGG</u> ATGACGATGGGTTTCG 3'
antisense	5' <u>ACTGCAG</u> ACAGAATTTTGGAAAAGGTCAC 3'
AtBR2 sense	5' CAT <u>CCATGG</u> ACGATGATGGATTTTCGC 3'
antisense	5' <u>GCTGCAG</u> TTTTGTTGTTATATACACG 3'
AtBR4 sense	5' TA <u>CCATGG</u> AAGAAGATGGATTGAATAATCG3'
antisense	5' <u>GCTGCAG</u> ACTTTTTTATTTATCTGATGG 3'

Tabelle 3.13c: Verwendete Primer zur Klonierung der AtBR-codierenden Sequenzen AtBR1, AtBR2 und AtBR4 aus genomischer *A. thaliana*-DNA in den Expressionsvektor pETM40. Die Oligonukleotide wurden so entworfen, dass alle sense-Primer eine *NcoI*- und alle antisense-Primer eine *PstI*-Schnittstelle beinhalten. Die Schnittstellen sind unterstrichen.

Die AtBR1-, AtBR2- und AtBR4-Amplifikate wurden in den pGEM-T-Vektor inseriert und anschließend über die Schnittstellen 3'*NcoI* und 5'*PstI* in den ebenso geschnittenen Vektor pETM40 (anstelle des MAD-Gens) ligiert. Die AtBR-Inserts wurden aus dem pETM40-Vektor 3'*NcoI*, 5'*KpnI* ausgeschnitten und in den ebenso verdauten pETM20-Vektor anstelle des RAGE-Gens ligiert. Im pETM20-Vektor liegen die AtBR-codierenden Sequenzen direkt im Anschluss an einen codierenden Bereich für Thioredoxin und können zusammen mit diesem als Thioredoxin-AtBR-Fusionsprotein (Trx-AtBR) exprimiert werden. Die resultierenden pETM20-Trx-AtBR1, pETM20-Trx-AtBR2 und pETM20-Trx-AtBR4 Plasmide wurden in den Bakterienstamm Rosetta transformiert.

Klonierung von pFF19-GAGA

Der GAGA-Transkriptionsfaktor ist ein Protein aus *Drosophila melanogaster*, welches an der strukturellen Organisation der DNA im Zellkern und der Transkriptionsregulation einzelner Gene beteiligt ist (siehe Einleitung). Der Vektor pPAC-GAGA war eine freundliche Gabe von Prof. Kornberg University of California, San Francisco.

Die für GAGA codierende Sequenz wurde daraus mit den Primern GAGA1 sense und GAGA2 antisense amplifiziert und in pGEM-T kloniert. Das Insert wurde durch einen *KpnI*, *HindIII* Doppelverdau freigesetzt und mit dem *KpnI*, *PstI* geschnittenen pFF19-Vektor ligiert. Die Zirkularisierung erfolgte über ein doppelsträngiges Linker-Oligonukleotid mit *HindIII*- und *PstI*-Überhängen. Der pFF19-Vektor besitzt den CaMV 35S-Promotor, der durch eine verdoppelte Enhancer-Region eine starke Transkription des GAGA-Faktors gewährleistet.

GAGA1 s.	5' CGTCGTGTCCCGGGTACCTAGCAGCGAATACGCTAGCAACGCT 3'
GAGA2 as.	5' GCGTTGGAAAGCTTGAAGGCTCGGCTGG 3'
Linker s.	5' TCGAATCGATTCGAGTTCGATTCGTAGCTGGACGT 3'
Linker as.	5' TCGAATCGATTCGAGTTCGATTCGTAGCTGGACGT 3'

Tabelle 3.13d: Verwendete Primer zur Amplifikation der für GAGA codierenden Sequenz aus pPAC-GAGA, beziehungsweise den zur Zirkularisierung des pFF19-GAGA-Vektors benutzten Linkeroligonukleotiden.

Klonierung der Promotor-LUC-Konstrukte mit mutierten Polypyrimidin-Boxen

Pr.1 sense	5' GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGG	3'
Pr.2 antis.	5' GAAGGATGATCAGACAGTAAGTTTCTTGGATGGGACCC	3'
Pr.3 sense	5' CTCTCTGATCATCGTTCATAAAAAACCTTCTCACTG	3'
Pr.4 antis.	5' GCTTGTGAGGCGCGCCAAAAGACAGCTGAGTGAATAGAGATC	3'
Pr.5 sense	5' TTTGGCGCGCCTCACAAGCAGAGAAAAACAAAAAAACTC	3'
Pr.6 antis.	5' CCTCTAGAGGATAGAATGGCGCC	3'

Tabelle 3.13e: Verwendete Primer zur Mutation der Polypyrimidin-Boxen 1 und 2.

Um die einzelnen Teilsequenzen des c1-Promotors klonieren zu können, wurden über Primer Schnittstellen in die Polypyrimidin-Boxen eingefügt (Box1: *BclI*, Box2: *AscI*). Weiterhin wurden durch den Austausch jedes zweiten Cytosin durch ein Guanin die restlichen Polypyrimidin-Box-Sequenzbereiche unterbrochen. Die modifizierten Basenabfolgen wurden mit bereits bekannten Transfaktorbindemotiven verglichen (Computerprogramm: PLACE), um die Erzeugung neuer potentieller Bindemotive zu vermeiden.

Konstrukt A-BC mit modifizierter Polypyrimidin-Box1

Zur Inaktivierung der Polypyrimidin-Box1 wurde pBVA c1-LUC als Template in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Zuerst wurde das Fragment A mit dem Primern 1 und 2 amplifiziert. In der zweiten PCR-Reaktion wurde das Amplifikat BC mit den Primern 3 und 6 hergestellt. Die PCR-Produkte wurden in pGEM-T kloniert und sequenziert. Dann wurden die Elemente mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen freigesetzt (Element A: *BamHI*, *BclI*, Element BC: *BclI*, *NarI*), miteinander ligiert und in den pBlueSK⁺-LUC-Vektor (*BamHI* und *NarI* geschnitten) kloniert.

Konstrukt AB-C mit modifizierter Polypyrimidin-Box2

Die Klonierung des Konstruktes AB-C erfolgte entsprechend, jedoch wurde hierbei in die Polypyrimidin-Box2 eine *AscI*-Schnittstelle eingefügt. Die Amplifikate AB (Primer 1 und 4) und C (Primer 5 und 6) wurden ebenfalls erst in pGEM-T kloniert, sequenziert, ausgeschnitten (Element AB: *BamHI*, *AscI*, Element C: *AscI*, *NarI*), miteinander ligiert und dann in den geschnittenen pBlueSK⁺-LUC-Vektor (*BamHI*, *NarI*) kloniert.

Die resultierenden Konstrukte A-BC und AB-C wurden in ihrer gesamten Promotor- und 5'UTR-Sequenz sequenziert und weisen bis auf die beabsichtigten mutierten Bereiche keine weiteren Veränderungen gegenüber der Originalsequenz auf.

Klonierung der QC-Konstrukte

Primer QT2Cs	5' CCAAGAAACTCTCTCTCCTCCTCC 3'
Primer QT2Ca	5' GGAGGAGGAGAGAGAGAGTTTCTTGG 3'
Primer QT2As	5' CCAAGAAACTATCTCTCTCCTCCTCC 3'
Primer QT2Aa	5' GGAGGAGGAGAGAGATAGTTTCTTGG 3'
Primer GT8As	5' CCAAGAAACTTTCTCTCTCCTCCACCTTCATAAAAAAACC 3'
Primer GT8Aa	5' GGTTTTTTTTATGAAGGTGGAGGAGAGAGAAAGTTTCTTGG 3'

Tabelle 3.13f: Zur Herstellung der QC-Konstrukte verwendeten Primer zum Austausch einzelner Nukleotide innerhalb der Polypyrimidin-Box1 des c1-Promotors mit dem Quick Change Kit (Stratagene). Die markierten Basen sind die mutierten Thyminde (in sense) beziehungsweise Adenine (in antisense) innerhalb der Polypyrimidin-Box1 des c1-Promotors.

Klonierung von SIPV-AtBR3

AtBR3silentsense	5' AAACCGGTTAAGAAGAGTGTTG 3'
AtBR3silentantisense	5' TTATCTGATCGTGACAAACTTATTGG 3'

Tabelle 3.14h: Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation der C-terminalen Domäne von AtBR3 aus dem Vektor pFF19-AtBR3.

Das resultierende PCR-Amplifikat von 345bp Länge der C-terminalen codierenden Sequenz des Gens AtBR3 wurde gebluntet, mit dem QIAquickTM PCR Purification Kit gereinigt und in den *Sma*I-linearisierten und dephospholylierten SIPV-Vektor (unveröffentlicht, siehe 4.11.1) kloniert.

4.14 Herstellung biotinmarkierter Sonden zur Gelretardationsanalyse (EMSA)

Die verwendeten Sonden sind PCR-Teil-Amplifikate des pBVA c1-Promotors, oder des modifizierten c1-Promotor-Konstruktes A-BC. Die Bezeichnung, Länge und Aufbau der verwendeten Sonden geht aus der Tabelle 4.10 hervor.

3fachBio-Primer1 sense (Sonden: c1, Box1, 0-Sonde)	5' C ^b GTGTTATGTT ^b GGGTCCCAT ^b CCAAG 3'
3fachBio-Primer2 antisense (Sonden: c1, Box2)	5' G ^b GTACAACAAT ^b GGCGATTT ^b CAACG 3'
1fachBio-Primer-kurz sense (Sonden: Box1, 0-Sonde)	5' G ^b AGATCAATAATTTATCGGG 3'
1fachBio-Primer-kurz as. (Sonde: Box2)	5' C ^b CCATCCAGAAAAAATCCCG 3'

Tabelle 3.14a: Zur Herstellung der Sonden verwendete biotinmarkierte Primer. Die mit Biotin markierten Nukleotide der Primer sind markiert (^b).

4.15 RNAi-silencing

Zum selektiven Silencing einzelner Genprodukte in *Arabidopsis thaliana* wurde ein „silencing inducing plant virus“ Konstrukt (SIPV, unveröffentlicht. Siehe Abb. 4.11.1) verwendet (Punkt 3.14h). Die Infektion der *Arabidopsis*-Pflanzen mit einzelsträngiger SIPV-RNA erfolgte via Particle Bombardment. Die RNA wurde mit dem Megascript Kit (Ambion) der Anleitung des Herstellers folgend hergestellt und pro Schuss wurden je 1.5µg RNA eingesetzt. Die Pflanzen wurden auf Sand angezogen und im Alter von vier Wochen (6 – 12 Blätter) unter Wasser vorsichtig vom Substrat befreit und sowohl von oben, als auch von unten in der Partikelkanone beschossen. Bei den Kontrollpflanzen wurde mit unbeladenen Mikrocarriern ebenso verfahren. Anschließend wurden die Pflanzen wieder in Sand gepflanzt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer bei Temperaturen von 24°C am Tag und 18°C in der Nacht. Die Lichtintensität betrug ca. 180µE und die Tageslänge lag bei acht Stunden/Tag. Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 60-75%.

Es wurden pro dargestellten Wert (Abb. 4.11.4) die Blätter von 10 *Arabidopsis*-Pflanzen von oben und unten beschossen und ausgewertet. Pro Schuss wurden 2µg c1- beziehungsweise PPase1-Promotor-LUC-Konstrukt und 1µg pFF19-GFP eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aller gemessenen Luciferase-Aktivitäten einer Bedingung nach Abzug der beiden jeweils größten und kleinsten Werte. Die große Streuung der Werte ist methodisch bedingt hoch, da jeder gemessene Wert von einer anderen Pflanze stammt. Der Abgleich der Werte untereinander erfolgte über das Verhältnis FG zur verwendeten Menge Lysepuffer: Pro Gramm aufzuschließendes Pflanzenmaterial wurde 1ml Lysepuffer eingesetzt. Der Aufschluss der Gewebe zur Proteinextraktion erfolgte im Mörser mit einer Spatelspitze Seesand.

4.16 Verwendete Computerprogramme

Diese Arbeit wurde mit den Programmen unter Office 2000 der Firma Microsoft geschrieben. Zur Erstellung der dreidimensionalen Struktur des c1-Promotors wurde das Programm RasMol Version 2.6 verwendet.

Das Programm Clone Manager 5 (Version 5.20) wurde zur Erstellung der Klonierungsstrategien benutzt.

Die mikroskopische Bilddokumentation wurde über eine Digitalkamera mit dem Bildverarbeitungsprogramm analysIS (Soft Imaging System) durchgeführt.

Die weitere Bildverarbeitung erfolgte mit CorelDRAW 9 und Corel PHOTO-PAINT 9.

Mit diesen Programmen wurden auch alle anderen Grafiken und Bilder erstellt beziehungsweise bearbeitet.

5 Ergebnisse

Polypyrimidin-Motive sind häufig in den Promotoren und 5'UTR-Bereichen von Genen lokalisiert. Aufbauend auf dem BVA c1-Promotor mit je einer Polypyrimidin-Box in der Promotor- und der 5'UTR-Sequenz wird durch Mutation dieser Boxen deren elementare Bedeutung für die Gesamt-Promotor-Aktivität im Particle Bombardment demonstriert. Eine unterschiedliche dam-Methylierung der im Particle Bombardment verwendeten Plasmide oder die Ausbildung von Knicken in der Promotor-Sequenz des c1-Promotors wurden untersucht, sind für dessen Aktivität aber nicht ausschlaggebend. Der Versuch, für die c1-Promotoraktivität relevante Motive durch eine spezifische in vivo Konkurrenz mit inaktivierten c1-Promotoren oder Polypyrimidin-Box Oligonukleotiden einzugrenzen, blieb ohne Effekt. Ein Particle Bombardment eines Expressionsvektors für den GAGA-Transkriptionsfaktor aus *Drosophila melanogaster* mit einem c1-Promotor-Luciferase-Konstrukt in *Beta*-Zellsuspensionskultur hat keinen verstärkenden Einfluss auf die Promotoraktivität des c1-Promotors. Dagegen kann mit dem BBR-homologen Transkriptionsfaktor AtBR1 aus *Arabidopsis thaliana* im Cobombardment eine spezifische Aktivierung der c1-Promotoraktivität erreicht werden.

Eine subzelluläre Lokalisation des AtBR1-Transkriptionsfaktors als Fusionsprotein mit GFP zeigt eine spezifische Akkumulation im Kern transient transformierter *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur. Nach erfolgreicher Überexpression des Transkriptionsfaktors AtBR4 (und mit geringerer Qualität auch AtBR1) als Fusionsprotein mit Thioredoxin kann im EMSA eine spezifische Wechselwirkung mit den im c1-Promotor lokalisierten Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 nachgewiesen werden.

Erste Versuche zum gleichzeitigen Silencing der AtBR-Transkriptionsfaktoren 1, 2 und 3 in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen durch ein viral induziertes RNA Silencing zeigen einen negativen Einfluss auf die c1-Promotoraktivität.

5.1 Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 im Promotor und der 5'UTR des BVA c1 Gens

Im Promotor des V-ATPase c1-Gens liegen unmittelbar upstream der TATA-Box und innerhalb der 5'UTR je eine Polypyrimidin-Box.

Die Polypyrimidin-Box1 besteht aus zehn Thyminen und elf Cytosinen und ist von Adeninen flankiert. Die Polypyrimidin-Box2 besteht aus zehn Thyminen und zehn Cytosinen und wird ebenfalls von Adeninen begrenzt. Innerhalb beider Boxen liegen trotz einem ausgeglichenen Verhältnis der Pyrimidin-Basen die Nukleotide nicht alternierend vor. Obwohl beide Boxen insgesamt eine unterschiedliche Länge und Sequenz aufweisen kommt in beiden das Motiv TTTCTCTCCTC vor (Tabelle 4.3). Der Abstand der Boxen voneinander beträgt 68 Basenpaare.

-160		-111
TTCCATCTGAGCCCATGAGATAAAATTAAGGAATACAAACACAAAACCTCA		
-110		-61
ACAACCAACCCGAAATATCGATCGGACTTGTTAGCACGTGTTATGTTGGG		
-60	Polypyrimidin-Box1	TATA-Box -11
TCCCATCCAAGAAA CTTTCTCTCTCCTCCTCCTTCATAAAAAAACCTTCT		
-10	+1 Transkriptionsstart	+40
CACTGATCCCATCCAGAAAAATCCCGATAAATTATTGATCTCTATTAC		
+41	Polypyrimidin-Box2	+90
TCACCTCTCTTTTCTCTCTCCTCACAAAGCAGAGAAAAACAAAAAAACTC		
+91		+140
TCAAATAATCACGTTGAAATCGCCATTGTTGTACCTCTTCTTTTCAGATCC		
+141	ORF-Luciferase	+190
GTCGATCTGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAATGGAAGACGCCAAAAACAT		

Abb.4.1a: Teilsequenz des pBVA c1-Promotors mit Polypyrimidin-Box1 und 2, TATA-Box und dem Transkriptionsstart, kloniert vor das Reporter-gen Luciferase.

Herstellung von modifizierten c1-Promotor-Konstrukten A-BC und AB-C: Mutation der Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 des pBVA c1-Promotors

Zur Aufklärung der Bedeutung der Polypyrimidin-Motive für die Promotoraktivität des BVA c1-Promotors wurden zwei Konstrukte kloniert, in denen jeweils eine Box unter Beibehaltung der Gesamtlänge mutiert wurde. Dazu wurden einzelne Teilsequenzen mittels modifizierter Primer amplifiziert (Tabelle: 3.13e) und dann zurück in den pBlueSK⁺-Vektor vor das Reporter-gen Luciferase kloniert. Die Konstrukte bestehen aus den drei Promotorelementen (Bezeichnung A, B, C), dem Reporter-gen Luciferase und dem Vektor pBlueSK⁺ (Abb. 4.1b).

Konstrukt A-BC mit modifizierter Polypyrimidin-Box1

Zur Inaktivierung der Polypyrimidin-Box1 wurde pBVA c1-LUC als Template in zwei PCR-Reaktionen eingesetzt. Es wurde jeweils eine Teilsequenz ausgehend von der Polypyrimidin-Box1 amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden innerhalb der Polypyrimidin-Box1 einzelne Basen mutiert und eine BclI-Schnittstelle eingefügt.

Polypyrimidin-Box1 unmodifiziert	CTTTCTCTCTCCTCCTCCTTC
Polypyrimidin-Box1 nach Mutation (mit BclI-site)	CTTACTGTCTGATCATCCTTC

Tabelle 4.1a: Polypyrimidin-Box1 vor und nach der Mutierung. Die ausgetauschten Basen sind grau unterlegt und die eingefügte BclI-Schnittstelle unterstrichen.

Konstrukt AB-C mit modifizierter Polypyrimidin-Box2

Die Klonierung des Konstruktes AB-C erfolgte entsprechend, jedoch wurde hierbei in die Polypyrimidin-Box2 eine *AscI*-Schnittstelle eingefügt.

Polypyrimidin-Box2 unmodifiziert	CCTCTCTTTTCTCTCCTC
Polypyrimidin-Box2 nach Mutation (mit <i>AscI</i> -site)	<u>GCTG</u> TCTTTT <u>GGCG</u> CCTC

Tabelle 4.1b: Polypyrimidin-Box2 vor und nach der Mutierung. Die ausgetauschten Basen sind grau unterlegt und die eingefügte *AscI*-Schnittstelle unterstrichen.

Der Austausch von Cytosin durch Guanin erhält den ursprünglichen GC-Gehalt und vermeidet so eine lokale Schmelzpunktveränderung der DNA. Trotz der Mutation der Polypyrimidin-Boxen entsprechen die Abstände der einzelnen Promotor- und 5'UTR-Sequenzelemente der des ursprünglichen c1-Promotor-LUC-Konstruktes.

Die resultierenden Konstrukte A-BC und AB-C wurden in ihrer gesamten Promotor- und 5'UTR-Sequenz sequenziert und weisen bis auf die beabsichtigten mutierten Bereiche keine weiteren Veränderungen gegenüber der Originalsequenz auf.

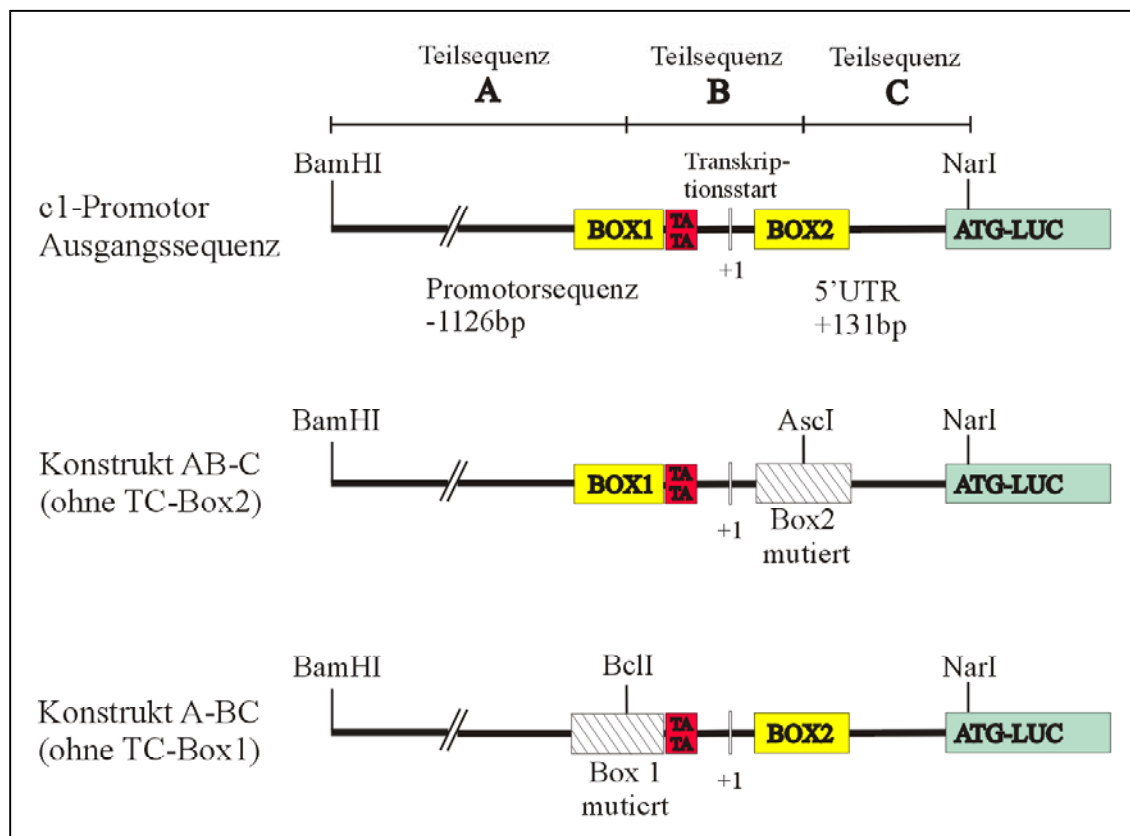


Abb. 4.1b: Schematische Übersicht der im Cobombardment verwendeten modifizierten pBVA c1-LUC-Konstrukte A-BC, beziehungsweise AB-C im Vergleich zu pBVA c1-LUC. Die inaktivierten Polypyrimidin-Boxen sind schraffiert dargestellt. **Element A:** gesamter c1-Promotor bis Polypyrimidin-Box1. **Element B:** Sequenz zwischen den beiden Polypyrimidin-Boxen. **Element C:** Bereich nach der Polypyrimidin-Box2 bis in das Reportergen Luciferase hinein.

5.2 Die Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors sind entscheidend für dessen Aktivität

Die Mutation der Polypyrimidin-Boxen des pBVA c1-LUC führt zu drastischen Promotor-Aktivitätsverlusten. Die Ergebnisse der ballistischen Transformation mit dem Konstrukt AB-C mit einer Mutation der Polypyrimidin-Box2 zeigen einen Einbruch der Luciferase-Expression auf 63% des ursprünglichen c1-Promotor-LUC Konstrukts.

Die Inaktivierung der Polypyrimidin-Box 1 unmittelbar vor der TATA-Box resultiert in einem fast vollständigen Aktivitätsverlust auf unter 5% des unmodifizierten Ausgangskonstrukts mit beiden intakten Polypyrimidin-Boxen. Dieser Versuch wurde drei mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Dieser Befund unterstreicht die zentrale Bedeutung dieser Sequenz-Motive für die Aktivität des konstitutiven c1-Promotors. Insbesondere die Polypyrimidin-Box1 rückt damit ins Zentrum weiterer Untersuchungen.

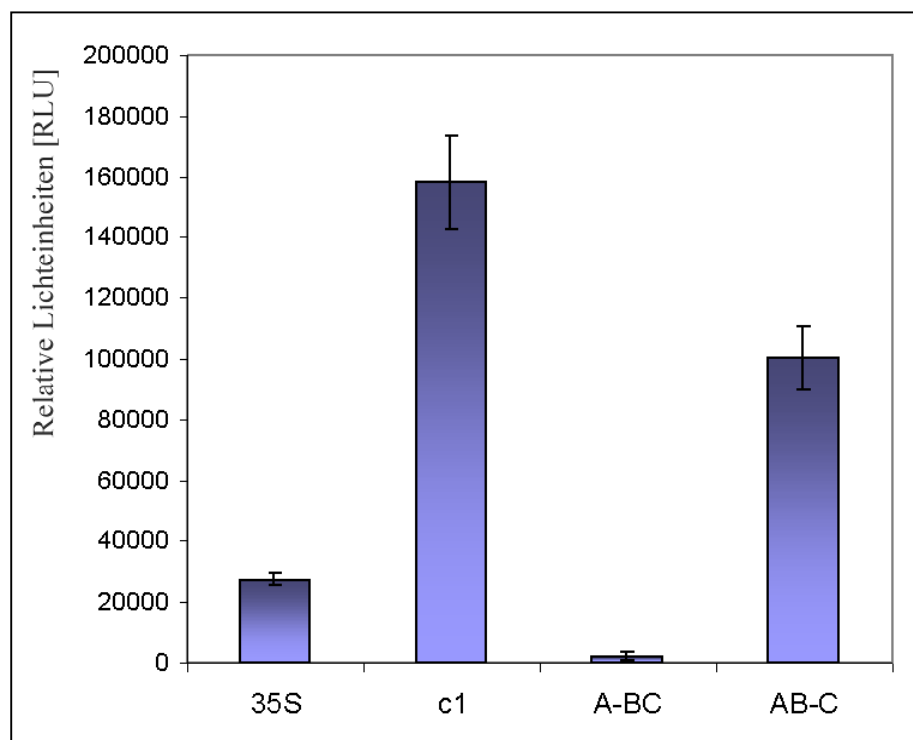


Abb. 4.2: Ballistische Transformation von *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur mit 0,8 µg Plasmid bestehend aus 0,5 µg Promotor-LUC-Konstrukt und 0,3 µg pFF19G pro Schuss. Aktivitätsmessung 22,5 Stunden nach Transformation, acht Messungen pro Bedingung. Vergleich der Promotoraktivitäten der Polypyrimidin-Box inaktivierten Konstrukte A-BC (ohne Box1) und AB-C (ohne Box2) mit dem unmodifizierten BVA c1-Promotor. Das CaMV35S-Promotor-LUC-Konstrukt (pCLN) dient zur Orientierung der erhaltenen Luciferase-Aktivitäten.

5.3 Einzelbasenmutation der Polypyrimidin-Box1 des pBVA c1-Promoters kann zu starken Aktivitätsverlusten führen

Um zu untersuchen, ob allein ein Polypyrimidin-Bereich an den entsprechenden Stellen im Promotor unabhängig seiner internen Sequenz funktional ist oder ob distinkte Sequenzmotive für die Gesamtpromotoraktivität verantwortlich sind, sollen einzelne Basen in der Polypyrimidin-Box1 mutiert werden.

Es wurden drei Polypyrimidin-Box1-Mutationen erzeugt:

In zwei Konstrukten wurde je ein Thymin durch ein Adenin ersetzt (QT2A, QT8A), wodurch die Polypyrimidin-Sequenz der Box unterbrochen wird.

Dadurch sollten die innerhalb der Polypyrimidin-Box1 befindlichen Teilsequenzen CTTTC beziehungsweise CCTCC auf ihre Relevanz bezüglich der Funktionalität innerhalb der Polypyrimidin-Box1 hin untersucht werden.

In einem weiteren Konstrukt (QT2C) wurde ein einzelnes Thymin durch Cytosin ausgetauscht. Damit bleibt der „Polypyrimidin-Charakter“ der Polypyrimidin-Box1 erhalten, jedoch wird der lokale Schmelzpunkt durch das Cytosin geringfügig erhöht. In diesem Konstrukt führt die Modifizierung zu einer Erweiterung alternierender CT-Basenabfolgen von (CT)₃ auf (CT)₅.

Folgende Modifikationen wurden bei dem c1-Promotor innerhalb der Polypyrimidin-Box1 mittels des QuickChange-Kits (Stratagene) erzeugt.

Bezeichnung	Sequenz
Polypyrimidin-Box1 (unmodifiziert)	CTTTCTCTCTCCTCCTCCTTC
QT2C	CTCTCTCTCTCCTCCTCCTTC
QT2A	CTATCTCTCTCCTCCTCCTTC
QT8A	CTTTCTCTCTCCTCCACCTTC

Tabelle 4.3: Sequenzausschnitt der erzeugten Polypyrimidin-Box1 Einzelbasen-Mutationen. Zur Nomenklatur: QT2C steht für „Quickchangemutation des Thymिन Nummer 2 der Polypyrimidin-Box1 in ein Cytosin“. Grau hinterlegt ist ein in beiden Polypyrimidin-Boxen konserviertes Sequenzelement.

Die erzeugten c1-Promotormutationen wurden sequenziert und anschließend mittels ballistischer Transformation in ihrer Promotoraktivität mit dem unmodifizierten c1-Promotor verglichen.

5.3.1 Die Mutation des 2. Thymins in der Polypyrimidin-Box1 des c1-Promotors führt zu einem Aktivitätsverlust von über 60%

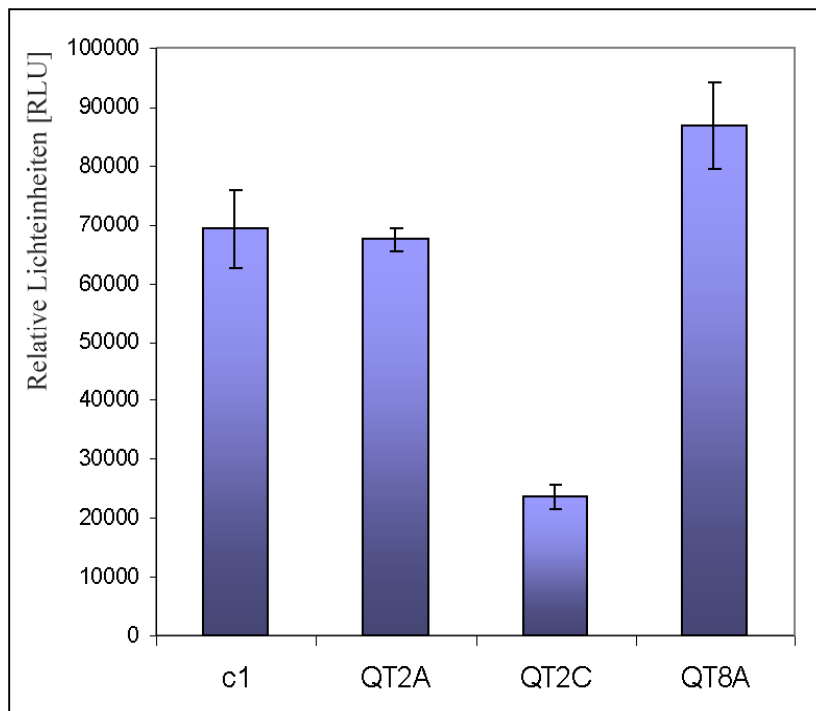


Abb. 4.3.1:

Cobombardment der Quik-Change-c1-Promotor-LUC Konstrukte mit pFF19G. Gesamtmenge Plasmidgemisch pro Schuss: 0,8µg bestehend aus 0,5µg Quikchange-Konstrukten und 0,3µg pFF19G. Inkubationszeit nach Transformation: 22,5h.

Die Ergebnisse der ballistischen Transformation zeigen bei dem Konstrukt QT2A keinerlei Auswirkung auf die Gesamtpromotoraktivität im Vergleich zum unveränderten c1-Promotor. Beim Austausch desselben Thymin durch ein Cytosin erfolgt ein starker Einbruch der gemessenen Luciferase-Aktivität um 64%. Ein Austausch des achten Thymins der Box1 scheint auf die Gesamtpromotoraktivität keinen negativen Einfluss zu haben.

5.3.2 S1-Nuklease Behandlung der c1- und PPase1-Promotoren zur Untersuchung auf Hoogsteen-DNA Motive

Manche Polypyrimidin-Motive können durch eine intramolekulare Faltung eine dreifache DNA-Helix (Hoogsteen-DNA) ausbilden. Die dabei zwangsläufig entstehenden einzelsträngige DNA wird von der S1 Nuklease als Substrat erkannt und herausgeschnitten. Die starke Verdrillung eines ungeschnittenen Plasmids begünstigt eine H-DNA Bildung. Durch das Herausschneiden der einzelsträngigen DNA erfolgt eine Relaxierung des Plasmids wodurch die Hoogsteen-DNA Konformation aufgelöst wird. Auf diese Weise kann der bis dahin ungeschnittene DNA-Strang ebenfalls von der S1-Nuklease geschnitten werden. Es resultiert ein linearisiertes Plasmid. Durch anschließende Behandlung mit Restriktionsendonukleasen kann dann die Position der S1 sensitiven Stelle bestimmt werden. Die Plasmide pBVA c1 und pBVP1 wurden 30 Minuten mit 20u S1-Nuklease behandelt und anschließend mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Dabei konnte innerhalb der beiden Promotersequenzen keine S1-Nuklease sensitiven Schnittstellen nachgewiesen werden (Ohne Abbildung).

5.4 Dam-Methylierung des c1-Promotors hat keinen Einfluss auf die Promotoraktivität

Bei der Mutation des c1-Promotors im Konstrukt A-BC wurde eine *BclI*-Schnittstelle in die Polypyrimidin-Box1 eingefügt. Das Enzym *BclI* ist dam-methylierungssensitiv. Eine Methylierung an der Schnittstelle TGA^mTCA verhindert daher die Spaltung der DNA durch *BclI*. Die Plasmide, die bisher alle aus dem *E. coli*-Bakterienstamm XL1-Blue isoliert wurden, ließen sich trotz vorhandener *BclI*-Schnittstelle nicht schneiden. Zur Klonierung des A-BC-Konstrukts mussten daher die Plasmide in den Dam-negativen *E. coli*-Bakterienstamm K12 GM2163 (NEB) transformiert werden, da dieser Bakterienstamm kein DNA-Adenin(N6)-Methyltransferase-Gen (Dam) besitzt.

Es stellte sich die Frage, ob der Grad der Methylierung der Adenine zu 5'-Methyladenin, abhängig vom verwendeten Bakterienstamm, aus dem die Plasmide isoliert wurden, einen Einfluss auf die Promotoraktivität bei der Transformation in *Beta vulgaris* Zellkultur hat. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Vektor pBVA c1-LUC aus dem *E. coli*-Bakterienstamm K12 GM2163 und aus XL1-Blue isoliert und parallel mit *Sau3AI* und *DpnI* verdaut.

Sau3AI ist ein Isoschizomer für *DpnI*. Beide Enzymen schneiden an derselben DNA-Sequenz (GATC). Die Restriktionsendonuklease *Sau3AI* ist gegenüber einer Methylierung dieses DNA-Erkennungsmotives nicht sensitiv. *DpnI* dagegen ist methylierungssensitiv. Eine Maskierung der *DpnI*-Schnittstelle GATC durch Methylierung des Adenins zu 6-Methylamino-purin verhindert daher die Spaltung der DNA. Das Sequenzmotiv GATC ist in dem Vektor pBVA c1-LUC 32 mal vorhanden. Innerhalb des Promotors und der 5'-UTR gibt es jeweils drei potentielle *DpnI*-, beziehungsweise *Sau3AI*-Schnittstellen (Positionen -564, -90 und -5 beziehungsweise Positionen +27, +135 und +143). Ein Verdau des gleichen Plasmids, das aus verschiedenen methylierenden beziehungsweise nicht methylierenden Bakterien-Stämmen isoliert wurde, zeigt somit nach einem Verdau mit unterschiedlich methylierungssensitiven Isoschizomeren die Häufigkeit der Methylierungen innerhalb der DNA-Sequenz dieses Motivs an.

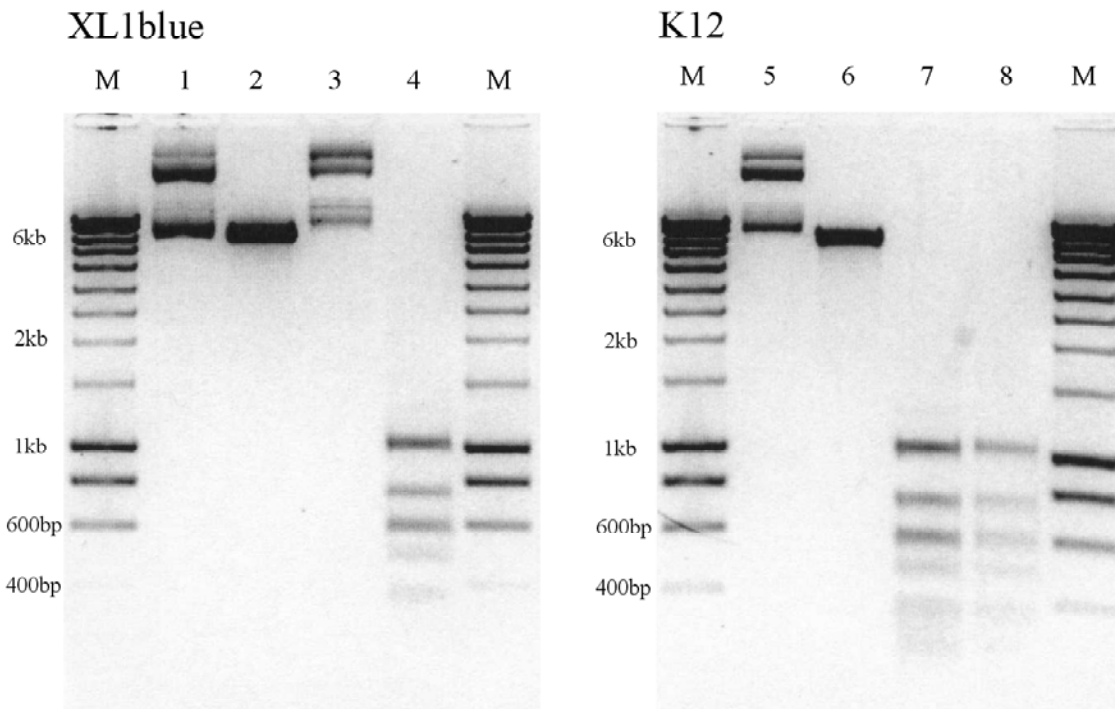


Abb. 4.4: Auftrennung von pBVA c1-LUC, welches aus dem Bakterien-Stamm XL1-Blue (links) und aus dem Bakterien-Stamm K12 GM2163 (NEB, rechts) isoliert wurde, nach Restriktionsverdau mit folgenden Restriktionsendonukleasen: Spuren 2 und 6: *Bam*HI, Spuren 3 und 7: *Dpn*I (methylierungssensitiv), Spuren 4 und 8: *Sau*3AI (methylierungstolerant). Die Restriktionsendonukleasen *Dpn*I und *Sau*3AI sind Isoshitzomere. In den Spuren 2 und 5 wurde jeweils unverdauter Vektor aufgetragen. Die Spuren M zeigen 10µl DNA-Marker (Smart Ladder Eurogentec). Es wurde jeweils 1µg pBVA c1-LUC-Plasmid pro Spur aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit EtBr-Färbelösung und die Bild-Dokumentation unter UV-Licht.

Nach der Inkubation von pBVA c1-LUC, welches aus dem Bakterien-Stamm XL1-Blue gewonnen wurde, mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym *Dpn*I zeigte sich kein Abbau der Plasmid-DNA (Spur 3). Die resultierende Bande entspricht im Laufverhalten dem ungeschnittenen Vektor (Spur 1). Der Verdau von pBVAc1-LUC mit *Sau*3AI (Spur 4) ist dagegen vollständig.

Der *E. coli*-Bakterienstamm K12 GM2163 besitzt keine DNA-Adenin(N6)-Methyltransferase und ist daher nicht in der Lage die DNA-Sequenz GATC zu methylieren. Alle potentiellen Schnittstellen für *Dpn*I wurden daher erkannt und geschnitten. Da *Sau*3AI gegenüber einer Methylierung ihres DNA-Erkennungsmotives tolerant ist, werden alle Schnittstellen (unabhängig ihres Methylierungsgrades) erkannt und geschnitten. Es zeigt sich daher im Vergleich der Spuren 7 und 8 ein identisches Bandenmuster.

Particle Bombardment auf Beta-Suspensionskulturzellen +/- dam-Methylierung hat keinen Einfluss auf die Aktivität des c1-Promotors

Im Anschluss an den Nachweis der unterschiedlichen Methylierung des pBVA c1-LUC-Promotor-Konstrukts je nach verwendetem *E. coli*-Bakterienstamm soll nun deren Promotoraktivität im Particle Bombardment verglichen werden.

Bakterien-Stamm und Beladung der Mikrocarrier	LUC-Mittelwert nach Abgleich [RLU]	Standardabweichung des LUC-Mittelwerts in %
XL1-Blue pBVA c1-LUC 0,35µg/Schuss, pFF19G 0,5µg/Schuss	56232	13%
K12 pBVA c1-LUC 0,35µg/Schuss pFF19G 0,5µg/Schuss	57929	21%

Tabelle 4.4: Funktionstest des Plasmids pBVA c1-LUC nach transients Transformation von *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur. Das Plasmid wurde aus dem methylierenden Bakterien-Stamm XL1-Blue beziehungsweise aus dem Methylase-defizienten Bakterien-Stamm K12 isoliert. Die Auswertung erfolgte nach 23,5 Stunden Inkubation.

Die gemessenen Luciferase-Aktivitäten sind nahezu identisch. Trotz einer relativ hohen Standardabweichung der gemessenen Werte gibt es keinen Anhaltspunkt für eine veränderte Aktivität des c1-Promotors in Abhängigkeit des Methylierungsgrades des Plasmids durch methylierende, beziehungsweise dam-defiziente Bakterien-Stämme.

5.5 Versuche zur in vivo Konkurrenz der c1-Promotoraktivität

Grundsätzlich liegt der Aktivität eines Promotors die Fähigkeit zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen zu Grunde. Einzelne Sequenz-Motive auf der DNA können von Transkriptionsfaktoren erkannt werden und führen zu einer reversiblen Anheftung. Viele solcher DNA-Bindeproteine können sich gemeinsam an einem Promotor sammeln oder um einzelne Bindemotive konkurrieren. Bei der Zelldifferenzierung oder der Reaktion auf Stressoren werden in verschiedenen Zeitfenstern unterschiedliche Transkriptionsfaktoren gebildet, deren Bindung vielfach regulative Eingriffe in die Transkriptionsprozesse der Zellen haben können.

Durch ein Cobombardment des Plasmids pBVA c1-LUC mit nicht funktionalen c1-Vektoren, beziehungsweise c1-Promotor-Fragmenten im Überschuss sollte untersucht werden, ob regulative Elemente durch Konkurrenz abgefangen werden können und sich so ein Effekt auf die c1-Promotoraktivität nachweisen lässt. Um die zur Konkurrenz eingesetzten c1-Promotordelationen zu inaktivieren, wurde ein Restriktionsverdau mit *NarI* durchgeführt. *NarI* linearisiert die Vektoren 32 bp nach dem ATG des Reportergens Luciferase. Ziel dieses Ansatzes war es, für die Promotoraktivität wichtige Motive eingrenzen zu können.

Keine Konkurrenz der c1-Promotoraktivität mit inaktivierten c1-Promotor-LUC-Konstrukten im Überschuss 1:9, 1:19 und 1:29

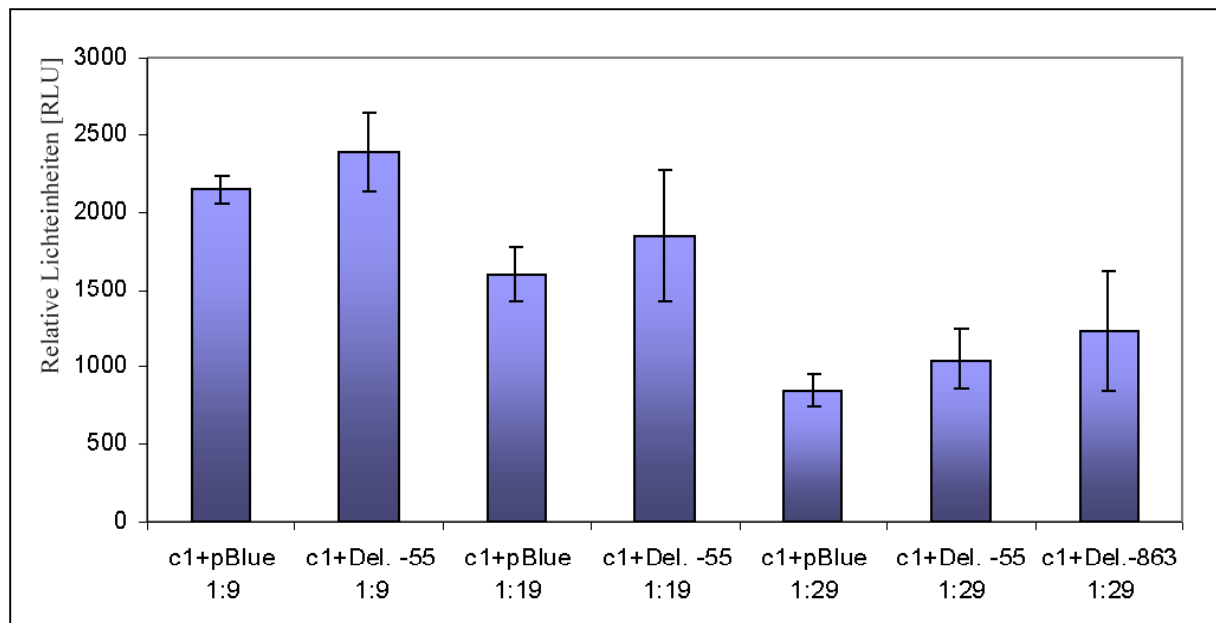


Abb. 4.5: Konkurrenz des c1-Promotor-LUC-Konstrukts (pBVA c1-LUC Deletion -863*) durch Cobombardment mit inaktivierten, unterschiedlich langen pBVA c1-LUC Deletionen im 9-, 19- und 29-fachen Überschuss (bezogen auf die Plasmidmenge in μg). Die Inaktivierung der Promotor-LUC-Konstrukte, die zur Konkurrenz eingesetzt wurden, erfolgte über einen Restriktionsverdau mit *NarI* 32bp nach dem ATG des Luciferase-ORF. Es wurden pro Schuss 0.1 μg pBVA c1-LUC Deletion -863* (funktional) und 0.5 μg pFF19G eingesetzt. Zusätzlich wurden 0.9, 1.9, bzw. 2.9 μg Konkurrenzplasmide pBlueSK⁺ = „leerer“ Vektor (*ScaI* linearisiert), pBVA c1-LUC Deletion -55* (*NarI* linearisiert) und pBVA c1-LUC Deletion -863* (*NarI* linearisiert) auf die Mikrocarrier geladen. Als Pflanzenmaterial zur ballistischen Transformation dienten *Beta vulgaris* Zellsuspensionskulturen. Die Auswertung erfolgte 22 Stunden nach der Transformation. Der „leere“ Vektor pBlueSK⁺ wurde bei jeder Bedingung als Vergleich zu den Konkurrenzbedingungen mit der gleichen DNA-Menge in die Standardbedingung eingesetzt. Damit wurden pro Schuss innerhalb der einzelnen Bedingungen Beladungsunterschiede der Mikrocarrier vermieden.

*Die Zahlenangabe entspricht der Länge des Promotors in Relation zum Transkriptionsstart.

Es zeigen sich keine Anzeichen für eine Reduktion der Promotoraktivität des c1-Promotors durch ein Cobombardment von c1-Promotorelementen im Überschuss 1:9, 1:19 oder 1:29. Eine spezifische Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren kann nicht gezeigt werden.

Keine Konkurrenz des c1-Promotors durch Cobombardment mit doppelsträngigen Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotide im 100fachen molaren Überschuss

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob eine spezifische Konkurrenz des pBVA c1-Promotors an den Polypyrimidin-Boxen mit dem 100fachen molaren Überschuss doppelsträngiger Polypyrimidin-Box1-Oligos zu erzielen ist.

Beladung der Mikrocarrier	LUC-Mittelwert nach Abgleich [RLU]	Standardabweichung des LUC-Mittelwerts in %
0,5µg pBVA c1-LUC, 0,5µg pFF19G	76250	6.1%
0,5µg pBVA c1-LUC, 0,5µg pFF19G, +10pmol (TC) _n -Box1 Oligonukleotide	73961	5.2%

Tabelle 4.5: Konkurrenzversuch des c1-Promotors mit doppelsträngigen Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotiden im 100fachen molaren Überschuss. In das Partikel-Bombardment der *Beta vulgaris*-Zellsuspensionskultur wurden pro Schuss 0.5µg pBVA c1 Deletion -863 (ca. 0.1pmol) und 0.5µg pFF19G eingesetzt. Zur Konkurrenz wurden die Mikrocarrier zusätzlich mit 10pmol doppelsträngige Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotiden beladen.

Es ist trotz des 100fachen molaren Überschusses dieser potentiellen DNA-Bindemotive keine signifikante Änderung in der gemessenen Luciferase-Aktivität durch eine zusätzliche Beladung der Mikrocarrier mit den Polypyrimidin-Box1-Oligos zu beobachten.

5.6 Cobombardment von pBVA c1 mit dem GAGA-Transkriptionsfaktor bewirkt keine spezifische Erhöhung der Luciferase-Aktivität

Der GAGA-Transkriptionsfaktor ist ein Protein aus *Drosophila melanogaster*, welches an der strukturellen Organisation der DNA im Zellkern und der Transkriptionsregulation einzelner Gene beteiligt ist (siehe Einleitung). Da der GAGA-Faktor mit Polypurin/Polypyrimidin-Motiven mit DNA interagiert und somit auch die Promotoraktivität beeinflussen kann (Soeller et al., 1993) soll in den folgenden Particle Bombardments der GAGA Expressionsvektor pFF19GAGA im Cobombardment mit dem c1-Promotor-LUC-Konstrukt eingesetzt werden. Um die Mikrocarrier in den Kontrollbedingungen ohne pFF19GAGA mit den gleichen Plasmidmengen beladen zu können, wurde der „leere“ pFF19-Vektor ohne ORF nach dem verstärkten CaMV35S-Promotor verwendet.

Beladung der Mikrocarrier	LUC-Mittelwert nach Abgleich [RLU]	Standardabweichung des LUC-Mittelwerts in %
c1 + pFF19G + pFF19(„leer“)	380943	10%
c1 + pFF19G + pFF19GAGA	309210	4,5%

Tabelle 4.6: Cobombardment von pBVA c1-LUC (0,5µg/Schuss) mit „leerem“ pFF19-Vektor beziehungsweise pFF19-GAGA (je 0,5µg/Schuss). pFF19G (0,2µg/Schuss) dient zum internen Abgleich der Werte. Auswertung nach 23 Stunden Inkubation bei RT.

Es zeigt sich im Cobombardment des c1-Promotors mit pFF19GAGA keine erhöhte Luciferase-Expression, beziehungsweise LUC-Reportergenaktivität. Die gemessene Luciferase-Aktivität ist entgegen den Erwartungen um ca. 20% gesunken. Dieser Versuch wurde 3x in ähnlicher Durchführung wiederholt mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen.

5.7 AtBR-Transkriptionsfaktoren können im Cobombardment mit dem c1-Promotor dessen Aktivität erhöhen

Die BBR-homologen AtBR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Einleitung) besitzen aufgrund der großen Ähnlichkeit ihrer C-terminalen DNA-Bindedomäne mit der des BBR-Proteins aus Gerste wahrscheinlich ebenfalls Polypyrimidin-Sequenz spezifische Bindeeigenschaften und sind somit potentielle Kandidaten für regulative Interaktionen mit Polypyrimidin-Sequenzen in Promotoren. Um die AtBR-Proteine dahingehend zu untersuchen, wurden die codierenden Bereiche der Gene AtBR1 und AtBR2 in den Expressionsvektor pFF19 kloniert und im Cobombardment mit pBVA c1-LUC und pBVP1-LUC eingesetzt.

In einem Vorversuch konnte im Cobombardment des AtBR1-Transkriptionsfaktors mit *Arabidopsis* Zellsuspensionskultur (homologes System) keine Aktivitätserhöhung des c1-

Promoters gemessen werden. Analog dazu konnte jedoch im heterologen System durch ein Particle Bombardment auf *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur eine gesteigerte c1-Promotoraktivität nachgewiesen werden.

Versuch Nr: Inkubations- zeit	µg DNA pro Schuss	Promotor- LUC Konstrukt	pFF19- GUS	pFF19-Test- Konstrukt	LUC-Aktivität (RLU in % zu c1)	Standard- Abweichung in %
Versuch 1 4h 10min	3µg	0,5µg c1	0,5µg	2µg pFF19	100	18
		0,5µg c1		2µg AtBR1	298	16
Versuch 2 22,5h	2µg	1µg c1	0,5µg	0,5µg pFF19	100	17
		1µg c1		0,5µg AtBR1	154	8
		1µg c1		0,5µg AtBR2	74	17
Versuch 3 24h	2µg	1µg PPase1	0,5µg	0,5µg pFF19	100	29
		1µg PPase1		0,5µg AtBR1	85	23
		1µg PPase1		0,5µg AtBR2	108	12
Versuch 4 22,5h	1,5µg	0,5µg c1	0,5µg	0,5µg pFF19	100	38
		0,5µg c1		0,5µg AtBR1	151	29
		0,5µg c1		0,5µg AtBR2	235	19
		0,5µg PPase1		0,5µg pFF19	67	48
		0,5µg PPase1		0,5µg AtBR1	55	32
		0,5µg PPase1		0,5µg AtBR2	95	34

Tabelle 4.7: Cobombardments der c1- und PPase1-Promotor-LUC Konstrukte mit den AtBR-Transkriptionsfaktoren AtBR1 und AtBR2. Jeder Werte ist aus den gemessenen Durchschnitts-Aktivitäten von 8-10 Wiederholungen pro Versuchsbedingung nach Abgleich mit den gemessenen GUS-Vergleichs-Aktivitäten errechnet worden.

Für den c1-Promotor ergibt sich eine Aktivierung im Cobombardment mit AtBR1 in *Beta vulgaris* Zellkultur auf über 150%. Die gemessenen Werte der Luciferase-Aktivität im Cobombardment des c1-Promotors mit AtBR2 sind stark heterogen. Dagegen erfährt die PPase1-Promotor-Aktivität durch die AtBR-Transkriptionsfaktoren AtBR1 und AtBR2 keine signifikante Veränderung.

5.8 Das Fusionsprotein GFP:AtBR1 ist kernlokalisiert

Nachdem die Cobombardments des V-ATPase c1-Promotor-LUC-Konstrukts mit dem AtBR1-Expressionsvektors pFF19AtBR1 eine stark erhöhte Reporteragen-Aktivität zur Folge hatte, soll für das Protein AtBR1 die subzelluläre Lokalisation ermittelt werden. Dazu wurde in den pFF19AtBR1-Expressionsvektor zwischen den verstärkten CaMV35S-Promotor und dem für AtBR1 codierenden Sequenzbereich das Gen für GFP so eingefügt, dass ein Fusionsprotein GFP-AtBR1 exprimiert wird. Das GFP wurde N-terminal mit AtBR1 verknüpft, um die C-terminale DNA-bindende Domäne nicht zu beeinträchtigen.

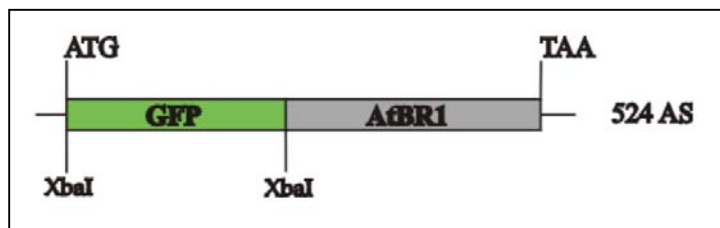


Abb. 4.8: Darstellung des GFP-AtBR1-Konstruktes wie es im Überexpressionsvektor pFF19G vorliegt. Das GFP liegt 5'-seitig vor der für AtBR1 codierenden Sequenz.

5.8.1 Cobombardment pFF19-GFP-AtBR1 mit pWEN143

Beta vulgaris Zellsuspensionskultur wurde mit 2 µg Plasmid-DNA bestehend aus 1 µg pFF19-GFP-AtBR1 und 1 µg pWEN143 beschossen. Das Plasmid pWen143 kodiert für ein kernlokalisiertes Histon-RFP Fusionsprotein, welches unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors steht. Nach der Transformation wurden die Zellen für zwei Tage bei RT im Dauerdunkel inkubiert. Die Zellen wurden ÜN protoplastiert und mikroskopisch ausgewertet.

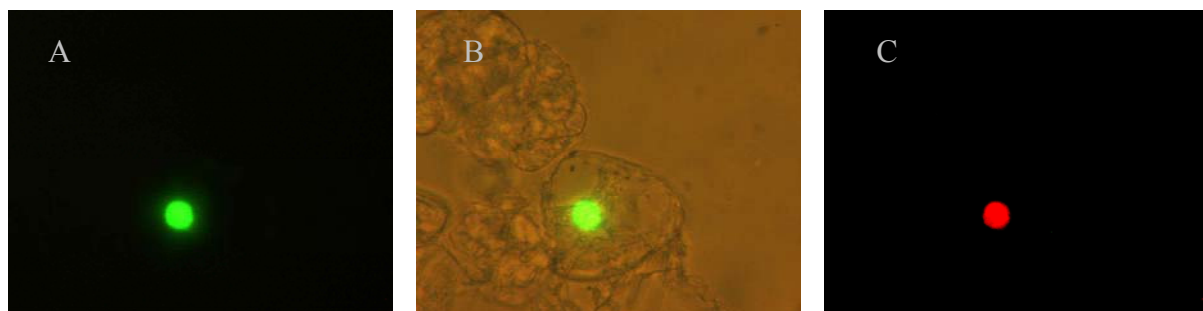


Abb. 4.8.1a: Subzelluläre Lokalisation von GFP-AtBR1 durch Vergleich mit kernlokalisiertem Histon-RFP Fusionsprotein. Cobombardment von *Beta vulgaris* Zellsuspensionskulturen mit pFF19-GFP-AtBR1 und pWEN143 zum Nachweis der Kernlokalisation von GFP-ATBR1-Fusionsproteins. Fotos 48h nach Transformation, ÜN protoplastiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils dieselben Zellen mit unterschiedlichen Farbfiltern und unter UV-Licht. Aufnahmen A: GFP-Filter (Excitation 450 – 490nm, Emission 515nm); Aufnahmen B: GFP-Filter mit zusätzlichem Durchlicht; Aufnahmen C: RFP-Filter (Excitation 525 – 550nm, Emission 585nm).

Man erkennt deutlich dieselbe Lokalisation sowohl der GFP-, als auch der RFP-Fluoreszenz. Die unter Blaulicht gemachte Aufnahme A (GFP-Filter) zeigt präzise die Übereinstimmung der grün fluoreszierenden Zellstruktur mit dem unter Grünlicht (RFP-Filter, Spalte 3) rot fluoreszierenden Zellkern des Kontroll-Histon-RFP-Fusionsproteins. Die Aufnahme B ist zusätzlich zum Blaulicht zur Sichtbarmachung des GFP-AtBR1-Fusionsproteins mit Durchlicht aufgenommen worden und zeigt die einzelne Transformierte Zelle in ihrem undifferenzierten Zellverbundes der Suspensionkultur.

Um ausschließen zu können, dass das GFP allein eine spezifische Fluoreszenz des Zellkerns hervorrufen kann wurde zur Kontrolle der Vektor pFF19-GFP, aus dem das GFP zur Klonierung des GFP-AtBR1 Fusionsproteins amplifiziert wurde, ebenfalls mit pWEN143 in *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur geschossen (Durchführung s.o.).

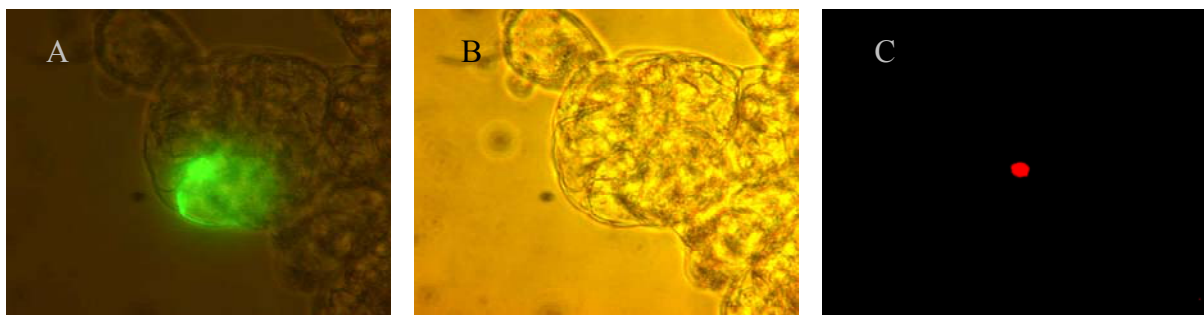


Abb. 4.8.1b: Kontrollversuch: Cobombardment von *B. v.* Zellsuspensionskultur mit pFF19-GFP und pWEN143. Fotos 48h nach Transformation, ÜN protoplastiert. Die Fotos zeigen dieselben Zellen mit unterschiedlichen Farbfiltern und unter UV-Licht. Aufnahme A: GFP-Filter (Excitation 450 – 490nm, Emission 515nm) mit zusätzlich Durchlicht ; Aufnahme B: Durchlicht; Aufnahme C: RFP-Filter (Excitation 525 – 550nm, Emission 585nm).

Im Cobombardment der *B. v.* Zellsuspensionskultur zeigt sich unter Blaulicht (Aufnahme A) eine Fluoreszenz welche die gesamte transformierte Zelle umfasst. Die GFP-Fluoreszenz ist dabei nicht auf ein bestimmtes Zell-Organell beschränkt und man kann die Ausdehnung der transformierten Zelle innerhalb des Zellverbandes erkennen. Im Bild C ist unter Grünlicht nur der durch das kernlokalisierte GFP-Histon-Fusionsprotein rot angefärbte Zellkern zu sehen. Es ist zwar in der Aufnahme A eine verstärkte Fluoreszenz des GFP im Bereich des Zellkern zu sehen, jedoch stimmt die Lokalisation der GFP- und RFP-Färbungen nicht überein. GFP allein ist nicht in der Lage eine spezifische Kernfärbung hervorzurufen.

5.9 Überexpression und Aufreinigung von Trx-AtBR Fusionsproteinen

Die C-terminale DNA-Bindedomäne der BBR-homologen AtBR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* soll im Folgenden auf ihre Polypyrimidin-Box bindenden Eigenschaften hin mittels Gelretardationsanalyse (EMSA) untersucht werden. Dazu wurden die Proteine AtBR1, AtBR2 und AtBR4 als Trx-Fusionsproteine im *E. coli*-Bakterienstamm RosettaGami überexprimiert und aufgereinigt. Im pETM20-Vektor liegen die für AtBR-codierenden Sequenzen direkt im Anschluss an einen codierenden Bereich für Thioredoxin (Trx) und können zusammen mit diesem als Thioredoxin-AtBR-Fusionsprotein (Trx-AtBR) exprimiert werden. Dabei ergab sich nur für das Fusionsprotein Trx-AtBR4 eine zufriedenstellende Aufreinigung (Abb 4.9b, Spur 3).

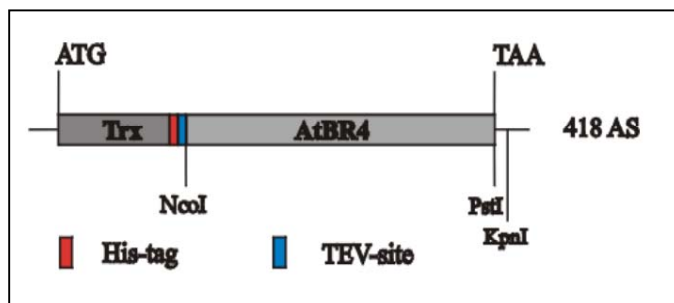


Abb. 4.9a: Darstellung des Trx-AtBR4-Konstruktes, wie es im Überexpressions-Vektor pETM20 vorliegt. Das Thioredoxin liegt 5'-seitig vor der für AtBR4 codierenden Sequenz. Dazwischen liegen ein His-tag zur Aufreinigung des Fusionsproteins über Nickel-Agarose und eine TEV-Schnittstelle.

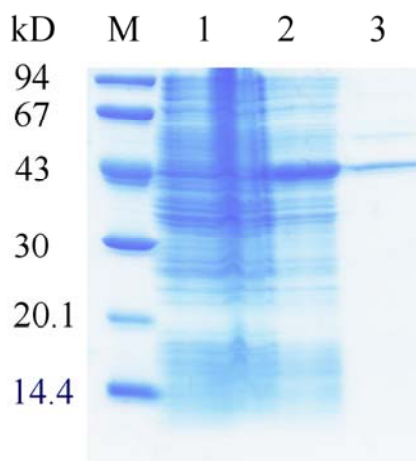


Abb. 4.9b: Dokumentation der Überexpression des rekombinanten Histidin-markierten Trx-AtBR4 Fusionsproteins (418AS) in *E. coli* (Rosetta). Die Aufreinigung erfolgte durch Ni-Affinitätschromatographie. Coomassie-gefärbtes 13%iges PAA-SDS-Gel. M = LMW-Marker (Amersham Bioscience). Spur 1: Bakterien vor IPTG-Induktion, Spur 2: nach 4 Stunden Induktion mit 0,5mM IPTG, Spur 3: Aufgereinigtes Trx-AtBR4 Fusionsprotein.

5.10 Das rekombinante Trx-AtBR4 Fusionsprotein bindet spezifisch an die Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors

Die C-terminale DNA-Bindedomäne der AtBR-Proteine ist in dieser Genfamilie hochkonserviert (siehe Abb. 1.4.3a). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass alle AtBR-Proteine vergleichbare DNA-Elemente binden können. Im Folgenden wurde exemplarisch für alle AtBR-Transkriptionsfaktoren das Fusionsprotein Trx-AtBR4 auf seine Affinität zu verschiedenen biotinmarkierten Sonden aufbauend auf der c1-Promotor-Sequenz untersucht.

Schematische Darstellung der im EMSA verwendeten biotinmarkierten Sonden.

c1-Promotor Ausgangssequenz	<p>Promotorsequenz -1126bp 5'UTR +131bp Transkriptionsstart +1 BamHI, NarI, BOX1, BOX2, ATG-LUC</p>
c1-Sonde mit beiden (TC) _n -Boxen (199bp)	<p>5' 3'</p>
Box1-Sonde (107bp)	<p>5' 3'</p>
Box2-Sonde (128bp)	<p>5' 3'</p>
Konstrukt A-BC (TC) _n -Box1 mutiert	<p>BamHI, BclI, NarI, BOX2, ATG-LUC</p>
A-BC-Sonde mit (TC) _n -Box2 (199bp)	<p>5' 3'</p>
0-Sonde (TC) _n -Box1 mutiert (107bp)	<p>5' 3'</p>

Tabelle 4.10: Als Template für die PCR-Sonden dienten pBVA c1-LUC, sowie das A-BC-Konstrukt von denen jeweils nur der Promotorbereich und ein Teil des Luciferase-Reportergens dargestellt sind. An den Enden der Sonden sind die Biotinmarkierungen eingezeichnet.

5.10.1 Rekombinantes Trx-AtBR4 Fusionsprotein bindet an biotinmarkierte c1-Promotor-Sequenzen

Es wurde eine Interaktion des rekombinanten Trx-AtBR4 mit einer Teilsequenz des c1-Promotors nachgewiesen. Diese A-BC-Sonde beinhaltet die Polypyrimidin-Box2 und ist 6fach biotinyliert (Siehe Tabelle 4.10). Die Sondenkonzentration ist in allen Bindereaktionen, beziehungsweise aufgetragenen Spuren konstant. Die Trx-AtBR4 Konzentration wird ab Spur 2 jeweils um den Faktor 2 erhöht.

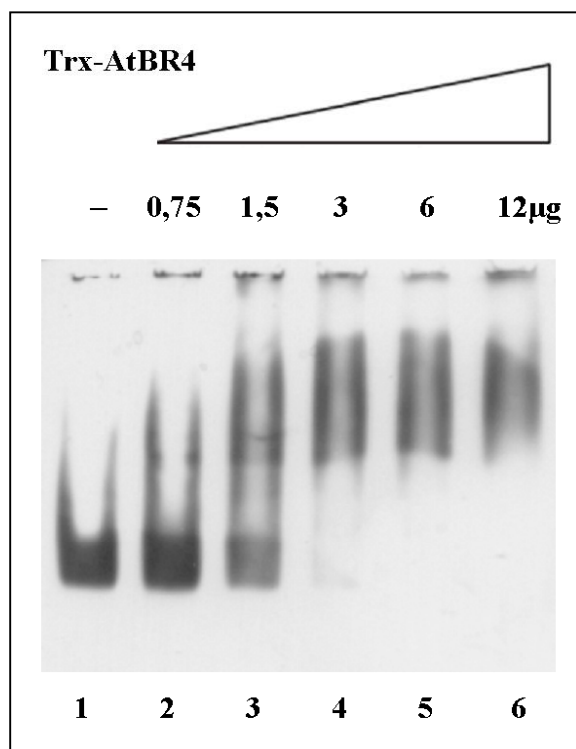


Abb. 4.10.1: Komplexbildung von Trx-AtBR4 mit A-BC-Sonde. Spuren 1 – 6: 105ng 6fach biotinylierte A-BC-Sonde mit Polypyrimidin-Box2. Spuren 2 – 6: Steigende Konzentrationen des Trx-AtBR4 Fusionsproteins von 0,75µg auf 12µg/Bindereaktion.

Man erkennt deutlich eine Trx-AtBR4-mengenabhängige Retardation der A-BC-Sonde (Spuren 2 – 4). Diese Retardation ist ab einer Trx-AtBR4-Menge von 3µg so stark, dass alle freie Sonde „verbraucht“ wurde (Spuren 4 – 6). Der Shift der A-BC-Sonde mit einer Polypyrimidin-Box2 ergibt eine Bande (Spuren 3 – 6) die sich auch durch eine weitere Erhöhung der Menge von Trx-AtBR4-Fusionsprotein nicht weiter verschiebt.

5.10.2 Spezifische Konkurrenz der Bindung von Trx-AtBR4 an die Polypyrimidin-Motive der c1-EMSA-Box1-Sonde durch doppelsträngige Polypyrimidin-Box1 und -Box2 Oligonukleotide

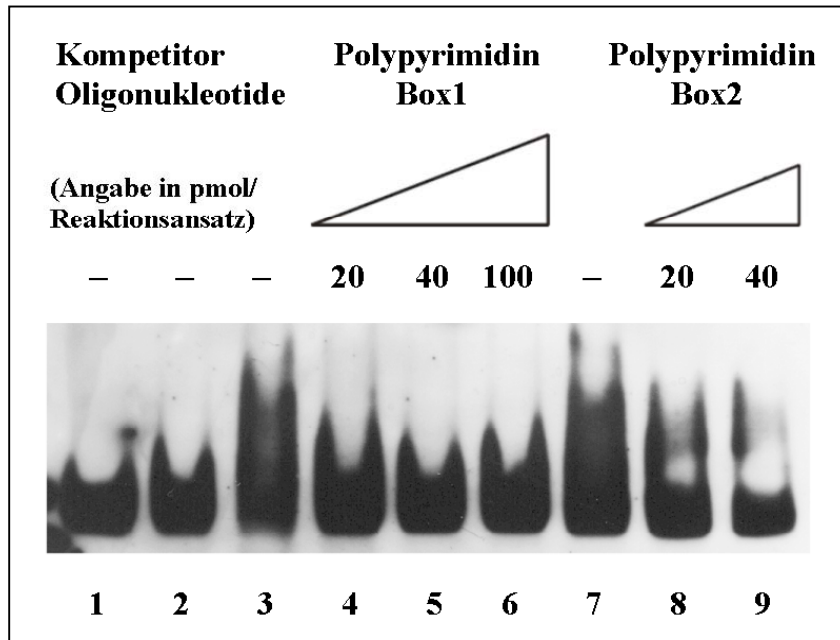


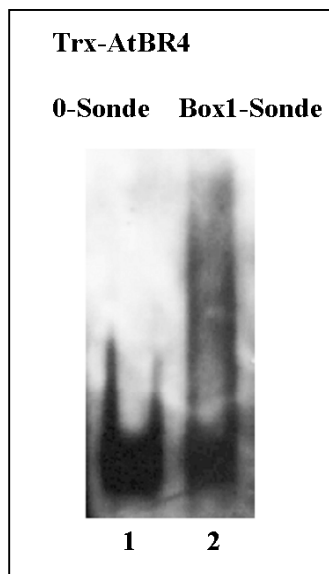
Abb. 4.10.2: Spezifische Konkurrenz der Bindungsreaktion von rekombinantem Trx-AtBR4 mit der biotinmarkierten Box1-Sonde (107bp) durch Zugabe von doppelsträngigen Kompetitor-Oligonukleotiden mit Polypyrimidin-Box1, bzw. Polypyrimidin-Box2 Sequenz. Spuren 1 – 9 je 75ng biotinylierte c1-Sonde. Spur 2 mit zusätzlich 0,85µg hitzedenaturiertes Trx-AtBR4 (2' 95°C). Spuren 3-6 und 8-9 mit zusätzlich 0,85µg Trx-AtBR4. Spuren 4, 5, 6 zusätzlich 20, 40 und 100pmol ds Kompetitor-Oligos-Box1 (entspricht ca. dem 20 bzw. 40 und 100 fachen Überschuss zur Sonde). Spuren 8 und 9 zusätzlich 20 bzw. 40pmol ds Kompetitor-Oligos-Box2.

Es erfolgt in Spur 2 keine Retardation der biotinmarkierten Box1-Sonde nach Zugabe von hitzebehandeltem Trx-AtBR Protein (2' 95°C). Dieser Befund zeigt, dass nur das native Protein in der Lage ist die Box1-Sonde zu binden und somit einen Shift zu bewirken.

In den Spuren 3 und 7 wird die Sonde stark retardiert. Durch die Zugabe von 20pmol Polypyrimidin-Box1 Oligonukleotiden wird die Retardation der Sonde unterbunden. Eine weitere Erhöhung der Kompetitor-Konzentration auf 40 und 100pmol bewirkt keine weitere Änderung des Laufverhaltes der Sonde.

Durch die Zugabe von Polypyrimidin-Box2 Oligonukleotiden wird die Retardation ebenfalls gehemmt (Spuren 8 und 9), jedoch bleibt selbst bei einer Konzentration von 40pmol noch eine schwache Banden der retardierten Box1-Sonde zu sehen (Spur 9).

5.10.3 Trx-AtBR4 bindet spezifisch an die Polypyrimidin-Box1 des BVA c1-Promotors



Um nachzuweisen, dass tatsächlich ausschließlich die $(TC)_n$ -Sequenz der Polypyrimidin-Boxen für die Trx-AtBR4-Bindung verantwortlich sind, wurden gleiche Konzentrationen der 0-Sonde und der Box1-Sonde (siehe Tabelle 4.10) mit der gleichen Menge rekombinantes Trx-AtBR4 nebeneinander in einem EMSA-Versuch eingesetzt. Beide Sonden haben eine identische Länge und unterscheiden sich nur in der Polypyrimidin-Box1, die bei der 0-Sonde mutiert ist.

Abb. 4.10.3: EMSA Spur 1: 100ng 0-Sonde (107bp) Spur 2: 100ng Box1-Sonde (107bp). In beiden Reaktionsansätzen wurden 3,5 μ g AtBR4-Trx Fusionsprotein (0,75 μ g/ μ l) eingesetzt.

Die 0-Sonde mit mutierter Polypyrimidin-Box1-Sequenz ist nicht in der Lage, einen Komplex mit dem Fusionsprotein Trx-AtBR4 zu bilden (Spur 1). Dagegen zeigt sich bei der gleichen Sonde mit unveränderter Polypyrimidin-Box1-Sequenz eine starke Retardation wobei die Signalintensität der ungebundenen Box1-Sonde entsprechend abnimmt.

5.10.4 Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet präferentiell Polypyrimidin-Box1

Es konnte bisher für beide Polypyrimidin-Boxen des pBVA c1-Promotors eine spezifische Bindung mit dem Fusionsprotein Trx-AtBR4 gezeigt werden. Beide Boxen besitzen jedoch eine unterschiedliche Polypyrimidin-Sequenz. Dies legt eine unterschiedliche Affinität des Fusionsproteins zu diesen beiden Bindemotiven nahe. Auch die Cobombardments mit den mutierten Polypyrimidin-Boxen (Punkt 4.2) weisen auf eine unterschiedliche Bedeutung der beiden Motive für die Gesamt-Promotoraktivität hin. Um unterschiedliche Bindeaffinität im direkten Vergleich beurteilen zu können, wurden gleiche Mengen der zwei Sonden Box1-Sonde und Box2-Sonde miteinander gemischt und steigende Mengen des Fusionsproteins in die Bindereaktion eingesetzt.

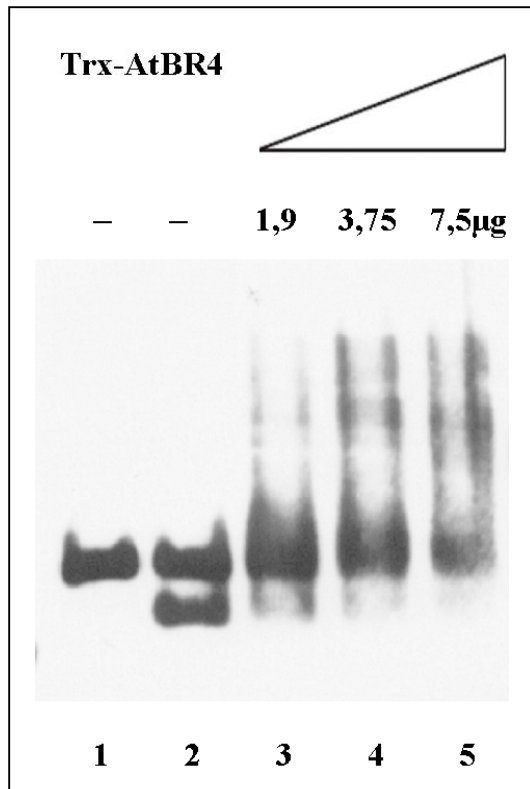
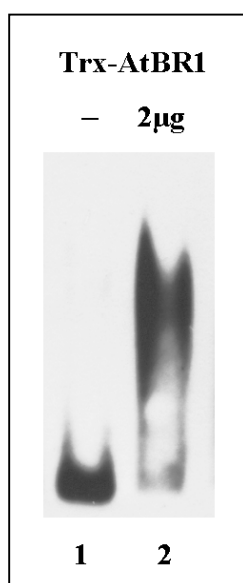


Abb. 4.10.4: Nachweis der unterschiedlichen Bindeaffinität von Trx-AtBR4 an die beiden Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors. Dazu wurde ein Gemisch zweier biotinylierter Sonden unterschiedlicher Größe (Box2-Sonde und Box1-Sonde) mit steigenden Mengen rekombinantem Trx-AtBR4 Fusionsproteins im 5%igen nativen PAA-Gel aufgetrennt. Spur 1: 60ng ungebundene Box2-Sonde (128bp). Spuren 2 – 5: 60ng Box2-Sonde + 60ng Box1-Sonde (107bp). Spuren 3 – 5: steigende Mengen AtBR4-Trx Fusionsprotein (1.9, 3.75, 7.5µg).

Es ist schon ab einer Menge von 1,9µg Fusionsprotein in der Bindereaktion eine deutliche Reduktion der Signalstärke der Box1-Sonde zu beobachten (Spur 3), während die Signalstärke der Box2-Sonde selbst bei 3,75µg nur geringfügig abnimmt (Spur 4). In Spur 5 ist das Signal der Box1-Sonde vollständig verschwunden. Die Bande der Box2-Sonde ist dagegen noch deutlich zu sehen. Gleichzeitig mit der Reduktion der Signalstärke der beiden ungebundenen Sonden mit steigender Trx-AtBR4-Konzentration entstehen oberhalb Banden aus retardierten Sonden die im Komplex mit Trx-AtBR4 vorliegen (Spuren 3 – 5).

5.10.5 Trx-AtBR1 bindet an c1-Promotor-Teilsequenz



Obwohl die Qualität des aufgereinigten Trx-AtBR1-Fusionsproteins durch Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen nicht der des aufgereinigten Trx-AtBR4 entspricht, kann hier mit Trx-AtBR1 ebenfalls eine Bindung an die c1-Sonde mit der Poloyprimidin-Box1-Sequenz nachgewiesen werden.

In beiden Spuren wurden gleiche Mengen c1-Sonde eingesetzt. Die Zugabe von rekombinantem Trx-AtBR1 in Spur 2 verursacht einen Shift der c1-Sonde. Auch die Abnahme der Menge ungebundener Sonde ist deutlich zu sehen (Spur 2 unten).

Abb. 4.10.5: EMSA der c1-Sonde mit rekombinantem Trx-AtBR1. Spuren 1 und 2: 40ng c1-Sonde (mit Polypyrimidin-Box1). Spur 2 zusätzlich mit 2µg Trx-AtBR1 Fusionsprotein.

5.11 Viral induziertes Gen-Silencing von AtBR1-3 in *Arabidopsis thaliana* auf „whole plant“-Ebene

In diesem Versuch soll auf „whole plant“-Ebene in *Arabidopsis thaliana* mittels viral induziertem Gen-Silencing der Einfluss der Transkriptionsfaktoren AtBR1, AtBR2 und AtBR3 auf die Aktivitäten der c1- und PPase1-Promotoren aus *Beta vulgaris* vergleichend untersucht werden. Im Cobombardment der AtBR-Transkriptionsfaktoren mit dem c1-Promotor ergab sich eine Aktivierung durch AtBR 1 und 2 in *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur. Da eine solche Aktivierung nicht für den PPase1-Promotor gezeigt werden konnte, steht zu erwarten, dass ein gleichzeitiges Silencing der Transkriptionsfaktoren AtBR1, AtBR2 und AtBR3 auf die in der Pflanze kooperativ an der Ansäuerung der Vakuole arbeitenden Protonenpumpen differenzierte Effekte zur Folge haben kann.

Um ein Silencing der AtBR1 – 3 Proteine zu erreichen, wurde ein 345bp langer Teil der C-terminalen Sequenz, welche für die DNA-Bindedomäne kodiert, aus AtBR3 amplifiziert und in einen Vektor kloniert, der das Genom eines modifizierten Pflanzenvirus beinhaltet (unveröffentlichtes virales SIPV-Konstrukt). Der verwendete Sequenzbereich ist bei AtBR1, AtBR2 und AtBR3 stark homolog und bei AtBR2 mit AtBR3 über größere Sequenzbereiche identisch. Es ist daher davon auszugehen, dass nicht nur AtBR3, sondern auch AtBR2 und wahrscheinlich auch AtBR1 effektiv durch das Gen-Silencing betroffen sein werden (Abb. 4.11.1).

AtBR3	AAACCGGTTAAGAAGAGTGTGGATCTTGTGATTAAACGGTGTGAGTATGGACATTTCTGGT	60
AtBR2	AAACCGGTTAAGAAGAGTGTGGATCTTGTGATTAAACGGTGTGAGTATGGACATTTCTGGT	60
AtBR1	AAACCCGCTAAGAAAAGTGTGGACTTGGTGAACAATGGAGTGTGATATGGACATTTCTGGT	60
AtBR3	TTACCTGTACCGGTTTGTACTTGTACTGGAACCTCTCAACAATGTTACCGTTGGGGTTGC	120
AtBR2	TTACCTGTACCGGTTTGTACTTGTACTGGAACCTCTCAACAATGTTACCGTTGGGGTTGC	120
AtBR1	CTTCTGTTCCTATCTGCACTTGTACTGGAACCTCTCAACAATGTTACCGTTGGGGTTGC	120
AtBR3	GGCGGATGGCAATCCGCTTGTGTACGACTAACATTTCCGGTGTATCCATTACCGATGAGT	180
AtBR2	GGCGGATGGCAATCCGCTTGTGTACGACTAACATTTCCGGTGTATCCATTACCGATGAGT	180
AtBR1	GGCGGTGGCAATCCGCTTGTGTACGACTAACATTTCCGGTGTATCCATTACCGATGAGT	180
AtBR3	ACTAAGCGACGCGGTGCAAGGATTTCCGGTAGGAAGATGAGTCAAGGCGCGTTAAGAAG	240
AtBR2	ACTAAGCGACGCGGTGCAAGGATTTCCGGTAGGAAGATGAGTCAAGGCGCGTTAAGAAG	240
AtBR1	ACTAAGCGCGGTGCAAGGATTTCCGGTAGGAAGATGAGTCAAGGCGCGTTAAGAAG	240
AtBR3	GTTCTTGAGAAGTTATCAACAGAAGGTTATAGCTTTGGGAATGCGATTGATTGAAGTCT	300
AtBR2	GTTCTTGAGAAGTTATCAACAGAAGGTTATAGCTTTGGGAATGCGATTGATTGAAGTCT	300
AtBR1	GTTCTTGAGAACTTGTCTTCTGATGGGTTTAACTTTGGGAATCCGATTGATCTTAAGAGC	300
AtBR3	CATTGGGCTAGACATGGAACCAATAAGTTTGTACGATCAGATAA	345
AtBR2	CATTGGGCTAGACATGGAACCAATAAGTTTGTACGATCAGATAA	345
AtBR1	CATTGGGCAAGACATGGAACCAATAAGTTTGTACGATCAGATAA	345

Abb. 4.11: Alignment der zum RNA Silencing verwendeten 345 Basen langen C-terminalen AtBR3 Sequenz mit den homologen Bereichen der AtBR1 und AtBR2 Sequenzen. Blau unterlegt sind die mit AtBR3 identischen Basen.

5.11.1 Aufbau und Replikation des SIPV-Konstrukts

Das doppelsträngige RNA-Genom des „silencing inducing plant virus“ Konstrukts (SIPV) (unveröffentlicht) wird von der viralen Replikase in den infizierten Zellen vermehrt. Die in Abb. 4.11.1 dargestellten Movement-Proteine dienen der Ausbreitung des Virus in angrenzende Zellen. Anstelle eines Virulens-Proteins, ohne das sich das Virus nicht auf andere Pflanzen übertragen kann, befindet sich das Gen für GFP. Eine GFP-Fluoreszenz kann damit als Marker für infizierte Zellen genutzt werden. Die Promotoren 1 und 2 bewirken die Transkription zweier unterschiedlich langer polycistronischer mRNAs. Das für GFP codierende Gen wird in beiden Transkripten abgelesen und in den infizierten Zellen exprimiert. Sowohl die GFP-, als auch die AtBR3-Teilsequenz liegen somit in den Zellen als doppelsträngige und als einzelsträngige RNA vor.

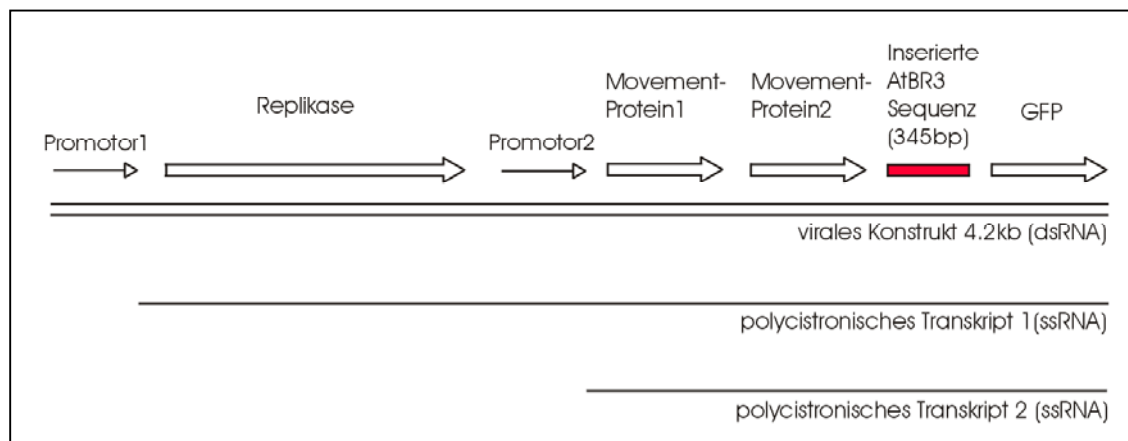


Abb. 4.11.1: Schematischer Aufbau des zum RNA Silencing verwendeten SIPV-Konstrukts mit den jeweiligen polycistronischen Transkripten.

5.11.2 Silencing von AtBR1-3 durch Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit SIPV

Die auf Sand gezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurden wie unter Punkt 3.6.6 beschrieben von dem Substrat befreit und das virale RNA-Konstrukt mit der Partikel Kanone in die Pflanzen eingebracht. Nach der Infektion wurden die Pflanzen wieder in Sand eingesetzt und bis zu den jeweiligen Auswertungen inkubiert.

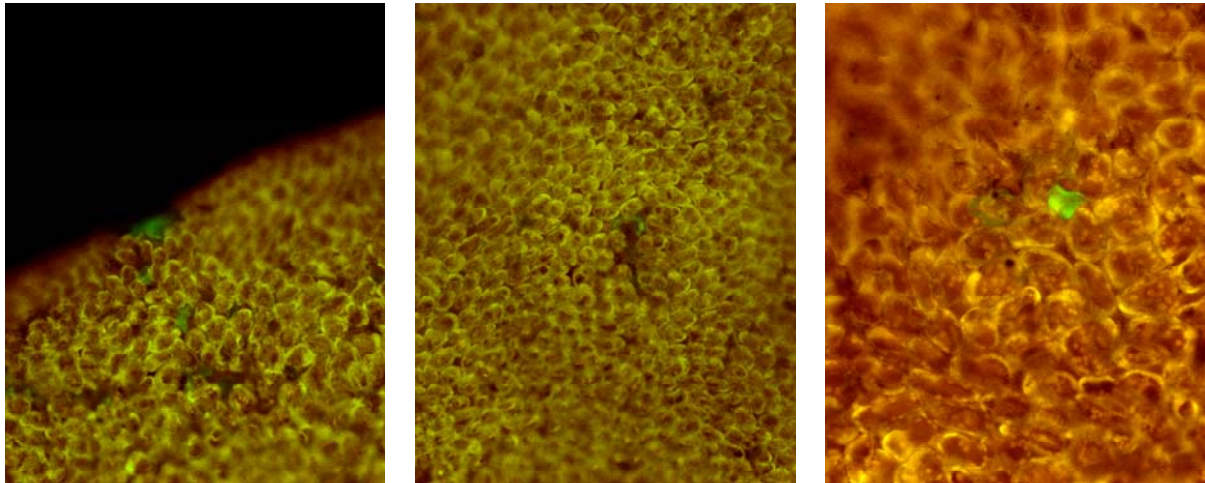


Abb. 4.11.2a: *Arabidopsis*-Blattgewebe einen Tag nach der Infektion mit dem SIPV-Konstrukt. Man erkennt die kraterartigen Verletzungen des Blattgewebes, die bei der SIPV-Infektion der jungen *Arabidopsis*-Pflanzen mit der Partikelkanone entstanden sind.

Direkt am Rand der Einschläge finden sich bereits vereinzelt grün fluoreszierende Zellen. Die grüne Fluoreszenz wird durch die Expression von GFP hervorgerufen, welches hier als Kontrolle für eine erfolgreiche Infektion mit dem RNA-Virus dient.

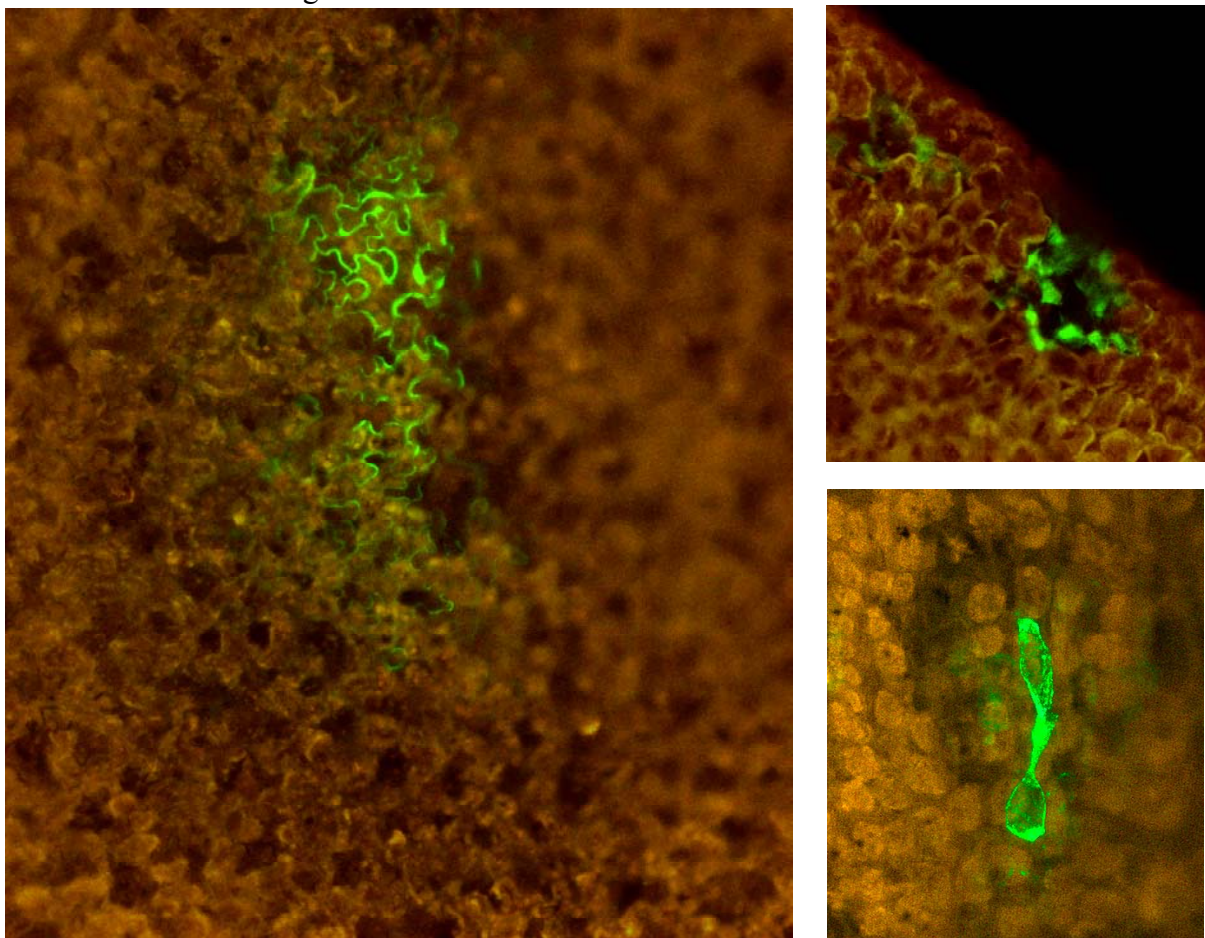


Abb. 4.11.2b: *Arabidopsis*-Blattgewebe vier Tage nach der Infektion mit dem SIPV-Konstrukt. In den Pflanzen erkennt man ganze Gruppen grün fluoreszierender Zellen, die eine Ausbreitung des Virus in angrenzenden Zellen um die Infektionsstellen anzeigen.

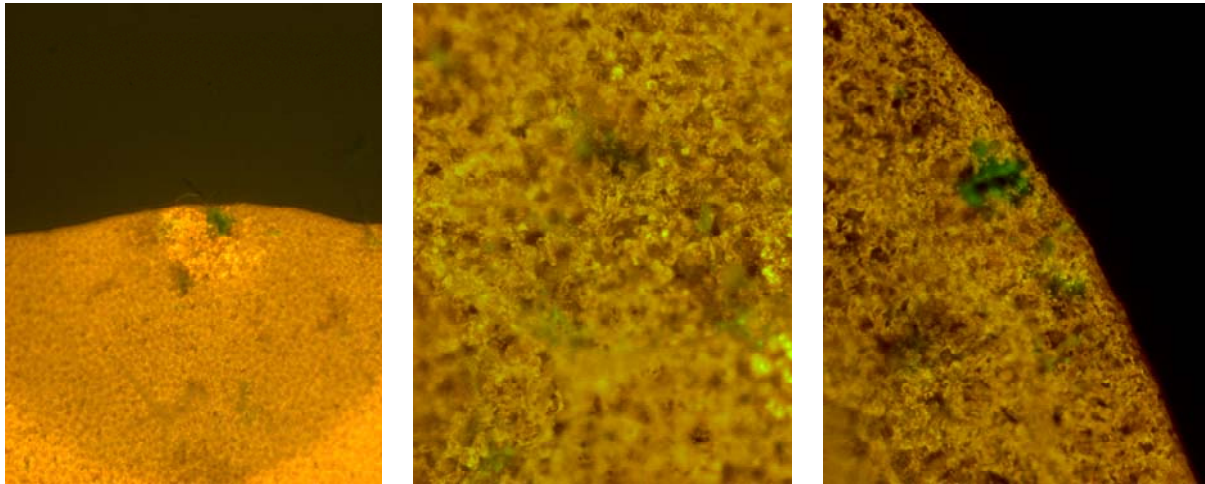


Abb. 4.11.2c: Arabidopsis-Blattgewebe acht Tage nach der Infektion mit dem SIPV-Konstrukt. Die Partikeleinschlagstellen zeigen nur schwache oder gar keine GFP-Fluoreszenz mehr.

Es wurden nach 1, 4, 8 und 13 Tagen Aufnahmen der beschossenen Pflanzenteile gemacht (Abb. 4.11.2a, b und c). Bereits nach einem Tag können in den mit dem SIPV-Konstrukt beschossenen Pflanzen nahe den Einschlagstellen der Mikrocarrier vereinzelt Zellen mit GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Vier Tage nach der SIPV-Infektion zeigt sich eine Ausbreitung des Virus in umliegende Gewebe. Ganze Zellgruppen zeigen eine GFP-Fluoreszenz, wobei primär infizierte Zellen eine stärkere Signalstärke erkennen lassen. Die Anzahl fluoreszierender Zellen ist bereits nach sechs Tagen rückläufig. Nach acht Tagen lassen sich nur noch einzelne Zellen in unmittelbarer Nähe der „Krater“ schwache GFP-Expression erkennen. Zusammenhängende fluoreszierende Zellgruppen lassen sich nicht mehr finden.

Dreizehn Tage nach der SIPV-Infektion lässt sich Lichtmikroskopisch in den beschossenen Geweben keinerlei GFP-Fluoreszenz mehr beobachten (ohne Abbildung).

Nach weiteren vier Wochen wurden pro Versuchsbedingung zehn SIPV-behandelte und zehn Kontrollpflanzen gleicher Größe und Gestalt mit 3µg Plasmid pro Schuss bestehend aus 2µg c1- beziehungsweise PPase1-Promotor-LUC Konstrukt und 1µg pFF19-GFP beschossen. Die Pflanzen wurden nach dem Beschuss in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Klarsichtdosen 48 Stunden bis zur mikroskopischen Auswertung der GFP-Fluoreszenz inkubiert. Nach insgesamt 52 Stunden erfolgte die Proteinextraktion zur Luciferase-Aktivitätsbestimmung. Die Inkubation bis zur Auswertung erfolgte in der Klimakammer (Einstellungen s.o.).

5.11.3 Indirekter Nachweis eines systemischen RNA Silencings durch GFP

Für die Untersuchungen der Promotoraktivitäten der BVA c1 und PPase1-Promotor-LUC-Konstrukte ist es erforderlich, ermitteln zu können, ob das Silencing nur partiell, oder systemisch in der ganzen Pflanze etabliert wurde. Eine Northern-Blot-Analyse ist hierfür ungeeignet, da dabei eine Bestimmung der Gesamtmenge einer bestimmten mRNA in den eingesetzten Geweben erfolgt. Die Transkription von Transkriptionsfaktoren wie z.B. pflanzlicher AtBR-Proteine ist sehr gering und die entsprechende mRNA quantitativ schwer zu erfassen. Für eine Northern-Blot-Analyse müssten daher methodisch bedingt aus mehreren *Arabidopsis*-Blättern oder mehreren Pflanzen RNA extrahiert werden um genug Material für einen Blot zu erhalten. Die dazu verwendeten Pflanzenteile sind für weitere Untersuchungen wie die der LUC-Aktivitätsbestimmung nicht mehr zu verwenden. Des Weiteren kann man keine Aussage über die lokale Ausbreitung des Silencings innerhalb der Pflanze machen.

Aus diesem Grund wurde ein indirekter Nachweis des Silencings durch ein erneutes Bombardment der infizierten Pflanzen mit dem GFP-Expressionsvektor pFF19-GFP durchgeführt. Die Ausbildung eines systemischen Silencings gegen das SIPV-Konstrukt mit seinem internen GFP-ORF sollte dann eine erneute Expression von GFP verhindern. Das Ausbleiben der GFP-Fluoreszenz infizierter *Arabidopsis*-Pflanzen im Vergleich mit nicht infizierten Kontroll-Pflanzen ist daher ein indirekter Nachweis zum Silencing des SIP-Virus und damit auch von AtBR3 (und seinen Homologen AtBR1 und 2). Die große Homologie der in das Virus-Genom klonierten 345bp-langen C-terminale Domäne der AtBR3-Sequenz mit AtBR1 und AtBR2 lässt erwarten, dass diese ebenfalls vom Silencing betroffen sind und für weitere Transkriptionsregulationen nicht mehr zur Verfügung stehen werden.

Die Pflanzen sind je einmal sowohl von der Blattoberseite als auch von der Blattunterseite beschossen worden. Dabei wurden nicht nur die älteren Blätter getroffen, die bei den gesilenceten Pflanzen im ersten Beschuss infiziert wurden, sondern hauptsächlich frische Blätter die den Grossteil der Pflanzen in diesem Alter ausmachen.

Keine der gesilenceten Pflanzen zeigten, weder in alten noch in neuen Blättern, eine Expression von GFP. Dagegen zeigten alle Kontrollpflanzen an den meisten Einschlagstellen der Mikrocarrier eine GFP-Fluoreszenz.

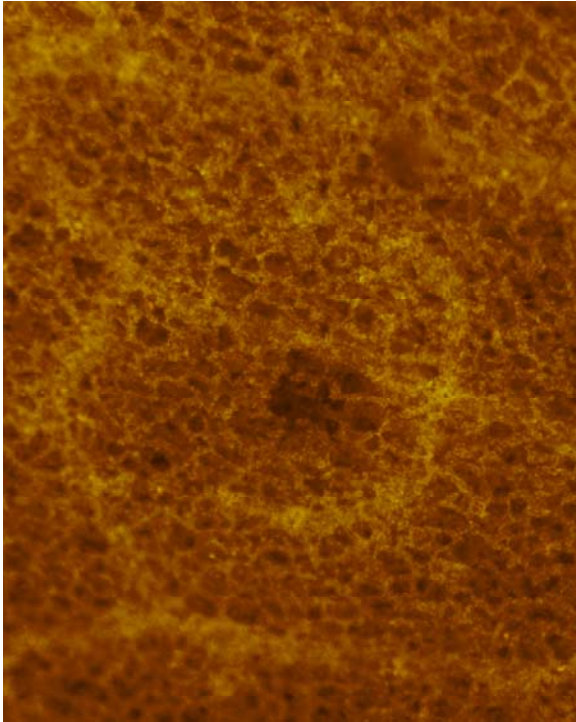


Abb. 4.11.3a: Lichtmikroskopische Aufnahme eines *Arabidopsis*-Blattes mit Partikeleinschlagstelle 48 Stunden nach Beschuss mit 2 μ g pBVA c1 und 1 μ g pFF19-GFP. Die Pflanze wurde vier Wochen vorher mit dem ssRNA-SIPV-Konstrukt zum Silencing der Transkriptionsfaktoren AtBR1, 2 und 3 infiziert. Es sind keinerlei Anzeichen einer GFP-Expression erkennbar.

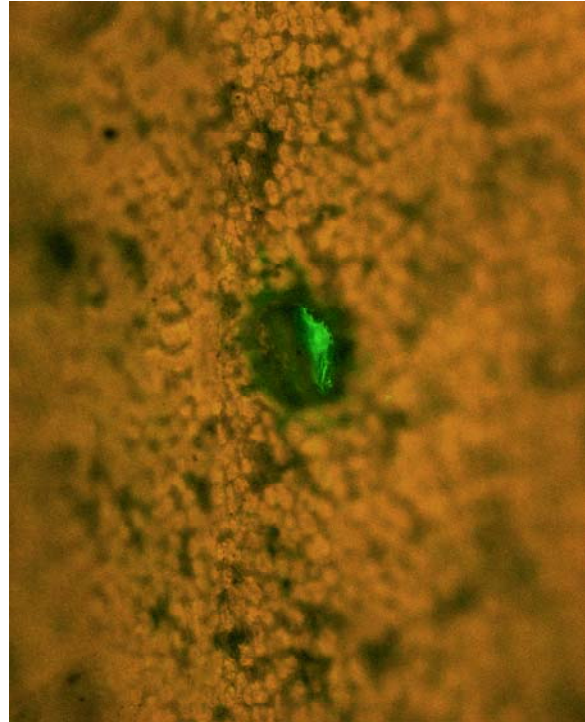


Abb. 4.11.3b: Aufnahme einer Partikeleinschlagstelle in einem Blatt einer nicht mit dem SIPV-Konstrukt infizierten Kontrollpflanze. Innerhalb der Einschlagstelle und in der Peripherie erkennt man deutlich die Fluoreszenz von GFP. Außer dieser Beobachtung ließen sich zwischen SIPV-infizierten und den Kontrollpflanzen keine Unterschiede im Phänotyp der Pflanzen feststellen.

5.11.4 Aktivitätstest des BVA c1- und des BVP1-Promotors in gegen AtBR1, 2 und 3 gesilencten *Arabidopsis*-Pflanzen

Die Luciferase-Aktivität in mit dem SIPV-Konstrukt behandelten *Arabidopsis*-Pflanzen ist nach dem Beschuss mit pBVA c1 um ca. 50% geringer als in den c1 beschossenen nicht infizierten Kontrollpflanzen. Im Gegensatz dazu sinkt die gemessene Luciferase-Aktivität von mit pBVP1 beschossenen SIPV-infizierten *Arabidopsis*-Blättern nicht ab, sondern erfährt eine Erhöhung um ca. 64%.

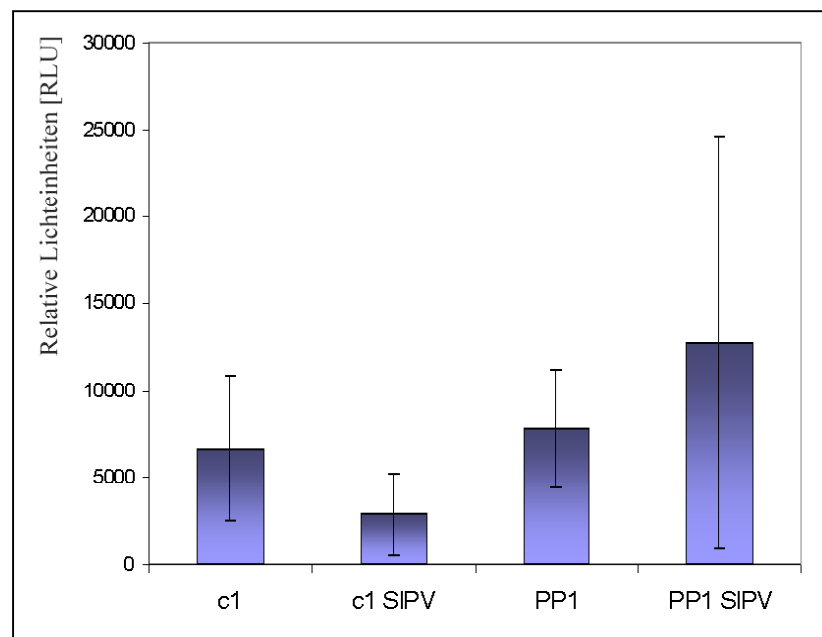


Abb. 4.11.4: c1- und PPase1-Promotor-Aktivität in AtBR1,2 und 3 gesilencten *Arabidopsis*-Pflanzen. Beschuss der Blätter von acht Wochen Pflanzen mit 3µg Plasmid/Schuss, bestehend aus 2µg c1- bzw. PPase1-Promoter-LUC-Konstrukt und 1µg pFF19-GFP. Zwei Schuss/Pflanze. Abgleich der Werte erfolgte über eingesetzte Menge FG. 10 Wiederholungen pro Wert. Die Auswertung erfolgte nach 52h Inkubation.

c1 und PPase1: LUC-Aktivitäten in den jeweiligen Kontrollpflanzen.

c1 SIPV und PPase1 SIPV: LUC-Aktivität in SIPV-infizierten Pflanzen.

6 Diskussion

Polypyrimidin-Sequenzen sind in einer Vielzahl in den Promotoren und 5'UTR-Sequenzen pflanzlicher Genome verbreitet (Beispiel: siehe Tabelle Ara-Genom). In dieser Arbeit wurden die Polypyrimidin-Sequenzen im Promotor und 5'UTR-Bereich der V-ATPase Untereinheit c1 aus *Beta vulgaris* für die Gesamtpromotoraktivität untersucht und eine Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben, die mit diesen Sequenzmotiven wechselwirkt. Durch eine konstitutive Expression des c1-Promotors und zusätzliche Induzierbarkeit durch z.B. Salzstress besitzt dieser Promotor und die darin enthaltenen Submotive sowohl wissenschaftliches Interesse als auch das Potential, wirtschaftliche Bedeutung zur Expression von Transgenen in pflanzlichen Systemen zu erlangen.

6.1 Die Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors sind für dessen Aktivität essentiell

Im BVA c1-Promotor liegen unmittelbar vor der TATA-Box und innerhalb der 5'UTR je eine Polypyrimidin-Box. Zur Aufklärung der Bedeutung dieser Boxen für die Promotoraktivität wurden zwei Konstrukte kloniert, in denen jeweils eine Box unter Beibehaltung der Gesamtlänge des Promotors mutiert wurde. Die resultierenden mutierten Boxen zeigen keine zusammenhängenden Polypyrimidin-Bereiche mehr (Abb. 4.1a und 4.1b).

Die resultierenden Konstrukte A-BC (Box1 mutiert, Position -46 bis -25) und AB-C (Box2 mutiert, Position +44 bis +63, Zahlangebe bezieht sich auf den Transkriptionsstart) zeigen eine stark unterschiedliche Promotoraktivität. Während nach der Mutation der Polypyrimidin-Box2 innerhalb der 5'UTR die Promotoraktivität um ca. 40% im Vergleich zum unmodifizierten c1-Promotor abnimmt, resultiert eine Mutation der Polypyrimidin-Box1 in eine Reduktion um 95%.

Dieser Befund zeigt zum einen die Bedeutung der Polypyrimidin-Boxen als einen funktionalen und maßgeblichen Bestandteil des c1-Promotors. Zum anderen weisen die unterschiedlichen Aktivitätseinbußen auf eine für jede einzelne Polypyrimidin-Box separate Regulation hin und sprechen somit gegen eine funktionale Kooperation der Boxen, da in diesem Falle gleichartige Aktivitätsverluste der Promotoraktivitäten zu erwarten gewesen wären.

Einen starken Einbruch der Promotoraktivität konnten auch Enjuto (1995) und He (2002) durch Veränderungen der Lage und Sequenz von Polypyrimidin-Boxen in Promotoren und 5'UTR verschiedener Gene erreichen. Enjuto bewirkte durch die Deletion einer Sequenz von 49 Basen in der 5'UTR des HMGA2-Promotors, in der eine von zwei Polypyrimidin-Boxen lokalisiert ist, einen Aktivitätsverlust von 80% in transient transformierten *Arabidopsis* Protoplasten. Dieser Deletionspromotor war im Gegensatz zum Ausgangskonstrukt mit beiden Polypyrimidin-Boxen nicht mehr in der Lage in meristematischen Geweben transgener Tabak-Pflanzen die Transkription des Reportergens Glucuronidase zu induzieren.

Meristematische Charakteristika weisen generell auch die Zellen von Suspensionskulturen auf, in denen die Promotoraktivitäten der modifizierten c1-Promotor-LUC Konstrukte getestet wurden. Es ist daher möglich, dass die extremen Aktivitätsverluste zum Teil auf eine veränderte zelltypspezifische Promotoraktivität zurückzuführen sind.

Während Rustighi (2001, 2002) die Funktionalität der Polypyrimidin-Boxen im HGMA2-Promotor auf die Ausbildung einer Hoogsteen-DNA zurückführt, spricht gegen das Auftreten von H-DNA Motiven im c1-Promotor der große Abstand der beiden Polypyrimidin-Motive mit 68 Basenpaaren. Weiterhin können weder im c1- noch im PPase1-Promotor mit einem analog zum HGMA2-Promotor von Rustighi durchgeführten S1-Verdau Anhaltspunkte für eine H-DNA Konformation ausgemacht werden (ohne Abbildung).

Obwohl es keine Hinweise auf die Ausbildung von H-DNA-Strukturen im c1-Promotor gibt, könnte die Polypyrimidin-Box2 dennoch an einer Strukturbildung beteiligt sein. Die innerhalb der Polypyrimidin-Box2 auftretende Sequenz 5' TTTTCTCT 3' bildet mit einer im Abstand von 12 Basen liegenden Sequenz 5' AGAGAAA 3' ein palindromisches Sequenzelement, welches bei entsprechender Faltung zu einer kreuzförmigen (engl. cruciform) DNA-Struktur führen kann, wobei jeder DNA-Zweig eine vollständige B-Form der DNA darstellt. Solcher Art Motive bilden sich nur als vorübergehende Strukturveränderungen in einer DNA, die unter ungewöhnlicher Drehspannung steht (Htun 1988). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Polypyrimidin-Box2 an der Ausbildung einer cruciform-Struktur in der 5'UTR beteiligt ist und eine solche Struktur somit eine Bedeutung für die Transkription besitzt. Das beschriebene Sequenzmotiv könnte auch lediglich auf RNA-Ebene relevant sein und durch eine intramolekulare Faltung Auswirkungen auf die RNA-Reifung, beziehungsweise Translation besitzen (ohne Abb.).

Die Polypyrimidin-Box1 besitzt die Möglichkeit zur Ausbildung sekundärer Strukturen nicht. Die Mutationsversuche der Polypyrimidin-Box1 (Konstrukt AB-C) belegen eine funktional wichtigere Rolle für die c1-Promotor-Aktivität. Jedoch sprechen die in Größe und interner Struktur sehr ähnlichen Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 für eine prinzipiell gleichgeartete Funktionsweise, so dass eine in Relation zum Transkriptionsstart beziehungsweise zur TATA-Box ortsabhängig bedingte größere Bedeutung der Polypyrimidin-Box1 möglich ist. Wenn von einem gleichgeartetem Wirkmechanismus beider Polypyrimidin-Boxen ausgegangen wird, so können alternative DNA-Strukturen als Grundlage der Funktion der Polypyrimidin-Boxen ausgeschlossen werden.

Die Fragestellung, ob die Promotor-Aktivitätsverluste bei Mutation der Polypyrimidin-Box2 auf Transkriptionsinitiations- oder Translationsebene zurückzuführen ist, könnte die Klonierung und Aktivitätsmessung eines weiteren Konstruktes erbringen, indem ausschließlich das zu Polypyrimidin-Box2 palindromische Polypurin-Motiv 3'-seitig der Box2 modifiziert wird. Sollte eine veränderte Faltung der mRNA Ursache für die Aktivitätsverluste des AB-C-Konstrukt sein, so ist unter Verwendung des neuen Konstrukts eine äquivalente Abnahme der zu messenden Reporter-Gen-Aktivität zu erwarten. Für den Fall, dass ein Transkriptions-Aktivatorprotein durch die Mutation der Polypyrimidin-Box2 nicht mehr an diese binden kann, sollte sich die Promotoraktivität des neuen Konstrukts im Vergleich zum c1-Promotor nicht wesentlich verändern.

6.2 Die Mutationen der Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors sind unerheblich für eine sequenzinduzierte Beugung der DNA

Eine doppelsträngige DNA-Helix kann eine sequenzinduzierte Beugung seiner räumlichen Struktur durch ein gehäuftes Auftreten von Adenin-Nukleotiden in einem der beiden Stränge erfahren. Eine computergestützte Analyse von 300 Basenpaaren upstream des Translationsstarts mit den Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 ergeben für den c1-Promotor nur eine leichte Krümmung der DNA. Durch die Mutation der Polypyrimidin-Boxen 1 und 2 in den Konstrukten A-BC, beziehungsweise AB-C ergeben sich keine erkennbaren räumlichen Veränderungen der resultierenden DNA-Stränge (Abb. 5.2). Eine verminderte Promotoraktivität aufgrund einer veränderten sequenzinduzierten Beugung ist daher unwahrscheinlich.

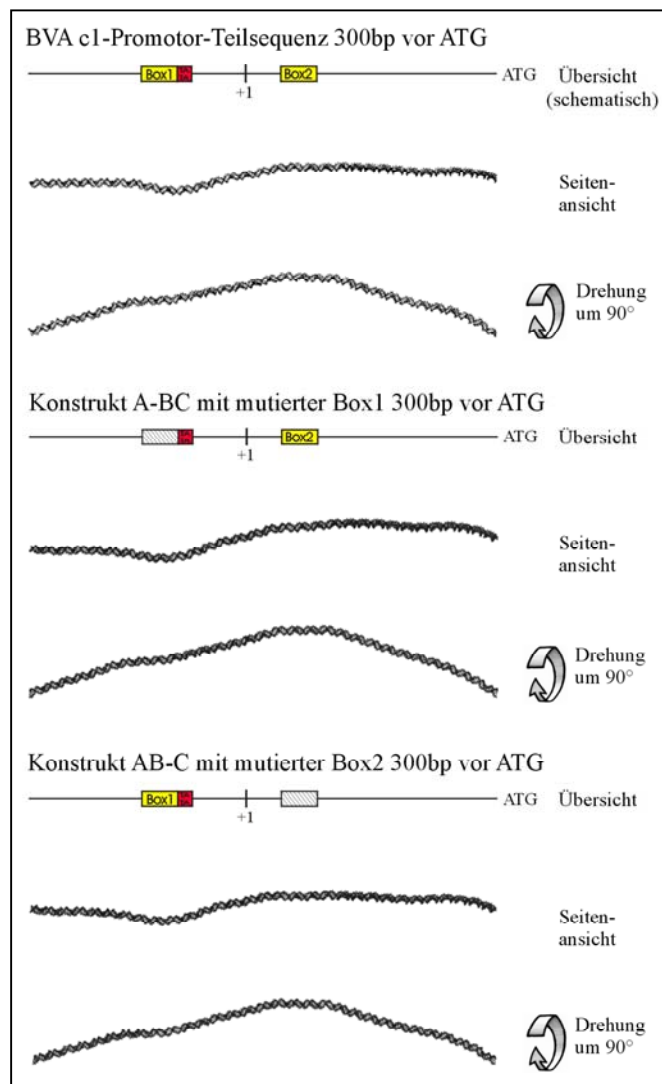


Abb. 5.2: Computergestützte dreidimensionale Darstellung 300 Basen upstream des Translationsstarts des unmodifizierten c1-Promotors mit beiden Polypyrimidin-Boxen im direkten Vergleich zu den Konstrukten A-BC (Box1 mutiert) und AB-C (Box2 mutiert) (Programm RasMol Version 2.6).

Im Folgenden werden durch verschiedene Versuchsansätze die Funktionsweise der beiden Polypyrimidin-Boxen beleuchtet. Bedingt durch den beobachteten größeren Einfluss der Polypyrimidin-Box1 auf die Gesamtpromotoraktivität konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen weitgehend auf die Eigenschaften der Polypyrimidin-Box1 in voller Länge, beziehungsweise auf die Analyse interner Submotive.

6.3 Die Mutation einzelner Basen innerhalb der Polypyrimidin-Box1 resultiert in starke Verluste der Promotoraktivität

Da die Polypyrimidin-Box1 maßgeblich für die Promotoraktivität des c1-Promotors verantwortlich zeichnet, wurden Einzelbasenmutationen in der Polypyrimidin-Box1 des c1-Promotors erzeugt und die Aktivitäten dieser Konstrukte im Vergleich zum Ausgangskonstrukt auf deren Promotoraktivitäten im Particle Bombardment untersucht (Punkt 4.3). Dabei konzentrierten sich die hergestellten Konstrukte auf den Beginn des in beiden Polypyrimidin-Boxen vorhandenen Submotivs TTTCTCT. In diesem Motiv wurde das zweite Thymin der Polypyrimidin-Box1 gegen ein Cytosin und beziehungsweise gegen ein Adenin ausgetauscht. Sollte allein die Existenz einer Polypyrimidin-Box einer gewissen Größe oder eine Anhäufung alternierender CT-Basen für die hohen gemessenen Promotoraktivitäten des c1-Promotors mit funktionalen Polypyrimidin-Boxen ausreichen, so sollte sich in diesem ersten Konstrukt die Promotoraktivität nicht maßgeblich verändern.

Tatsächlich ergab der Austausch des zweiten Thymins innerhalb der Polypyrimidin-Box1 durch ein Cytosin eine Verringerung der Gesamt-Promotoraktivität um ca. 60%. Durch diesen Einzelbasenaustausch ist die in der Polypyrimidin-Box enthaltene TC-Folge von einer vierfachen TC-Alternierung zu einer fünffachen erweitert worden. Die Gesamtlänge der Polypyrimidin-Box blieb dabei konstant. Jedoch zeigt ein Basenaustausch des Thymins an gleicher Stelle gegen ein Adenin keine negativen Auswirkungen auf die Aktivität des c1-Promotors. Eine Verkürzung des Polypyrimidin-Motives durch Unterbrechungen mit einer Adenin-Base hätte eine Verringerung der c1 Promotor-Aktivität erwarten lassen. Analog dazu führte eine Mutation des achten Thymins durch ein Adenin innerhalb der Box1 zu keiner Reduktion der Gesamtpromotoraktivität.

Der starke Aktivitätseinbruch durch den Austausch einer einzelnen Base im Konstrukt QCT2C kann als Hinweis auf eine sequenzspezifische Interaktion mit einem unbekanntem Transkriptionsfaktor gedeutet werden. Möglicherweise sind sterische Gründe für eine differenzierte Aktivität des Motivs nach dem Austausch eines Nukleotids durch zwei unterschiedliche Basen verantwortlich. Sangwan (2002) zeigt, dass die Bindung eines Polypyrimidin/Polypurin-bindenden Transkriptionsfaktors an den Antisensestrang von Polypyrimidin-Motiven erfolgt ^{*1}. Die Mutation des 2. Thymins in ein Adenin (auf dem Sense-Strang) im Konstrukt QCT2A (Tabelle 4.3) bewirkt auf dem Antisense-Strang das Auftreten eines Thymins an dieser Position. Ein Thymin besitzt mit seinem Pyrimidin-Ring eine geringere räumliche Ausdehnung als ein Purin-Ring im Konstrukt QCT2C in welchem der Einzelbasenaustausch durch ein Cytosin erfolgte. Daher ist eine reduzierte Promotoraktivität im Konstrukt QCT2C aus rein räumlichen Gründen durch eine geringere Affinität eines putativen Transkriptionsfaktors aus *Beta vulgaris* denkbar (Punkt 4.10.4).

Anmerkung *1: Zum Zeitpunkt der Versuche lag die Publikation von Sangwan et al. (2002) noch nicht vor.

6.4 Die Aktivität des c1-Promotors ist unabhängig von der dam-Methylierung der eingesetzten Plasmid-DNA im Particle Bombardment

Eukaryoten besitzen andere Methylierungsmuster als Prokaryoten (Nelson et al., 1991, Bickmore et al., 1992). Die Base Cytosin kann in Eukaryoten zu 5'-Methylcytosin methyliert werden, wenn sie 5'-seitig vor einem Guanin lokalisiert ist. In Prokaryoten können ebenfalls Cytosinbasen als 5'-Methylcytosin vorliegen. Weiterhin kann Adenin als 6'-Methyladenin vorkommen.

Da im Particle Bombardment sowohl Plasmide aus dam-positiven, als auch aus dam-negativen Bakterienstämmen eingesetzt wurden, sollte ein möglicher Einfluss methylierter beziehungsweise nicht methylierter Plasmid-DNA auf die Promotoraktivität des c1-Promotors untersucht werden.

Eine Methylierung von Promotor- oder Gensequenzen führt bei den meisten Eukaryoten in der Regel zu einer Verringerung der jeweiligen Genaktivität (Razin et al., 1984). Methylierung von DNA spielt auch bei der Kondensation von DNA und der Inaktivierung, beziehungsweise dem Silencing von Genen eine wichtige Rolle (Thomas et al., 2001). Die Mechanismen, die zur Methylierung im Rahmen der Genregulation führen sind noch weitgehend unbekannt. Es finden sich aber Indizien, dass u.a. auch beim RNA-Silencing eine genspezifische Methylierung von DNA-Abschnitten ausgelöst werden kann, um die Transkription bestimmter Sequenzen zu unterbinden (Jones et al., 1999).

In dem in Abb. 4.4 im Agarosegel aufgetrennten Restriktionsendonuklease-Verdau ist im Vergleich der verdauten Plasmid-DNA des c1-Promotor-LUC-Konstrukts deutlich zu sehen, dass Plasmide aus dem XL1blue *E.coli*-Bakterienstamm von der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *DpnI* nicht geschnitten werden können. Das Isoschizomer *Sau3AI*, welches methylierungstolerant ist, kann die Plasmide dagegen schneiden. Das sich ergebende Bandenmuster ist mit dem Verdau der Plasmide aus dem dam-negativen *E.coli*-Bakterienstamm K12 identisch. Daraus ergibt sich, dass in Plasmiden aus dem Bakterienstamm XL1blue alle potentiellen Schnittstellen für *DpnI* tatsächlich methyliert vorliegen.

Im folgenden Particle Bombardment (Tabelle 4.4) konnten jedoch keine Unterschiede in der Promotoraktivität des c1-Promotors gemessen werden, obwohl innerhalb des Promotors und der 5'-UTR jeweils drei potentielle *DpnI*-, beziehungsweise *Sau3AI*-Schnittstellen (Positionen -564, -90 und -5 beziehungsweise Positionen +27, +135 und +143) vorkommen. Dieses Ergebnis schließt Verfälschungen der gemessenen Promotoraktivitäten durch die Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme zur Gewinnung der im Particle Bombardment eingesetzten Plasmide aus und zeigt die Unabhängigkeit der c1-Promotoraktivität vom Grad der dam-Methylierung.

6.5 Die Insertion eines Polypyrimidin-Box1 Oligonukleotids in den schwachen At-C/VIF-1 Promotor führt zu dessen Aktivitätsverlust.

Da die Mutation der Polypyrimidin-Box1 im c1-Promotor diesen fast völlig inaktivierte, stellte sich die Frage, ob allein die Existenz einer Polypyrimidin-Box1 in unmittelbarer Nähe einer TATA-Box zur Erhöhung der Aktivität eines schwachen Promotors ausreichend ist. Der Promotor des Invertaseinhibitor At-C/VIF-1-Gens (AT1) aus *Arabidopsis thaliana* besitzt keine Polypyrimidin-Sequenzen und ist sowohl in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen als auch im Particle Bombardment in *Arabidopsis*- und *Beta*-Zellsuspensionskulturen als schwach einzustufen. In transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, in die der AT1-Promotor mit β -Glucuronidase als Reportergen stabil transformiert wurde, zeigte sich eine Expression im Phloem der Leitgewebe. (Link, unveröffentlicht). Die Insertion eines doppelsträngigen Oligonukleotid mit der Sequenz der Polypyrimidin-Box1 erfolgte über eine im Promotor vorhandene *KpnI* Schnittstelle welche 5'-seitig 20 Basen vor der TATA-Box liegt (siehe Anhang).

Die Insertion der Polypyrimidin-Box1 in den AT1-Promotor resultierte in ein völliges Erliegen der Promotor-Aktivität (ohne Abbildung). Auch das Einfügen von einer Polypyrimidin-Box1 mit den im c1-Promotor vorkommenden flankierenden Adeninen und die Insertion in antisense-Orientierung bewirkten anstatt einer verstärkten Aktivität des Reportergens Luciferase die völlige Unterbindung der Promotoraktivität.

Es lässt sich feststellen, dass die Insertion einer Polypyrimidin-Box allein nicht ausreichend ist, um eine Aktivierung eines schwachen Promotors zu bewirken. Dabei darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass durch das Einfügen des Oligonukleotids die internen Abstände der TATA-Box zu 5'-seitig vorhandenen Regulatorischen Elementen um 25 Basenpaare verschoben wurden. Solche Insertionen können möglicherweise sequenzspezifische Interaktionen zwischen basalen Transkriptionsfaktoren und weiteren regulatorischen Motiven stören (He et al., 2002, Drazinic et al., 1996).

Es ist auch möglich, dass durch das Fehlen von weiteren Bindemotiven und deren Wechselwirkung mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren eine Polypyrimidin-Box gesteuerte Promotoraktivierung ausbleibt (Drazinic et al., 1996).

Die Ergebnisse belegen, dass Polypyrimidin-Box-Motive in unmittelbarer Nähe der TATA-Box und innerhalb der 5'UTR entsprechender Promotoren wie dem c1-Promotor zur jeweiligen Aktivität notwendig (Punkt 4.2), jedoch nicht hinreichend sind.

6.6 Die c1-Proromotoraktivität kann im Cobombardment mit 100fachen Überschuss von ds c1-Promotorfragmenten nicht kompetiert werden

Die Wirkung von Polypyrimidin-Sequenzen in den Promotoren von Pflanzen kann durch Wechselwirkung mit entsprechenden potentiellen Transkriptionsfaktoren entstehen. Die Anzahl von Transkriptionsfaktoren pro Zelle ist begrenzt. Wenn ein Transkriptionsfaktor durch seine Wechselwirkung mit der DNA an der Regulation der Transkription beteiligt ist, so könnte das Einbringen homologer Sequenzen eine Konkurrenz bewirken, die sich in einer Reduktion (bei aktivierender Wirkung) oder einer Aktivierung (bei hemmender Wirkung) der c1-Promotoraktivität messen ließe.

Eine Konkurrenz lässt sich nur dann zeigen wenn ein bei der Transkriptionsregulation beteiligter limitierender Faktor so stark „abgefangen“ werden kann, dass ein messbarer Unterschied zur Vergleichsbedingung auftritt. Die verwendete Methode des Particle Bombardments ist hierbei ein begrenzender Faktor. Einerseits sollen die Mikrocarrier mit möglichst viel Konkurrenz-DNA beladen werden, um die Aussicht auf eine Konkurrenz zu erhöhen. Diese Menge ist jedoch auf ca. 3µg pro Schuss begrenzt. Andererseits muss die Menge des eingesetzten funktionalen c1-Promotor-LUC-Konstrukts hoch genug sein, um ein messbares und sauberes Signal zu erhalten. Diese Mindestmenge liegt bei ca. 0,1µg funktionalem c1 Promotor-LUC-Konstrukt.

In den hier verwendeten Versuchsbedingungen konnte jedoch keine spezifische Konkurrenz durch die verwendeten inaktivierten Promotorsequenzen beobachtet werden.

Die stetige Abnahme der c1-Promotor-LUC-Aktivität mit steigender Menge Konkurrenz-DNA im Versuch 4.5 ist höchstwahrscheinlich ein Artefakt das bei der Beladung der Mikrocarrier entsteht. Die Anzahl möglicher Bindestellen auf den Mikrocarriern ist begrenzt. Da die verwendete Menge an funktionalem c1-Promotor-LUC-Konstrukt konstant ist, konkurrieren die Plasmide mit steigender Menge DNA um diese Bindestellen. Die Abnahme der c1-Promotoraktivität resultiert also wahrscheinlich aus einer Verdrängung der Plasmide von den Bindestellen der Mikrocarrier durch die Konkurrenz-Vektoren. Innerhalb der eingesetzten Konkurrenz-Konzentrationen erkennt man eine Erhöhung der gemessenen Luciferase-Aktivität (Abb. 4.5). Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Beladungsartefakt. Die eingesetzten Mengen Plasmid innerhalb der Konkurrenzbedingungen sind zwar konstant, aber die Länge der linearisierten Konkurrenz-Vektoren ist verschieden. Der Vektor pBlueSK⁺ besitzt eine Länge von ca. 3kb. Die zur Konkurrenz eingesetzten nicht funktionalen c1-Promotorkonstrukte Del. -55 und -863 haben eine Länge von 5,5 beziehungsweise 6,3kb. Es gibt eine Korrelation zwischen der Länge der linearisierten Konkurrenzvektoren und der c1-Promotoraktivität in trans, welche auf eine unterschiedliche Beladung der Wolfram-Partikel zurück zu führen ist.

Aus dem Versuch 4.5 ist ersichtlich, dass die zu einer Regulation des c1-Promotors beitragenden Transkriptionsfaktoren innerhalb der Versuchsparameter nicht limitierend gewesen sind. Nur wenn die Anzahl der eingebrachten Plasmide und Konkurrentensequenzen so

hoch ist, dass das Verhältnis der DNA-Bindemotive zu den entsprechenden regulatorischen Proteinen der jeweils transformierten Zelle stark verschoben wird, würde dies eine Reduktion der Promotoraktivität zur Folge haben.

Es ist zu beobachten, dass die gemessene Luciferase-Aktivität bei gleicher Menge funktionalem c1-LUC-Konstrukt mit der Länge der im Cobombardment eingesetzten Vektoren ohne c1-Promotorelemente ansteigt.

Die pro Schuss eingesetzte Menge DNA ist innerhalb der Bedingungen konstant. Die Länge der verwendeten Vektoren ist aber verschieden. Die Länge des pBLUE-Vektors beträgt 2961 Basenpaare. Die pGEM-T c1 Promotordeletionen betragen für pGEM-T –55 3230bp und für pGEM-T –863 4038bp. Es zeichnet sich ein Zusammenhang der verwendeten Vektorlänge mit der beobachteten Luciferase-Aktivität ab. Dies ist auf eine unspezifisch verbesserte Beladung der Mikrocarrier durch längere, lineare Vektoren zurückzuführen (Southgate et al., 1995). Jedoch ist der zu beobachtende Effekt innerhalb der sich ergebenden Streuung der Werte kritisch zu bewerten.

Bei einer Annäherung der maximalen Beladungskapazität der Wolfram-Partikel mit DNA (ca. 5µg) besteht keine lineare Dosisabhängigkeit von eingesetzter DNA-Menge und der tatsächlich gebundenen Nukleinsäure an den Partikeln mehr. Diese Beobachtung kann auf eine Annäherung der maximalen Beladungskapazität von ca. 5µg Nukleinsäuren / Schuss der eingesetzten Menge Mikrocarrier (ca. 3mg) in Versuch 4.5 zurückgeführt werden. Da jedoch die eingesetzte Menge der funktionalen Plasmids pBVA c1 in allen Bedingungen konstant ist, konkurrieren alle Nukleinsäuren bei steigender Konzentration um die Bindung an die Mikrocarrier. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist dieser Befund als signifikant einzustufen. Dieser Umstand muss bei zukünftigen Versuchsplanungen berücksichtigt werden.

Um größere Mengen von Kompetitions-DNA einsetzen zu können, wurden in einem weiteren Versuch doppelsträngige Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotide im molaren Überschuss von 100:1 mit dem funktionalen pBVA c1-LUC eingesetzt (Tabelle 4.5). Jedoch konnte auch hierbei keinerlei veränderte Promotor-Aktivität beziehungsweise veränderte Luciferase-Aktivität verzeichnet werden.

Offenbar reichen die in den Particle Bombardment eingesetzten Mengen Kompetitions-DNA nicht aus, um eine spezifische Kompetition auszulösen. Es ist naheliegend, die eingesetzten Versuchsparameter als nicht ausreichend beziehungsweise die in den jeweils transformierten Zellen vorhandenen Transkriptionsfaktoren als zu zahlreich anzusehen. Dabei ist bei der ballistischen Transformation bisher ungeklärt, in welchem Umfang von der auf den einzelnen Partikeln haftenden DNA tatsächlich auch in die Zellen beziehungsweise Zellkerne durchschnittlich eingebracht wird. Methodisch bedingt tragen nur die getroffenen Zellen zur messbaren Luciferase-Expression bei, die durch den Partikelbeschuss nicht zu stark beschädigt wurden, da diese sonst absterben. Es ist unwahrscheinlich, dass alle Partikel ausschließlich in Zellkernen stecken bleiben, die anhaftende DNA nur dort in Lösung geht und die Zelle überlebt. Daher ist anzunehmen, dass die einzelnen transient transformierten Zellen nur einen Bruchteil der auf den Partikeln haftenden DNA auch tatsächlich in physiologische Prozesse umsetzen.

Aufgrund dieser Überlegungen kann von der eingesetzten Beladungsdichte der Partikel mit Kompetitor-, beziehungsweise funktionaler DNA nicht auf die Menge oder in den Zellen vorkommender Transkriptionsfaktoren geschlossen werden.

6.7 Der GAGA-Transkriptionsfaktor aus *D. melanogaster* bewirkt im Cobombardment auf *Beta*-Suspensionskultur keine spezifische Aktivitätserhöhung des BVA c1-Promotors

Ein grundsätzlich anderer Aktivierungsmechanismus der Transkription liegt den Polypyrimidin/Polypurin-Sequenzen in dem Promotor des *fushi tarazu*-Gens aus *Drosophila melanogaster* zu Grunde, welche durch die spezifische Bindung des GAGA-Faktors an GAGAG-Sequenzmotive erfolgt (Okada et al., 1998). Der GAGA-Transkriptionsfaktor fungiert als eine Art Antirepressor, indem er durch seine Bindung die Nukleosomen von der DNA verdrängt (Farkas et al., 1994). Durch die Bindung mehrerer GAGA-Faktoren an mehrere Polypyrimidin/Polypurin-Motive eines Promotors führt die Multimerisierung der GAGA-Faktoren untereinander zu einer lokalen Knickbildung der DNA. Dadurch wird die Aktivierung des betreffenden Promotors durch eine Exposition aus dem Chromatingerüst erreicht. Somit erhöht sich die Zugänglichkeit für weitere Transkriptionsfaktoren, die erst sekundär eine verstärkte Transkription des betreffenden Promotors bewirken (Verrijzer et al., 1999, Katsani et al., 1999). Dabei besitzt der GAGA-Transkriptionsfaktor eine hohe und spezifische Bindeaffinität zu doppelsträngiger sowie zu dreifachsträngiger H-DNA mit GAGAG-Motiven. Die Bindung des GAGA-Transkriptionsfaktors erfolgt über die kleine Furche der DNA-Helix, welche sowohl in doppelsträngiger als auch in dreifachsträngiger DNA eine ausreichend ähnliche Konformation aufweist, um eine GAGA-Bindung zu ermöglichen (Jimenez-Garcia et al., 1998). Somit ist grundsätzlich die Bindung des GAGA-Faktors nicht von der Fähigkeit der Polypyrimidin-Sequenzen zur Ausbildung von H-DNA abhängig.

Versuche dem GAGA-Faktor homologe Proteine durch eine Datenbanksuche (NCBI 2002) auf DNA- oder Aminosäureebene zu finden, blieben in Pflanzen ohne Erfolg, obwohl entsprechende GAGA-Faktor-Bindemotive in vielen pflanzlichen Promotoren wie auch in den Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors, weit verbreitet sind. Zur Untersuchung auf funktionale Effekte des GAGA-Faktors aus *Drosophila melanogaster* auf die Promotoraktivität des c1-Promotors wurde der GAGA-Expressionsvektor pFF19-GAGA im Cobombardment mit dem c1-Promotor-LUC-Konstrukt pBVA-c1 in *Beta vulgaris* Zellsuspensionskultur via Particle Bombardment transformiert (Versuch 4.6). Dabei konnte keine spezifische Aktivierung der c1-Promotoraktivität durch den GAGA-Faktor nachgewiesen werden. Tatsächlich verringerten sich die abgeglichenen Luciferase-Aktivitäten durch das Cobombardment mit pFF19-GAGA um bis zu 20%. Der im pflanzlichen System beobachtete leichte Aktivitätsverlust des c1-Promotors kann durch mehrere Umstände bedingt sein. Zum einen könnten die mit pFF19-GAGA transformierten Zellen unspezifisch in ihrer gesamten Transkription beeinträchtigt sein, so dass selbst bei einer Aktivierung des c1-Promotors durch eine Wechselwirkung mit dem GAGA-Faktor eine erhöhte LUC-Expression ausbleiben, beziehungsweise sogar eine Verringerung der gemessenen LUC-Aktivität

erfolgen könnte. Andererseits könnte die Abnahme der LUC-Aktivität auf eine Verdrängung zelleigener Polypyrimidin-Motiv-bindender Proteine durch den GAGA-Faktor erklärt werden.

Die Aktivierung von Promotorsequenzen durch eine Bindung des GAGA-Faktors liegt hauptsächlich in der Exposition des betreffenden Gen-Abschnitts aus dem Chromatin-Gerüst begründet (Okada et al., 1998). Durch Particle Bombardment eingebrachte Plasmide sind jedoch nicht einer Kondensation vergleichbar mit genomischer DNA unterworfen, sondern liegen augenblicklich nach dem Beschuss frei in den transient transformierten Zellen vor. Insofern ist eine spezifisch erhöhte Transkriptionsrate durch eine GAGA-Faktor induzierte Exposition der betreffenden Plasmid-DNA unwahrscheinlich.

6.8 Die Beschreibung einer Proteinfamilie Polypyrimidin-bindender Transkriptionsfaktoren

Sangwan (2002) und Santi (2003) beschreiben das „GAGA binding protein“ (Gbp) aus der Sojabohne, beziehungsweise das „bareley brain protein“ (BBR) aus der Gerste, welche beide zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren gehören, die in der Lage sind, an Polypyrimidin-Motive zu binden und die Transkription von Promotoren mit solchen Motiven zu beeinflussen. Die Homologie der Aminosäuresequenz in der C-terminalen DNA-Bindedomäne dieser beiden Transkriptionsfaktoren beträgt 82% (Santi et al., 2003). Diese Proteine gehören zu einer Familie von Genen die auch in *Arabidopsis thaliana* vorkommt. Sieben der in identifizierten *Arabidopsis thaliana* BBR-homologen Proteine (AtBR) sind in Abb. 1.4.3a dargestellt. Die C-terminale DNA-bindende Domäne ist bei allen AtBR-Transkriptionsfaktoren sehr stark konserviert, wodurch eine gleichartige Motivbindung der einzelnen AtBR-Proteine sehr wahrscheinlich ist. Im Vergleich zu AtBR4 aus *Arabidopsis thaliana* beträgt die Homologie zu BBR aus der Gerste 77% und zu Gbp aus der Sojabohne 75%.

Um eine Bindung zwischen den Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors und den AtBR-Proteinen nachzuweisen, wurde die Methode des „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) verwendet. Damit eine spezifischen Interaktion belegt werden kann müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- A) Bei einer Wechselwirkung beziehungsweise Bindung von Sonde mit dem Protein muss eine Retardation der Sonde erfolgen, da der entstandene Komplex in der Gelmatrix eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit besitzt als die ungebundene, freie Sonde.
- B) Da eine vollständige Retardation der Sonde von der eingesetzten Menge Protein abhängig ist, muss die Retardation direkt proportional zur eingesetzten Menge Protein erfolgen. Die dabei auftretende Anzahl von Banden muss bei einer spezifischen Bindung der Anzahl der vorhandenen Bindestellen auf der Sonde entsprechen. Eine weitere Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge darf keinen weiteren Einfluss auf das Laufverhalten der Sonde haben.

- C) Alle Inhaltsstoffe einer EMSA-Reaktion (u.a. unspezifische Nucleinsäuren oder Proteine) dürfen ohne das native, putativ wechselwirkende Protein keinen Shift der eingesetzten Sonde bewirken.
- D) Die Komplexbildung aus Sonde und Protein muss mit unmarkierten doppelsträngigen Oligonucleotiden mit der Sequenz des potentiellen Bindemotivs kompetitierbar sein. Der Grad der Konkurrenz korreliert mit der eingesetzten Menge Oligonucleotide.
- E) Die Affinität eines DNA bindenden Proteins zur jeweils eingesetzten Sonde ist von der Übereinstimmung der Basensequenz mit dem optimalen Bindemotiv des Proteins mit der höchsten Bindungsenergie abhängig. Unterschiedliche Sondensequenzen lassen somit eine unterschiedliche Affinität des Proteins zu den jeweiligen Sonden erwarten.

Alle hier angeführten Kriterien sind im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet worden (siehe Ergebnisteil). Dazu wurde exemplarisch für alle AtBR-Proteine das Fusionsprotein Trx-AtBR4, zusammen mit verschiedenen biotinylierten c1-Promotorfragmenten im „electromobility shift assay“ (EMSA) verwendet, da sich dieses als erstes in ausreichender Reinheit und Menge aufzureinigen lies.

6.9 Spezifische Interaktion von AtBR-Proteinen mit den Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors

6.9.1 Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet an BVA c1-Promotor-Sequenzen

Es konnte in den Versuch 4.10.1 eine Retardation der A-BC Sonde nach Zugabe von Trx-AtBR4 Fusionsprotein gezeigt werden (Kriterium A). Diese Retardation der Sonde zeigt eine Komplexbildung mit dem zugesetzten Trx-AtBR4 an.

Eine weitere Vervielfachung der eingesetzten Proteinmenge bei konstanter Sondenkonzentration hat keinen weiteren Einfluss auf das Laufverhalten der retardierten Sonde (Kriterium B). Da die A-BC-Sonde nur eine intakte beziehungsweise unmodifizierte Polypyrimidin-Box enthält, entspricht die Ausbildung einer einzelnen retardierten Bande den Erwartungen für einen Polypyrimidin-bindenden Transkriptionsfaktor.

6.9.2 Hitzebehandeltes Trx-AtBR4 Protein besitzt keine Bindeaffinität zur c1-Sonde

Die meisten Proteine werden durch eine Hitzebehandlung irreversibel geschädigt und verlieren dadurch ihre charakteristische Funktionalität.

Zur Kontrolle, dass ein Shift der biotinylierten Sonde ausschließlich durch das native Trx-AtBR4 Fusionsproteins bewirkt wird, wurde im Versuch 4.10.2 das Trx-AtBR4 Fusionsprotein vor der Zugabe zur Bindereaktion für zwei Minuten auf 95°C erhitzt. Im direkten Vergleich ist kein Unterschied im Laufverhalten der Sonde ohne natives Protein oder mit hitzebehandeltem Trx-AtBR4 erkennbar. Das native Trx-AtBR4 bewirkt dagegen einen deutlichen Shift des SONDENSIGNALS. Somit können andere Faktoren außer dem rekombinanten Trx-AtBR4 Fusionsprotein als Ursache der beobachtenden Sondenretardation ausgeschlossen werden (Kriterium C).

6.9.3 Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet in vitro spezifisch die Polypyrimidin-Boxen des BVA c1-Promotors

In Versuch 4.10.2 kann eine Komplexbildung (von 75ng, beziehungsweise 1pmol) der Box1-Sonde mit Trx-AtBR4 durch die Zugabe von 20pmol unmarkierten Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotide nahezu völlig unterbunden werden. Eine weitere Erhöhung der Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotide zeigt keine weitere Veränderung im Laufverhalten der Sonde.

Auch durch die Zugabe von Polypyrimidin-Box2-Oligonukleotiden lässt sich die Komplexbildung kompetitieren. Es konnte somit eine spezifische Bindung von Trx-AtBR4 an die Polypyrimidin-Box1 gezeigt werden, die durch doppelsträngige Oligonukleotide mit Polypyrimidin-Sequenzen aus dem Komplex verdrängt werden kann (Kriterium D).

Durch den direkten Vergleich der beiden Sonden Box1-Sonde mit der Polypyrimidin-Box1 defizienten 0-Sonde (Siehe Tabelle 4.10) in Versuch 4.10.3 wird anschaulich die Polypyrimidin-Box-spezifische Bindeaffinität des Trx-AtBR4-Fusionsproteins nachgewiesen. Nur bei der Box1-Sonde mit der unmodifizierten Polypyrimidin-Box1 Sequenz ist eine starke Retardation der Sonde zu beobachten.

6.9.4 Rekombinantes Trx-AtBR4 bindet präferentiell Polypyrimidin-Box1

Auffällig ist die in Versuch 4.10.2 zu beobachtende weit geringere Kompetitionseffektivität der Polypyrimidin-Box2-Oligonukleotide im Vergleich zu den Polypyrimidin-Box1-Oligonukleotiden. Für eine vollständige Kompetition ist mehr als die doppelte Menge Polypyrimidin-Box2-Oligonukleotide nötig (Kriterium E).

Gestützt wird diese Beobachtung in Versuch 4.10.4, in dem im direkten Vergleich gleiche Mengen Box1-Sonde und Box2-Sonde zusammen mit steigenden Mengen Trx-AtBR4

Fusionsprotein im EMSA eingesetzt wurden. Es ist eine starke Präferenz des Trx-AtBR4 für die Box1-Sonde zu beobachten.

Die am Beispiel des Trx-AtBR4 Fusionsproteins gezeigte unterschiedliche Bindeaffinitäten zu den verschiedenen Polypyrimidin-Boxen ist möglicherweise die Ursache für die im Particle Bombardment gemessenen unterschiedlichen Luciferase-Aktivitäten bei den Konstrukten A-BC und AB-C. Somit könnte ein direkter Zusammenhang in der Fähigkeit der Polypyrimidin-Boxen bei der Rekrutierung von AtBR-homologen Transkriptionsfaktoren aus *Beta vulgaris* mit der gemessenen Promotoraktivität vorliegen.

Santi (2003) beschreibt eine achtfache TC-Alternierung als ein Bindemotiv des BBR-Transkriptionsfaktors aus Gerste. Dieser Befund schließt jedoch nicht aus, dass weder für den BBR-Transkriptionsfaktor selbst noch für die stark homologen DNA-bindenden Domänen der AtBR-Proteine ein ähnliches Polypyrimidin-Motiv eine stärkere Affinität aufweist als reine TC-Wiederholungen. Beide Polypyrimidin-Boxen des c1-Promotors besitzen innerhalb ihrer Sequenz nur eine vierfache Wiederholung der Basen Thymin und Cytosin. Wenn allein die Länge, oder mindestens vier aneinander gereihete Thymin-Cytosin-Wiederholungen ausschlaggebend für eine Bindung sind, hätte sich eine gleichartige Bindeaffinität von Trx-AtBR4 in Versuch 4.10.4 mit den beiden Polypyrimidin-Box1- und Box2-Sonden ergeben müssen. Da der Versuch (4.10.4) diese Hypothese widerlegt ist durch unterschiedliche Polypyrimidin-Sequenzmotive innerhalb der Polypyrimidin-Boxen eine differenzierte Bindeaffinität zu AtBR- und AtBR-homologen Transkriptionsfaktoren gezeigt. Durch eine Abweichung von der (noch unbekannt) Polypyrimidin-Sequenz mit optimalen Bindeeigenschaften für AtBR-Transkriptionsfaktoren erscheint auch eine Feinmodulation von Promotoraktivitäten in vivo möglich.

Eine weitere Versuchsserie, in der durch Particle Bombardment die Promotoraktivität des c1-Promotors, in dessen Polypyrimidin-Boxen systematisch einzelne Basen ausgetauscht wurden, in Kombination mit einer EMSA-Versuchsserie zur Ermittlung der Bindeaffinität von rekombinanten AtBR-Transkriptionsfaktoren könnte das Ausmaß der Promotoraktivitätsveränderungen in Korrelation mit der Bindeaffinität der AtBR-Transkriptionsfaktoren setzen und gleichzeitig das Bindemotiv mit der stärksten Affinität für die AtBR-Proteine ermitteln.

6.10 In vivo Evidenzen für eine funktionale Beteiligung der AtBR-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Promotoraktivität des c1-Promotors

Transkriptionsfaktoren müssen im Nukleus der Zellen lokalisiert sein, um in vivo einen Effekt besitzen zu können. In Versuch 4.8 konnte eine entsprechende Akkumulation des AtBR1-Transkriptionsfaktors als N-terminales Fusionsprotein mit GFP im Kern transient transformierter Zellen bestätigt werden (Abb. 4.8.1a). Damit sind die Grundkriterien eines potentiellen Transkriptionsfaktors erfüllt, nämlich eine spezifische Bindeaffinität zu Promotor-Motiven (Punkt 5.8 Kriterien A-E) und eine Akkumulation im Zellkern (Punkt 4.8).

Um eine Aussage über die Bedeutung der AtBR-Transkriptionsfaktoren auf Promotoren im einzelnen oder auf ganze Pflanzen machen zu können, sind zwei Ansätze gewählt worden. Erstens, die transiente Transformation von *Beta vulgaris* Suspensionskulturzellen mit AtBR-Proteinen und c1-Promotor-Reportergenen via Particle Bombardment und zweitens das gleichzeitige Silencing von drei AtBR-Transkriptionsfaktoren durch viral induziertes RNA Silencing auf „whole plant“-Ebene.

6.10.1 Transaktivierung des BVA c1-Promotors durch AtBR1

Durch ein Cobombardment des AtBR1-Expressionsvektor pFF19-AtBR1 und dem BVA c1-Promotor-LUC-Konstrukt soll auf eine mögliche Interaktionen mit dem c1-Promotor in vivo durch die Messung der Luciferase-Aktivität geschlossen werden. Man nimmt an, dass der entsprechende Transkriptionsfaktor bei einer beobachteten Promotoraktivitäts-Erhöhung der limitierende Faktor der Transkriptionsstärke für den c1-Promotor darstellt.

Die Aktivitätsmessung des Reportergens Luciferase ergibt eine erhebliche Verstärkung der c1-Promotoraktivität durch ein Cobombardment mit pFF19-AtBR1. Die Aktivitätssteigerung des c1-Promotors beträgt nach einer ca. 24-stündigen Inkubationszeit über 50% (Punkt 4.7 Versuche 2 und 4). Ein interessanter Befund ist die außergewöhnlich starke Erhöhung der c1-Promotoraktivität nach einer Inkubationszeit von nur vier Stunden und zehn Minuten (Punkt 4.7 Versuch 1) um das Dreifache. Unklar ist, inwieweit die verstärkte Luciferase-Aktivität auf einen zeitlichen „Vorsprung“ zur Vergleichsbedingung des c1-Promotors ohne pFF19-AtBR1 zurückzuführen ist oder ob die Expression des augenscheinlich auf den c1-Promotor aktivierend wirkenden AtBR1 posttranskriptional beziehungsweise posttranslational inaktiviert wird. Um diesen Punkt zu klären könnte eine Versuchsreihe durchgeführt werden, in der die c1-Promotorstärke im Cobombardment mit pFF19-AtBR1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt wird.

Das Cobombardment von pFF19-AtBR2 ergab stark widersprüchliche Effekte auf die c1-Promotoraktivität. Eine Erklärung hierfür steht bisher aus. Aufgrund der einmalig extrem starken Aktivierung des c1-Promotors auf über 200% (Punkt 4.7 Versuch 4) sind weitere Untersuchung nötig.

In keinem Fall trug ein Cobombardment mit AtBR1 oder AtBR2 zu einer signifikanten Erhöhung der Promotoraktivität des PPase1-Promotors bei. AtBR1 scheint auf die PPase1-Promotoraktivität sogar eine tendenziell hemmende Wirkung um ca. 15-18% zum Bombardment des PPase1-Promotor-LUC-Konstruktes ohne AtBR1 zu besitzen. Eine Verringerung der Promotoraktivität kann durch eine unspezifische Reduktion des Stoffwechsels oder durch eine Blockade des Promotors begründet sein wodurch endogene Transkriptionsfaktoren behindert werden oder entsprechende Co-Faktoren können im heterologen System fehlen um eine Wirkung des transgenen Proteins zu ermöglichen. Dabei verhindert die methodisch bedingte große Standardabweichung eine konkrete Feststellung dieses Sachverhaltes.

Der Promotor der Pyrophosphatase 1 besitzt mehrere ausgedehnte Polypyrimidin-Sequenzbereiche innerhalb der 5'UTR (siehe Anhang). Es finden sich dort mehrere Polypyrimidin-Motive (u.a. (TC)₇), die eine direkte Interaktion mit AtBR-Proteinen

wahrscheinlich machen (Santi et al., 2003, Sangwan et al., 2002). Insofern entspricht das Ausbleiben einer Reaktion auf die AtBR-Cobombardments nicht den Erwartungen. Möglicherweise dienen die Polypyrimidin-Sequenzen des PPase1-Promotors der mRNA-Stabilität und sind für eine AtBR-gesteuerte Transkriptionsmodulation unerheblich.

Innerhalb der 5'UTR des PPase1-Promotors findet sich das Submotiv TTTTCTCT, welches auch in der Polypyrimidin-Box2 der c1-Promotors auftritt. Wie die Versuche (A-B-C) gezeigt haben, hat eine in der 5'UTR lokalisierte Polypyrimidin-Box mit solch einem Motiv für die Gesamtpromotoraktivität eine geringere Bedeutung (Punkt 5.1). Möglicherweise spielt außer der Lokalisation der Polypyrimidin-Boxen direkt 5'seitig der TATA-Box auch ein Polypyrimidin-Bindemotiv mit einer anderen Sequenz als reine (TC)_n-Wiederholungen eine maßgebliche Rolle für eine optimale Wechselwirkung mit AtBR-Transkriptionsfaktoren.

Unterstützt wird diese Theorie durch die unter Punkt 5.3 diskutierten Ergebnissen der Einzelbasenmutationen innerhalb der Polypyrimidin-Box1. Die Erweiterung der TC-Folge von (TC)₄ zu (TC)₅ durch einen einzelnen Basenaustausch im Konstrukt QCT2C resultiert in eine starke Aktivitätsverringering des c1-Promotors um 60%.

Im Cobombardment der pFF19-AtBR Konstrukte konnte in Arabidosis-Zellkultur keine Modifikation der c1-Promotoraktivität beobachtet werden (ohne Abbildung). Da diese Versuche im homologen System stattfanden, erscheint die Möglichkeit einer posttranskriptionalen Regulation der AtBR-Transkriptionsfaktoren plausibel (Williams-Carrier et al., 1997).

Die hier durch das Cobombardment im für die AtBR-Transkriptionsfaktoren heterologen System gewonnenen Daten weisen somit auf eine AtBR-regulierbare Aktivität des c1-Promotors, aber nicht des PPase1-Promotors hin. Weiterhin erscheinen reine Wiederholung der Basenabfolge TC innerhalb der Polypyrimidin-Boxen nicht als optimales Motiv um die Aktivität eines Promotors zu verstärken (siehe auch Punkte 5.3 und 5.9.4).

6.11 RNA Silencing

Beim RNA Silencing im engeren Sinn handelt sich um eine sehr stark konservierte Art der Degradation einer spezifischen mRNA unter Akkumulation kurzer doppelsträngiger RNA-Fragmente, so genannter siRNA. Weitere Folgen eines RNA Silencing können die Methylierung von Genen, Änderungen in der Chromatin-Struktur und die systemische Ausbreitung des Silencing-Signals über den gesamten Organismus sein, was zu einer drastischen Reduktion der entsprechenden mRNA führt (Bernstein et al., 2001, Hamilton et al., 2002). Man unterscheidet zwei Arten von siRNA: Kurze und lange siRNA (siehe Abb. 5.11). Kurze siRNA führt in Verbindung mit dem RISC-Komplex zur gezielten mRNA-Degradation. Über die Mechanismen zur Entstehung und Funktion der langen siRNA herrscht noch Unklarheit. Man vermutet, dass die lange siRNA sowohl als das Signal zum systemischen Silencing in Pflanzen, als auch als Auslöser von Gen-Silencing durch Methylierung von DNA und Chromatin-Modifikation fungieren kann (Hamilton et al., 2002). Die Entwicklung die zu einer solchen spezifischen RNA-abbauenden „Maschinerie“ geführt hat, wurde mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Notwendigkeit zur Abwehr viraler

Pathogene induziert (Mourrain et al., 2000, Vionnet et al., 2000). Gleichzeitig dient sie auch dem Schutz vor mobilen endogenen DNA-Elementen wie z.B. Transposons (Ketting et al., 1999, Wu-Scharf et al., 2000). Generell kann bereits die übermäßige Transkription einer mRNA ein Silencing auslösen (Forgensen et al., 1990). Dabei wird das verstärkte Auftreten von fehlgebildeter mRNA und deren Abbauprodukten als Templat der endogenen RNA abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) vermutet.

Aufgrund der großen Homologie in Auslösung und Wirkmechanismus innerhalb der Eukaryoten mehren sich die Hinweise, dass RNA Silencing sehr früh in der Evolution entstand und so auch regulatorische Aufgaben bei der Genregulation grundlegender Entwicklungsprozesse übernehmen konnte (Grishok et al., 2001, Hutvanger et al., Kettinger et al., 2001, Tabara et al., 1999).

Das Silencing ist nicht nur auf die selektive Degeneration einer bestimmten mRNA beschränkt. Alle Ebenen, die zur Bildung eines Genproduktes beitragen, können betroffen sein. So kann u.a. die Transkriptionsrate durch Methylierung der kodierenden Sequenz oder des Promotors stark herabgesetzt werden. Strukturelle Veränderungen innerhalb des Chromatin-Gerüsts durch RNA Silencing sind ebenfalls beobachtet worden (Fagard 2001, Fire 1999).

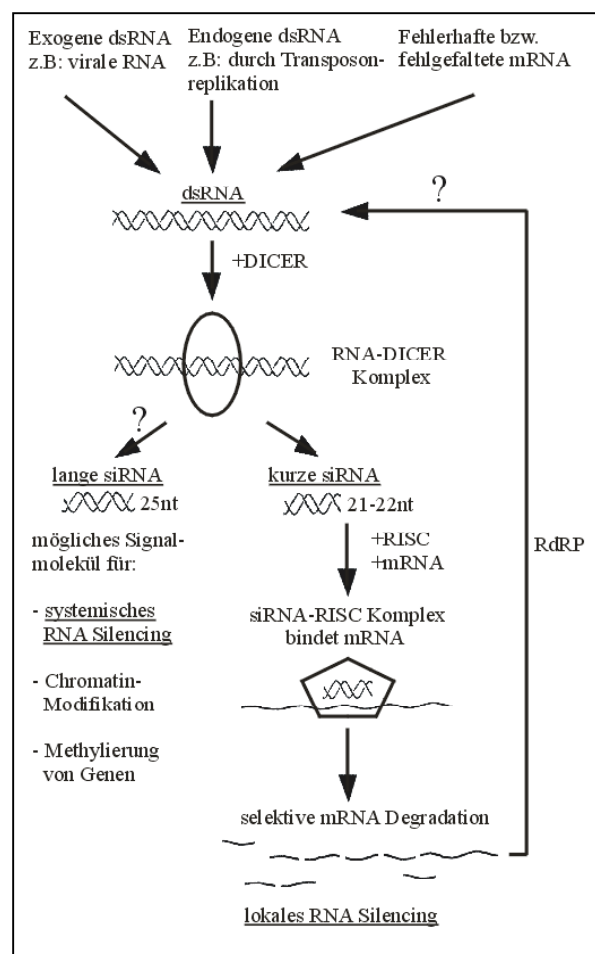


Abb. 5.11: Schematische Darstellung der durch RNA Silencing hervorgerufenen Genregulations-Prozesse. Grafik verändert nach Bernstein et al., 2001; Hamilton et al., 2002; Szweykowska-Kulinska et al., 2003.

Mittlerweile hat sich RNA Silencing als eine schnelle und aussagekräftige Methode etabliert, um die Funktion einzelner Gene zu untersuchen. Verschiedene Ansätze wie die Erzeugung sogenannter „antisense-Pflanzen“ (Waterhouse et al., 1998, Stam et al., 2000), Virus-vermitteltes Gen-Silencing (Gossele et al., 2002) oder die direkte Transformation mit dsRNA (Chuang et al., 2000, Fire e. al., 1998) machen sich das RNA Silencing zu Nutze, um selektiv einzelne Genprodukte auszuschalten.

6.11.1 RNA Silencing von AtBR1, 2 und 3 reduziert die c1-Promotoraktivität in vivo

Die beobachtete Expression von GFP in den infizierten Zellen (Abb. 4.11.2a, b und c) ist auf zwei verschieden lange polycistronische Transkripte des SIPV-Konstruktes zurückzuführen, in denen bei beiden die für die C-terminale Domäne des AtBR3 Transkriptionsfaktors codierende Sequenz vor dem ORF des GFP lokalisiert ist (Abb. 4.11.1).

Ein Verschwinden der GFP-Fluoreszenz und eine Verkleinerung der in den Tagen zuvor sich vergrößernden Infektionsherde kann auf eine spezifische RNA-Degradation durch das viral induzierte RNA Silencing zurückgeführt werden (Gossele et al., 2002). Das dabei entstehende Silencing betrifft sowohl die einzelsträngigen Transkripte, als auch das virale doppelsträngige RNA-Genom selbst. Die erreichte Anzahl auf diese Weise erzeugter spezifischer „Knockout“-Pflanzen erreicht in einem bereits veröffentlichten vergleichbaren viralen System zum Silencing einzelner Genprodukte 100% (Gossele et al., 2002).

Durch die in diesem Versuch allgemein hohe Streuung der gemessenen Werte sind die erhaltenen Daten kritisch zu bewerten, trotzdem lässt sich klar eine gegenläufige Tendenz in der Reaktion der c1- und PPase1-Promotoraktivitäten auf das Silencing der Transkriptionsfaktoren AtBR1 – 3 ablesen. Dieser Versuch ist der erste Anhaltspunkt auf die in-vivo Funktion von AtBR-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* auf Polypyrimidin-Box enthaltende Promotoren.

Es sind aber auch noch weitere Polypyrimidin-Box induzierte Wirkungsmechanismen der Promotorregulation denkbar die unabhängig von einer Interaktion mit AtBR-Transkriptionsfaktoren erfolgen könnte.

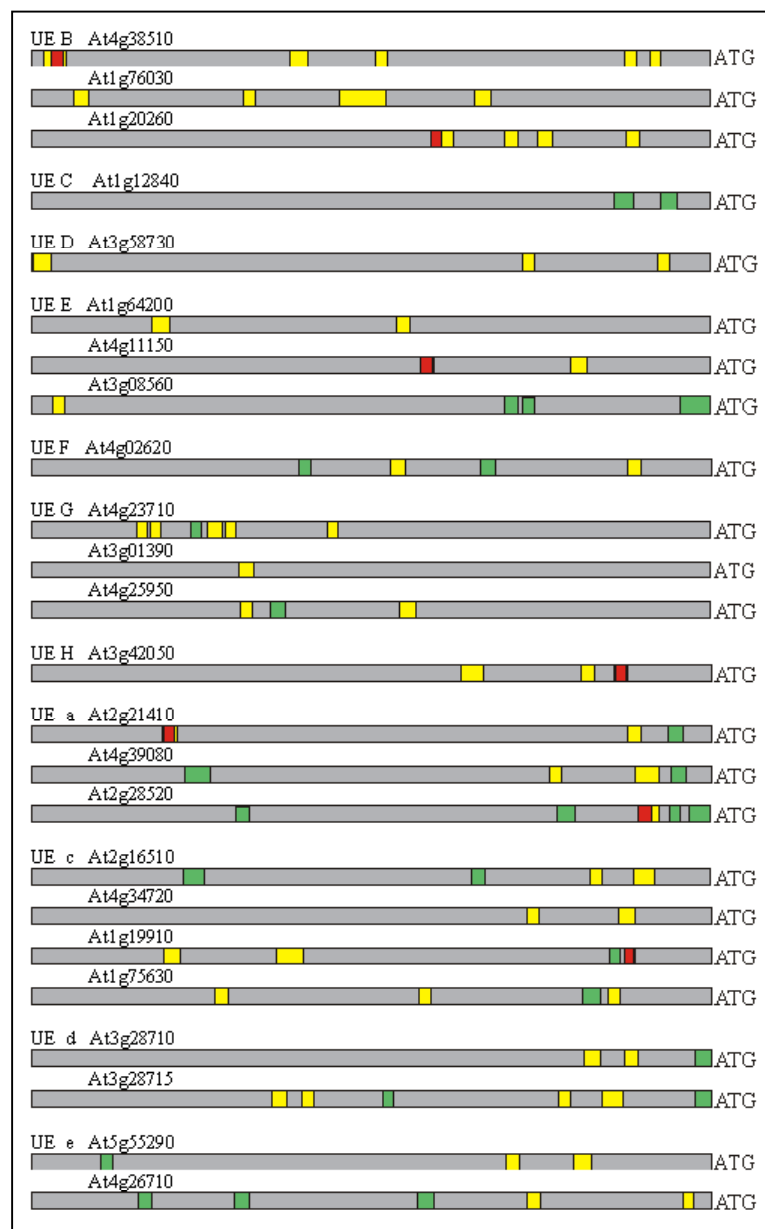
6.12 Ausblick:

Wie Abb. 5.12 verdeutlicht, ist eine Interaktion praktisch aller Promotoren der V-ATPase Untereinheiten in *Arabidopsis thaliana* mit AtBR-Transkriptionsfaktoren möglich, wodurch eine AtBR unterstützte funktional koordinierte Expression der entsprechenden Gene naheliegend erscheint. Sangwan (2002) deutet allein das Vorkommen entsprechender Polypyrimidin-Motive als direkten Hinweis auf eine Erkennung durch das AtBR-homologe Gbp.

Es ist ebenfalls denkbar, dass die Transkriptionsregulation der einzelnen Isoformen der V-ATPase Untereinheiten in *Arabidopsis thaliana* durch gewebespezifische Expression unterschiedlicher AtBR-Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

Abb. 5.12:

Schematische Übersicht über die Häufigkeit und Verteilung von Polypurin-/Polypyrimidin-Motiven in den Promotoren und 5'UTR-Bereichen der V-ATPase aus *Arabidopsis thaliana*. Dargestellt ist die genomische Sequenz 500 Basenpaare 5'seitig des Translationsstarts. Grüne Boxen zeigen Polypurin-Motive. Gelbe und rote Boxen zeigen Polypyrimidin-Motive. Die roten Boxen stehen für das Polypyrimidin-Sequenzmotiv TTTCTCT (siehe QuikChange-Versuche). Die Abgebildeten Motive sind mindestens 8bp lang. Die Länge der einzelnen Boxen korreliert mit deren Ausdehnung auf der DNA.



Vertiefende Versuche mit AtBR-Knockout-Pflanzen oder RNAi-Ansätze, in denen einzelne oder mehrere AtBR-Transkriptionsfaktoren „ausgeschaltet“ werden, können Aufschluss über die Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren im Kontext sowohl der konstitutiven und zusätzlich induzierbaren Expression der V-ATPase als auch allgemein in Promotoren und 5'UTR-Sequenzen mit Polypyrimidin-Motiven nicht nur in Arabidopsis, sondern auch übergreifend im ganzen Pflanzenreich erbringen. Da eine gezielte und ergiebige Expression bestimmter Nutzgene und Herbizidresistenzen in der modernen Pflanzenzüchtung von immer stärkerer Bedeutung sein wird, erscheinen weiterführende Versuche aufbauend auf den hier erarbeiteten Grundlagen der Bedeutung von Polypyrimidin-Boxen zum wissenschaftlichen Verständnis und dem Design maßgeschneiderter Promotoren vielversprechend.

7 Abkürzungen

∅	Durchmesser
A	Adenin (6-Amino-Purin)
A. bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BW	Blindwert
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (6-Amino-2-Hydroxy-Pyrimidin)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaMV	engl.: <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (Blumenkohlvirus)
cDNA	„copy“ oder „complementary“ Desoxyribonukleinsäure
C-terminal	Carboxy-Terminus eines Proteins
2,4-D	(2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
Del.	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate (sog. 'Nukleotide')
downstream	„flußabwärts“, Bezeichnung für Sequenz(elemente), welche in Richtung des 3'-Endes (C-Terminus) einer Sequenz liegen.
ds	engl.: <i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EtBR	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
g	Gramm
G	Guanin (2-Amino-6-Hydroxy-Purin)
xg	vielfaches der Erdbeschleunigung (1g = 9,81m/s ²)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (Reporterogen)
GUS	β-Glucuronidase (Reporterogen)
h	engl.: <i>hour</i> (Stunde/n)
H ⁺	Proton, positiv geladenes Elementarteilchen. In wässriger Lösung als H ₃ O ⁺ vorliegend.
HUSAR	engl.: <i>Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
k	kilo (=10 ³)
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid
KAc	Kaliumacetat
Kan.	Kanamycin

kDa	Kilo Dalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Bakterien-Nährlösung nach Luria-Bertani
LMW	engl.: Low molecular weight marker (Proteingrößenmarker)
LUC	Luciferase (Reportergen)
Lsg.	Lösung
μ	mikro (=10 ⁻⁶)
m	milli- (=10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
min	Minuten
mol	Stoffmenge (1mol = 6,023*10 ²³ Teilchen)
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten RNA)
MWG	Firma MWG-Biotech München
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
N-Terminus	Amino-Terminus einer Proteinsequenz
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	engl.: <i>open reading frame</i> (Offenes Leseraster)
PAA	Polyacetylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isomylalkohol (25+24+1)
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
Pellet	Sediment
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PEG	Polyethylenglycol
Poly(A)	Polyadenylatkette
V-PPase	vakuoläre H ⁺ -Pyrophosphatase
Primer	Oligonukleotid
psi	engl.: <i>pounds per square inch</i> (1 square inch = 6,45cm ²)
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (Reportergen)
RLU	Relative Lichteinheiten
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (ca. 23°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Thymin (2,6-Dihydroxy-5-Methyl-Pyrimidin)
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet.	Tetracyclin
Tris-Base	Tris-/hydroxymethyl)-aminomethan
ts	engl.: <i>triple stranded</i> (dreifachsträngig)
U	engl.: <i>unit/s</i> (Einheit/en)
u.a.	unter anderem

kb	Kilobasen
UE	Untereinheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
upstream	„flußaufwärts“, Bezeichnung für Sequenz(elemente), welche in Richtung des 5'-Endes (N-Terminus) einer Sequenz liegen.
UTR	Untranslatierte Region
3'-UTR	Untranslatierte Region „downstream“ am 3'-Ende
5'-UTR	Untranslatierte Region „upstream“ am 5'-Ende
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren mit Ein- und Drei-Buchstaben-Code:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat/Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat/Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

8 Literaturverzeichnis

Anandalakshmi R., Puss G. J. Ge X., Marathe R., Smith T. H., and Vance V. B., (1998).

A viral suppressor of gene silencing in plants. Proc. Natl Acad. Sci. USA, **95**, 13079 - 13084.

Baltscheffsky M. & Nyren P. (1984).

The synthesis and utilisation of inorganic phosphat. New Comprehensive Biochemistry, Bioenergetics **9**: 187 - 206.

Baykow A., Bakuleva N. P., Rea P. A. (1993).

Steady-state kinetics of substrat hydrolysis by vakuolar H⁺-pyrophosphatase. A simple three state model. Eur. J. Biochem. **217**: 755 - 762.

Benfey P. N., Ren L. & Chua N.-H. (1989).

The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. EMBO Journal **8**: 2195 - 2202.

Bernstein E., Denli A. M., Hannon G. J., (2001).

The rest is silence. RNA **7** (11) 1509 - 1521.

Bickmore, W. and Bird, A.P. (1992).

The use of restriction endonucleases to detect and isolate genes from mammalian cells. *Methods Enzymol.*, **216**, 224 - 244.

Bowmann E. J., Siebers A. & Altendorf K. (1988).

Bafilomycin: a class of inhibitors of membrane ATPase from microorganisms animal cell, and plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 7972 - 7976.

Bremberger C., Haschke H. P., Lüttge U. (1988).

Separation and purification of the tonoplast ATPase and pyrophosphatase from plants with constitutive and inducible crassulacean acid metabolism. *Planta* **175**: 475 - 470.

Brigneti G., Vionnet O., Li W. X., Ding S. W. and Baulcombe D. C. (1998).

Viral pathogenity determinants are suppressors of transgenic gene silencing in *Nicotiana bethamiana*. EMBO J. **17**, 6739 - 6746.

Bulfone A., Smiga S. M., Shimamura K., Peterson A., Puelles L., Rubenstein J. L. (1995).

T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron*. **15**: 63-78.

Carystinos G. D., MacDonald H. R., Monroy A. F., Dhindsa R. S., Poole R. J., (1995).

Vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphate is induced by anoxia and chilling in seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* **108**: 641 - 649.

Chiou T. J., Bush D. R. (1996).

Molecular cloning, immunochemical localization to the acule, and expression in transgenic yeast and tobacco of a putative sugar transporter from sugar beet. *Plant Physiol.* **110** (2): 511 - 520.

Chuang C. and Meyerowitz E. (2000).

Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl. Acad. Sci. USA **97**, 4985-4990.

Darley C. P., Davies J. M., Sanders D., (1995).

Chill-Induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls. *Plant Physiol.* **109**: 659 - 665.

Davies J. M., Hunt I. & Sanders D. (1994).

Vakuolar H⁺-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 8547 - 8551.

de Wet J. R., Wood K.V., DeLuca M., Helsinki D. R. & Subramini S. (1987).

Fireflies luciferase gene: structure and expression in mammalian cells⁴⁴. Mol. Cell. Biol. 725 - 737.

Dietz K. J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharama S. S., Harris G. C., Chardonnens A. N. and Gollack D. (2001).

Significance of the V-ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. Journal of Experimental Botany 52, 363: 1969 - 1980.

Douglas L. Black (2003).

Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. Annual Review of Biochemistry 72: 291 - 336.

Elbashir, S. M. Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001).

RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev., 15, 188 - 200.

Ellstrand N. C., (2003).

Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 29;358(1434):1163 - 70

Espinas, M. L., Jimenez-Garcia, E., Vaquero, A., Canduas, S., Bernues, J., and Azorin F., (1999).

The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. J. BIOL. CHEM. Vol. 274, No. 23 16461 - 16469

Fire A., Xu S, Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998).

Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806-811.

Fire A. (1999).

RNA triggered gene silencing. Trends Genet 15 (9) 358 - 363

Forgac M. (1998).

Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases.

FEBS Letters 440: 258 - 263.

Fried M., Crothers D. M., (1981).

Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. Nucleic Acids Research 11;9 (23) 6505 - 6525

Frustraci J. M., Sangwan I., O'Brian M. R. (1995).

gsal is a universal tetrapyrrole synthesis gene in soybean and is regulated by a GAGA element. JBC 270, 13 7387-7393.

Gaxiola R. A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alpler S. L. and Finl G. R. (1998).

The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1480 - 1485

Gil, A., Sharp, P. A., Jamison, S.F., and Garcia-Blanco, M. A., (1991).

Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. Genes & Dev. 5: 1224 - 1236.

Gilmour D. S., Graham H. T. Elgin S.C. (1989).

Drosophila nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters Science 245: 1487 - 1490.

Granok, H., Leibovitch, B., Shaffer, C. D., and Elgin, S. C. R. (1995).

Ga-ga over GAGA factor. Curr. Biol. 5, 238 - 241

Goodall, G. J., & Filipowicz, W. (1989).

The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. Cell 58, 473 - 483

Goodall G. J. and Filipowicz W. (1991).

Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. The EMBO Journal Vol. 10, pp.2635 - 2644

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell L. and Baulcombe D. (2002).

Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J., **21**, 4671 - 4679

Hannon (2002).

RNA interference. Nature **418** 244 - 251

He X., Fütterer J. and Hohn T (2002).

Contribution of downstream promoter elements to transcriptional regulation of the rice tungro bacilliform virus promoter Nucleic Acids Research **30**, 2 497 - 506

Holtorf H., Hohe A., Wang H.-L., Jugold M., Rausch T., Duwenig E., Reski R. (2002).

Promotor subfragments of the sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit c isoform drive the expression of transgenes in the moos *Physcomitrella patens*. Plant Cell Rep **21**: 314 - 346.

Htun H. & Dahlberg J. E. (1988).

Single strands, triple strands, and kinks in H-DNA Science **241**: 1791 - 1796

Jefferson R. A. (1987).

Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep **5**: 387 - 405.

James C. (2004).

Biotechnik-Agentur ISAAA Darmstadt, Bekanntmachung.

Jimenez-Garcia E., Vaquero A., Espinas M. L., Soliva R., Oronzco M., Bernues J. and Azorin F. (1998).

The GAGA faktor of *Drosophila* binds triple-stranded DNA. J. Biol. Chem. Vol. **273**, No. 38 24640 - 24648.

John C. Cushman (1995).

Isolation of nuclei suitable for in vitro transkriptional studies Academic Press Vol. 50 113 - 128.

Jones L., Hamilton A. J., Voinnet O., Thomas C. L., Maule A. J., and Baulcombe D. C. (1999).

RNA-DNA interactions and DNA methylation in post transcriptional gene silencing. Plant cell **11**: 2291 - 2301.

Jorgensen R. A., Atkinson R. G., Foster R. L. S. and Lukas W. J. (1998).

An RNA based information superhighway in plants. Science **279** 1486 - 1487.

Jorgensen R. A., (2002).

RNA traffics information systemically in plants. PNAS vol. 99, Nr. 18 11561 - 11563.

Jugold M., (2000).

Regulation pflanzlicher V-ATPase- und PPase-Promotoren. Diplomarbeit. Universität Heidelberg

Kamath R. V., Leary D. J., Huang S., (2001).

Nucleoplasmic shutteling of polypyrimidine tract-binding protein is uncoupled from RNA export. Mol. Biol. Cell **12**, 3808 - 3820.

Kamyar Zahedi, John J. Bissler, Anne E. Prada, Jorge A. Prada and Alvin E. Davis, III (1999).

The Promoter of the C1 inhibitor gene contains a polypurine-polypyrimidine segment that enhances transcriptional activity *The Journal of Immunology*, , 162: 7249 - 7255.

Kane P. M. (1995).

Disassembly and reassembly of the yeast vakuolar H⁺-ATPase in vivo. J. Biol. Chem. **270** (28): 17025 - 17032.

Kasschau K. D., and Carrington J. C., (1998).

A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post transcriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461 - 470.

Katsani, K. R., Hajibagheri, M. A. N., and Verrijer C. P. (1999).

Co-operativ DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology. *EMBO J.* **18**(3): 698 - 708.

Key R., Chan A., Daly M., & McPherson J. (1987).

Duplication of CaMV 35S promotor sequence creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**: 1299 - 1302.

Kirsch M., Zhigang A., Viereck R., Löw R. & Rausch T. (1996).

Salt stress induces an increased expression of V-type H⁺-ATPase in mature sugar beet leaves. *Plant Molekular Biology* **32**: 543 - 547.

Kleining H. & Sitte P. (1992)

Lehrbuch Zellbiologie. 3. Auflage 114 GUSTAV FISCHER Verlag ISBN 3-437-20482-3.

Knippers R. Lehrbuch Molekulare Genetik, 7. Auflage Thieme Verlag ISBN 3-13-477007-5 S. 26

Kolluri R., Torrey T. A. Kinniburgh A. J. (1991).

A CT promotor element binding protein: definition of a double-strand and a novel strand DNA binding motif. *Nucleic Acid Research* **20**, No.1: p. 111 - 116.

Lehr A. (1998)

Struktur- und Funktionsanalyse der Promotoren pflanzlicher V-Typ H⁺-ATPasen. Dissertation. Universität Heidelberg

Lehr A., Kirsch M., Viereck R., Schiemann J. & Rausch T. (1999).

cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Molecular Biology* **39**: 463 - 475.

Losey, J.E., L.S. Rayor, and M.E. Carter. (1999).

Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* **39**:214.

Lu Q., Lori L. Wallrath, Howard Granok, Sarah C.R. Eligin (1993).

(CT)_n•(GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transkriptional aktivation of the *Drosophila* hsp26 gene. *Molecular And Cellular Biology* Vol. **13**, No. **5**: p. 2802 - 2814.

Maeshima M., Nakanishi Y., Matsuura-Endo C. & Tanaka Y. (1996).

Proton pumps of the vakuolar membrane in growing plant cells. *J. Plant Res.* **109**: 119 – 125.

Mandala S., Taiz L. (1985).

Partial purification of a tonoplast ATPase from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* **78**: 327 - 333.

Mettler I. J., Mandala S. & Taiz L. (1982).

Charakterisation of in vitro proton pumping by microsomal vesikles isolated from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* **70**: 1738 - 1742.

Mishra R. K., Mihaly J., Barges S., Spierer A., Karch F., Hagstorm K., Schweisnberg S. E., Schedl P. (2001).

The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol.* **21** **4**: 1311 - 1318.

Mourrain P, Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel JB., Jouette D., Lacombe AM., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo TA., Vaucheret H., (2000).

Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533 - 542.

Müller K. J., Romano N., Gerster O., Garcia-Maroto F., Pozzi C., Salamini F. & Rohde W. (1995).

The barley hooded mutation caused by a duplication in a homeobox gene intro. *Nature* **374** (6524): 727-730.

Murray M. G., Thompson W. F. (1980).

Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**, 4321 - 4325.

Nakanishi Y. & Maeshima M. (1998).

Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean.

Plant Physiol. **116**: 589 - 597.

Nakanishi, Y., Saijo, T., Wada Y., Maeshima M., (2000).

Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **276**, 10 7654 - 7660.

Napoli ©., Lemieux C. and Forgesen R. (1990).

Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* **2** 279 - 289.

Nelson, M. and McClelland, M. (1991)

Site-specific methylation: effect on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucl. Acids Res.* **19**(sup), 2045 - 2071.

Q Lu, LL Wallrath, H Granok and SC Elgin (1993).

(CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. **13**, No. **5** 2802 - 2814.

Rausch T., Ziemann-Roth M. & Hilgenberg W. (1985).

ADP is a competitive inhibitor of ATPase-dependent H⁺ transport in microsomal membranes from *Zea mays* L. coleoptiles. *Plant Physiol.* **85**: 996 - 999.

Ratajczak R., Richter J. & Lüttke U. (1994).

Adaption of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C₃-CAM transition and plant age. *Plant, Cell and Environment* **17**: 1101 - 1112.

Rea P. A., Kim Y., Sarafian V. Poole R. J. Dabies J. M. & Sanders D. (1992).

Vacuolar H⁺-translokating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *TIPS* **17**: 348 - 353.

Rea P. A. (1993).

Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 157 - 180.

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977).

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**:5463 - 5467.

Sangwan I. and O'Brian M. R. (2002).

Identification of a soybean protein that interacts with GAGA element dinucleotide repeat DNA. *Plant Phys.* **129**: 1788-1794.

Santi L., Wang, Y., Stile M. R., Berendzen K., Wanke, D., Roig C., Pozzi C., Müller K., Müller, J., Rhode, W., Salamini F. (2003).

The GA octadecanucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *Plant Journal* **34** (6) 813 - 826.

Smith, C. W. J., Porro E. B. Patton, J. G., and Nadal-Ginard B. (1989).

Scanning from an independently specified branchpoint defines the 3' splice site of mammalian introns. *Nature* **342**: 243 - 247.

Schmidt A. L. & Briskin D. P. (1993).

Energy transduction in tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue: H⁺/substrate stoichiometries for the H⁺-ATPase and H⁺-PPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 301 No.1, 165 - 173.

Smith, C. W. J., Porro E. B. Patton, J. G., and Nadal-Ginard B. (1989).

Scanning from an independently specified branchpoint defines the 3' splice site of mammalian introns. *Nature* **342**: 243 - 247.

Stam M., de Bruin R., van Blokland R., van der Hoorn R. A., Mol J. N., Kooter J. M. (2000).

Distinct features of posttranscriptional gene silencing by antisense transgenes in single copy and inverted T-DNA repeat loci. *Plant J.* **21**: 27-42.

Sze H., Ward J. M., Lai S. (1992).

Vacuolar H⁺-translocating ATPase from plants: structure, function, and isoforms. *J. Bioenerg. Biomemb.* **24** (4): 371 - 381.

Sze H., Li X. & Palmgren M. G. (1999).

Energisation of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**: 677 - 689.

Tazi J., Alibert C., Temsamani J., Reveillaud I., Cathaia G., Brunel C. & Jeanteur P., (1986).

A protein that specifically recognizes the 3' splice site of mammalian pre-mRNA introns is associated with a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **47**, 755-766.

Terezini G. F., Horrichs A., Somssich I. E. (1993).

Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Mol Biol* **21**: 385 - 389.

Timmermans, M., Maliga, P., Vieira, J. and Messing, J. (1990).

The pPF plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J. Biotechnol.* **14**, 333 - 334.

Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D. C., Maule A. J., (2001)

Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal* **25**:417-425

Vaucheret H., Beckin C., Fagard M. (2001).

Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* **114** 3083 - 3091.

Viereck R. (1999)

Zur Regulation der Genexpression der V-Tvp H⁺-ATPase in höheren Pflanzen. Dissertation. Universität Heidelberg

Vionnet O, Lederer C., Baulcombe DC. (2000).

A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157 - 167.

Ward J.M. & Sze H. (1995).

Isolation and functional reconstitution of the vacuolar H⁺-ATPase. *Methods in Cell Biology* **50**: 149 - 160.

Ward J. M., Reinders A., Hsu H. Sze H. (1992).

Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from Oat roots.

Plant Physiol. 99: 161 - 169.

Waterhouse P. M., Graham M. W., Wang M. B. (1998).

Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959-13964.

Wells, R., Collier, D. A., Hanvley, J. C. Shimuzu, M., Wohlrab, F. (1988).

The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligo-purine sequences. FASEB J. 2939 - 2949.

Wells R. D. (1988).

Unusual DNA structures. J. Biol. Chem. 263, No. 3: p. 1095 - 1098.

Wilkins, R. C. and Lis, J. T. (1997).

Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. Nucleic Acids Res. 25, 3963 - 3968.

Yoshida S., (1991).

Chilling-induced inactivation and its recovery of tonoplast H⁺-ATPase in mung bean cell suspension cultures. Plant Physiol. 95: 456 - 460.

Xoconostle-Cazares B., Xiang Y., Ruiz-Medrano R., Wang H., Monzer J., Yoo B., McFarland K. C., Franceschi V. R. and Lukas W. J. (1999).

Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. Science 283 94 - 98.

Xu G, Goodridge AG. (1999).

Function of a C-rich sequence in the polypyrimidine/polypurine tract of the promoter of the chicken malic enzyme gene depends on promoter context. Arch Biochem Biophys. 15;363 (2) 202 - 212.

Zahedi K., Bisseler J. J., Prada A. E., Prada J. A., and Davis A. E. (1999).

The promoter of the C1 inhibitor gene contains a polypurine-polypyrimidine segment that enhances transcriptional activity. Journal of Immunology, 162: 7249-7255.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bertel, D. P. (2000).

RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell, 101, 25 - 33.

Zankani M., Casolo V., Vianello A., Marcri F. (1998).

H⁺/PP_i stoichiometry of a membrane-bound pyrophosphatase of plant mitochondria. Physiologica Plantarum 103: 304 - 311.

Zhang K., Wang Z. Q. & Gluck S. (1992).

A cytosolic inhibitor of vacuolar H⁺-ATPase from mammalian kidney. J. Biol. Chem. 267 (21): 14539 - 14542.

9 Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. Thomas Rausch für die Betreuung dieser Arbeit und die viele konstruktive Kritik sowie für die Chance mir die wissenschaftlichen Hörner abzustößen zu können.

Prof. Dr. Michael Wink für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ulrike Hallwax für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag, die Deutung der Bandenorakel, die Blasen an den Händen und die Korrektur dieser Arbeit.

den drei Laborfeen Emilia, Connie und Heike für tausend kleine Kleinigkeiten.

Manuela Link für den Promotor den ich kaputt machen durfte.

Mirsada Kurtisi für die unbeschreiblichen Muskelkater.

Alexandra Kroll für die detektivische Fehlersuche.

Benedikt Kost für Rat (Singapore) und Tat (RFP).

Michael Schlierbach für den grünen Daumen.

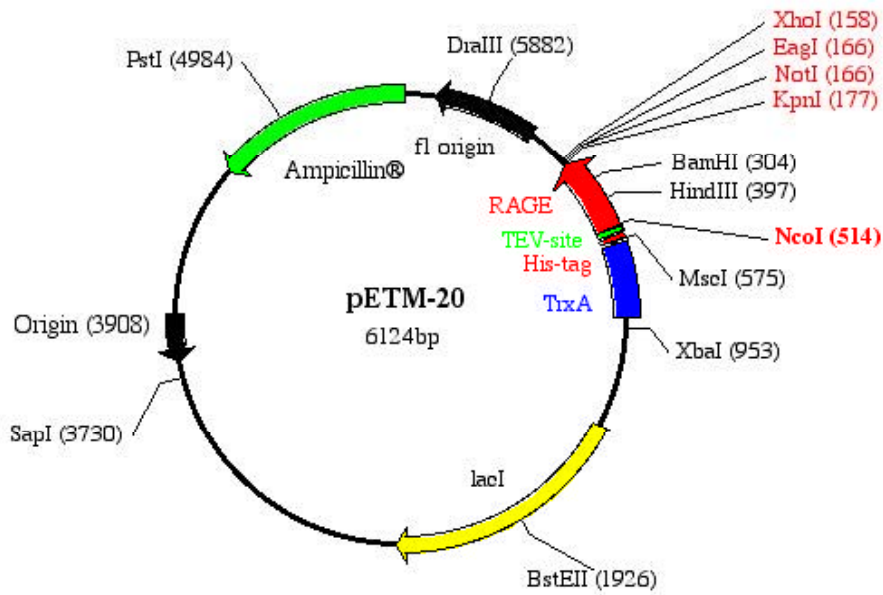
Markus Kiefer für das Zureiten von Pegasus.

John Ueli Doe für die Pflanzengrippe.

meiner Familie

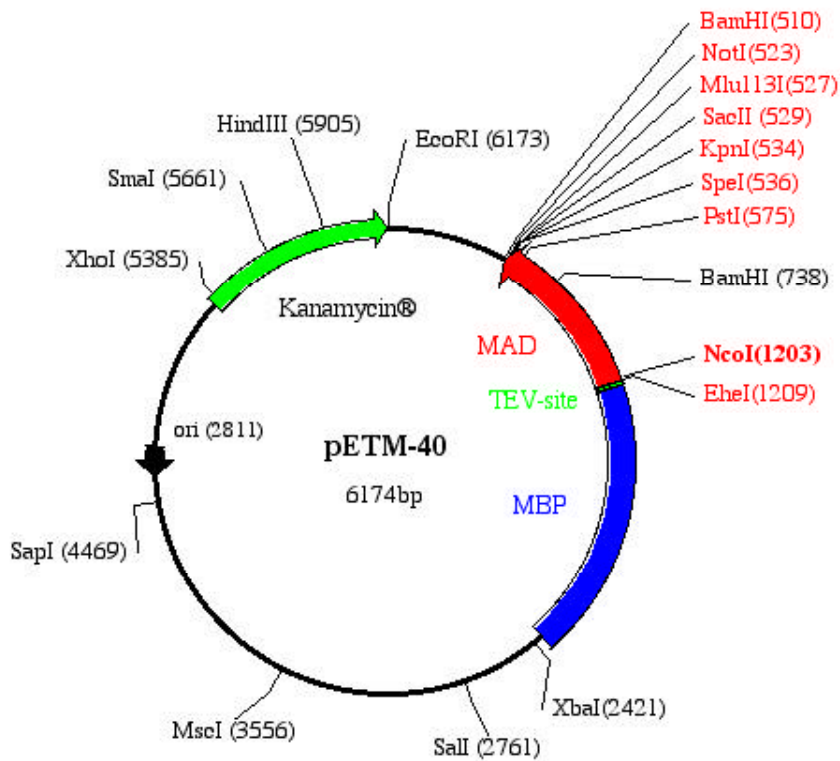
und Alke.

10 Anhang



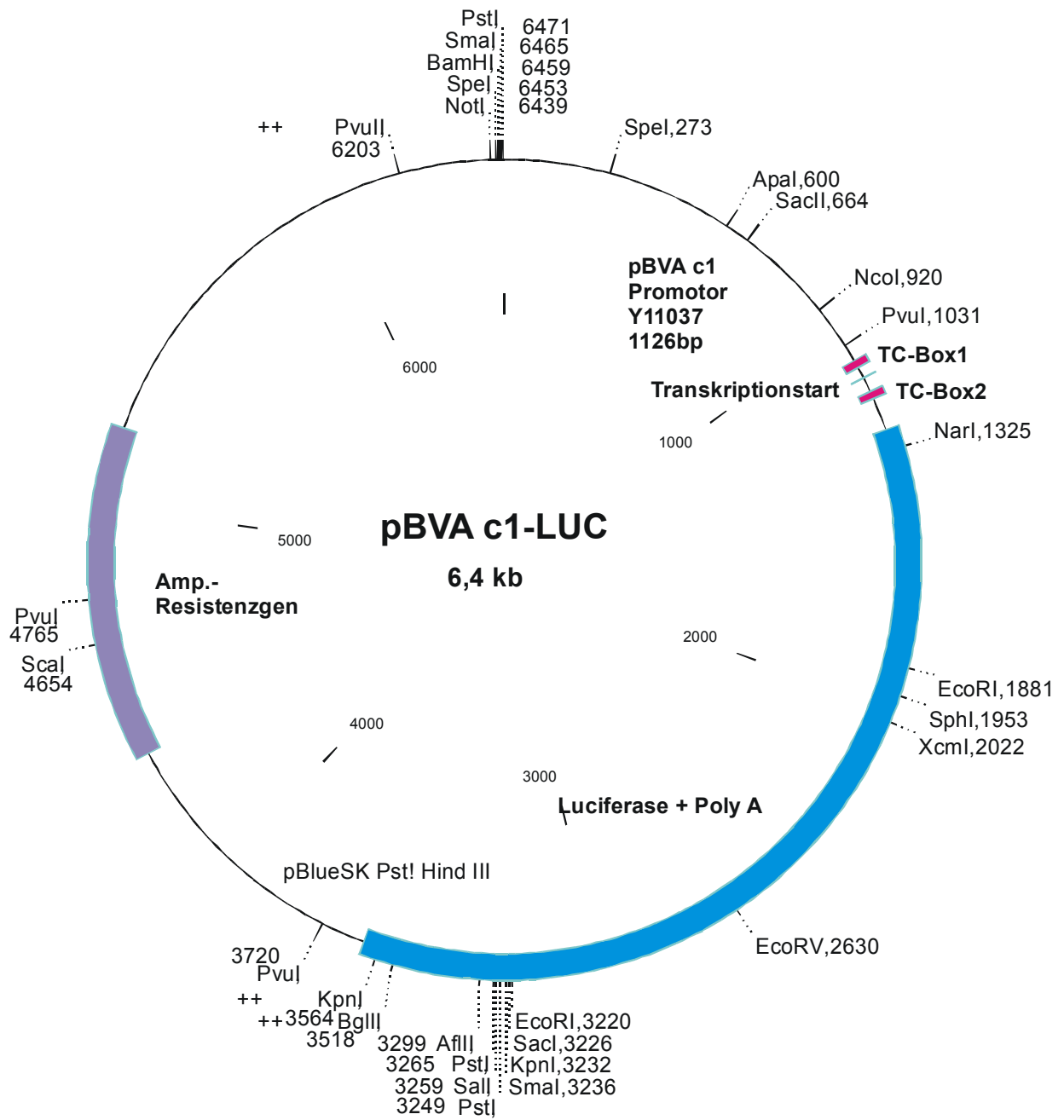
pETM-20 Vektor (Punkt 3.13)

http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/geerlof/draft_frames/flowchart/clo_vector/pETM/pETM-20_seq.html

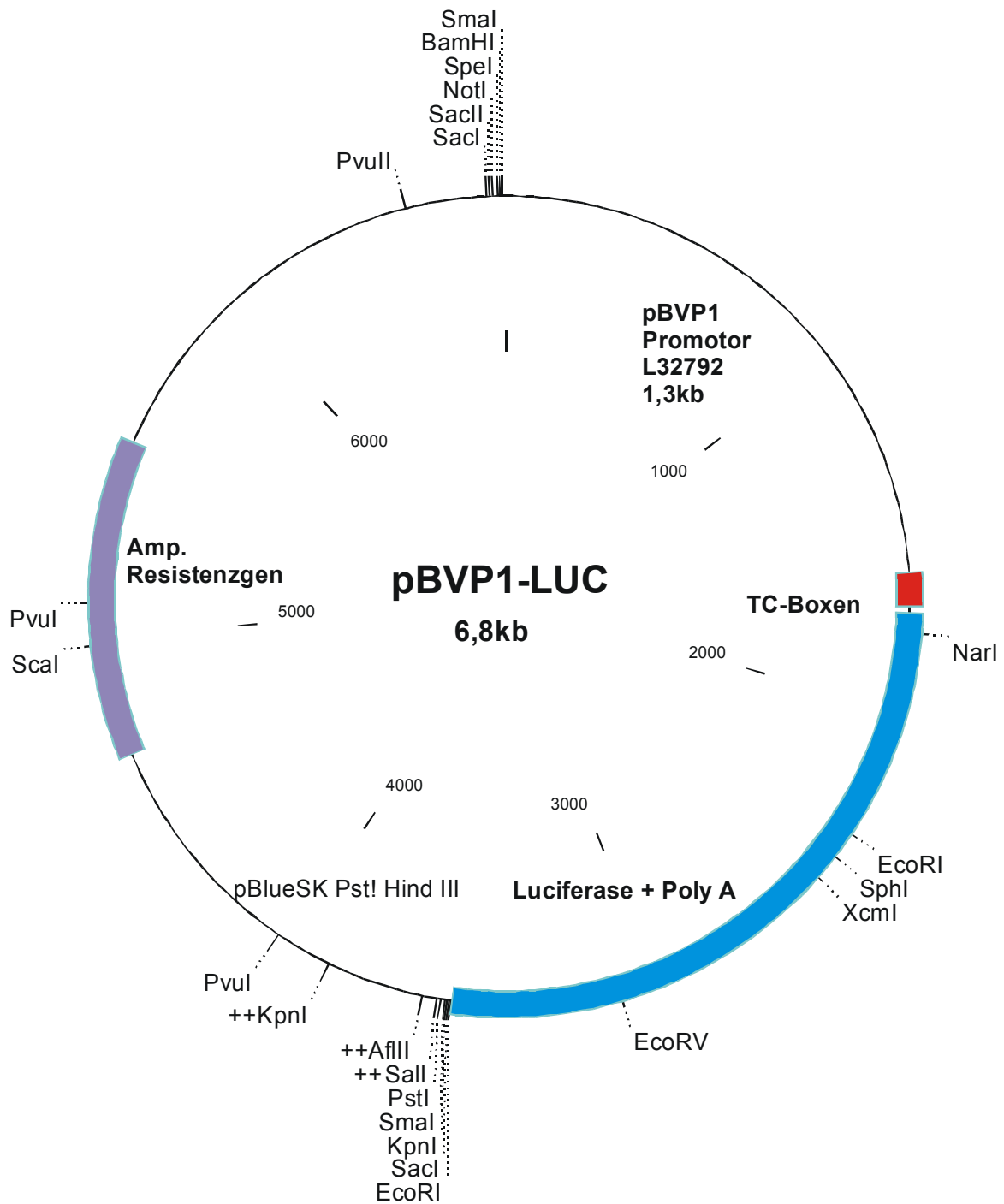


pETM-20 Vektor (Punkt 3.13)

http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/geerlof/draft_frames/flowchart/clo_vector/pETM/pETM-40_seq.html



pBVA c1-LUC Plasmid (Punkt 3.13)



pBVP1-LUC Plasmid (Punkt 3.13)

1	CCATCGATTC	ACATAGGATG	TGAACCGTTG	ATTTTTTTTTT	TTTTTTAAAA	AGTTCAGTGC			
61	AAAAGTTAGA	AATTACTTAA	GGCAAATCGC	TATTTTCAATT	AGCGATTTTA	TTAAAAATAGA			
121	TCTACTAACTG	AAGCCTGTTT	ACTATCATTT	TTTGTTTTTTA	GCTTTCAAAA	TTTCTAAAAA			
241	GTATAAACAA	GATGATAAAA	ACCACAAAAA	ATAGTTTTTAA	GTTATTAGTT	TTCAAAATTG			
301	AGAAGACTAT	ATATTATAGC	AATGAATACT	TTTAAGTTTA	TTATACTGTT	TATATCATAT			
361	GACTTTTTAAA	ACCATCAACC	AAAAATTGAA	AATTAATAGT	GATGTTGAAC	AACCCTAAGT			
421	TAGCATTTTC	TATTTTACAA	AACCACTAAC	TCGGATAGCG	ATTTAATTAA	GTTAAACCAC			
481	TAACTCAAAA	TTAGCGGTTT	AATTCGGGTA	CATCACAAAC	CATTCACATA	ACACTTGAAC			
541	AATATTTTCT	AAAATAAAAA	CTAACCTAAA	CCGCTAACTC	AATTAGTGAT	GTTGAGAGTA			
601	TTTTTGTCTC	TCTTTAACCT	CACAGCTAAT	GGTTTTGTTC	ATTATAAGTG	TCACTTCAAT			
661	AAAATGATTC	TCATAGTTAT	CTTTAAAAAAG	TGTTCTTTTTA	TGTTAAAAAC	AATTAAGTTC			
721	AATGACATAA	ACGAGATTCT	ATCCACACAC	AGACTTTACC	AGTTAAGCTA	TATAACATCC			
781	ATCAGTATCT	AAAAAGAAGT	CGGTACCTGA	CAATGACGGT	AAAAAAGCAC	CTTAAAAAAG			
841	TAATACTATG	TGAATTTAGG	TTCTTTATCA	AGCGCTTCAG	AAACACCTAT	TATCAATCAA			
901	AGAAATAATA	GTAATAATAA	TAATACCAAT	AAAAATAATT	AAAATGAATT	ACAAAAATATA			
961	ATACTCCACC	TAATTATAAT	TTACTAGAAT	TTTTTGCACG	CGATGCGTGC	TTGAATTTTT			
1021	TTCGAAAAAG	AAACTCGATT	TTTTTTCGACA	TAAGAGTCAA	AATTTGAACA	TTAGACAAAC			
1081	GAAGTATAAT	TATTTTTAGT	TGCAAAATTT	GATTGGCTTA	GTTTCTATCA	CTTATATCTC			
1141	TCACCATTCT	TTTTTTTTTTT	TATACTTTTC	AAAGTTAAAT	TATATGAACA	AAAGAGAAAT			
1201	TTTATTGAAT	TTATTTATAA	TTTTTAATAT	TATAATTTTTT	TAGTTGATTT	TTGAATTAAG			
1261	TACAGTACTT	TATAAATTGT	AAAGAAAGTG	TACACTTTGA	TTTCAAGTCA	ATTTTTTCAT			
1321	AGGTTGTAGT	TTGTAAGTGA	ATTTTTTTGT	TTTTGTAAAG	TTTATTCATT	TTAGTGATTT			
1381	GCATAACGTA	AATTATGCAA	TTTTATGATT	TTAGTTGACT	TGTGAGTGAT	TGTTATAATT			
1441	ATATTTTTGG	CATTTTTGTT	TGAAGCCCAC	TTTAATTTGT	AAGTGAATTT	GTTATTTAGA			
1501	ATGAGAAGGG	GGTAAAATAG	ACATTTCAAA	ATAGGACACC	ATTGCTCCCC	TTTCCCTTAT			
1561	ATAATAGAGA	TAAGTAGTAA	ATAAATAGAA	AGTAAAAACC	CCTCAACTTT	GAGGAGTACT			
1621	TACCTTAATT	AATATCCCA	TTCCTT	GTC	AACTCCTCCCT	ATAAAAACAAA			
1681	CTCACA	CTCT	TCCTCTCCCT	CTCTCC	AAA	CCCTCCTCA	TTTCTCTCTC	TCTCTCCTTT	
1741	A	TCTTCTTCT	TCTTCTTC	AA	TTTTCTTCTC	CC	ATTTTCAA	AAATCATGGG	TGCAGCTCTT
1801	CTTCCAGATC	TCATAACAGA	GATTATCATT	CCTGTATG	CTGTAATTGG	AATTGCTTTT			

Sequenz des *Arabidopsis thaliana* BVP1-Promotors (L32792) (Hong unveröffentlicht)

Die Polypyrimidin-Motive ab 8bp Länge sind gelb unterlegt. Die TATA-Box ist in rot und der putative Translationsstart in blau dargestellt.

Promotor des Invertaseinhibitors AT1 (1488bp) aus *Arabidopsis thaliana*

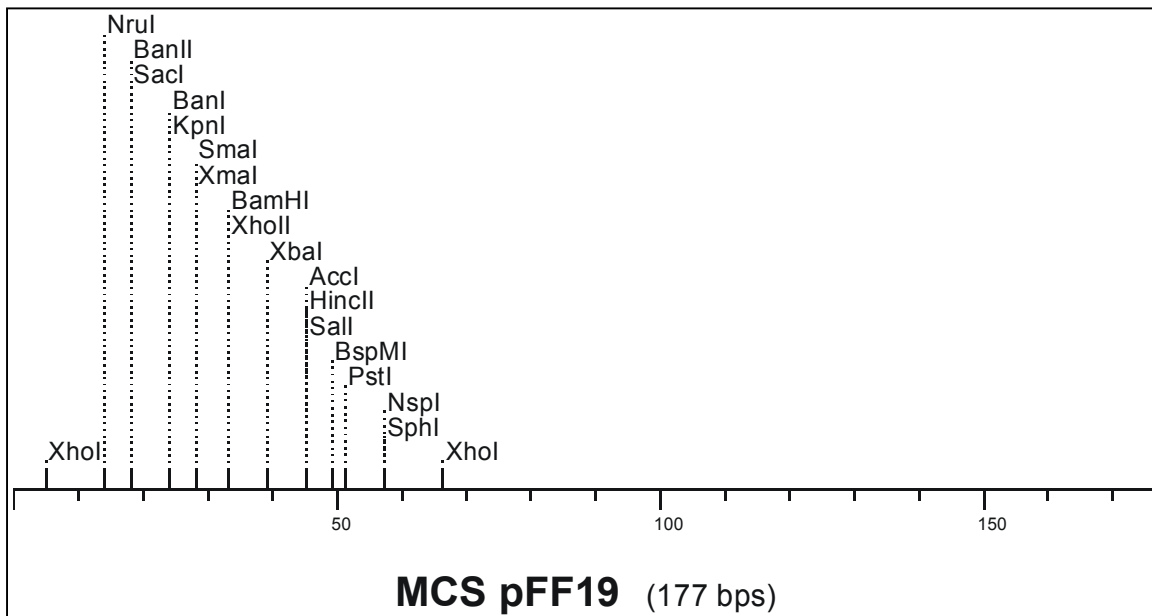
1	attgaaagtt	tactcgaacc	tctatgtaag	attcaaaacc	ataaacagat	ttatacaatc
61	cctactaaca	atatttactt	gottatcgta	aaagagttta	gatattttat	ttacataattt
121	atccaacaaa	aaacgtgtaa	tttgggtata	ttcgacgatt	gtatcattta	ttgttcttag
181	tttcgtacaa	tgattgagtt	gaatgattgg	attaggcaat	gtgtatcaac	atatgaaaaa
241	gacttcttgg	attcaactta	tctttcctcg	tttggcccaa	aaagcaacaa	aaataaatta
301	ggatgtataa	ctttaaggag	gataggatta	ttgaaatgaa	cttaagcagc	aacaacaaca
361	acaaaaaaaa	gcaatcgttt	gctttatttt	gtatgtttta	aataacgaaa	taattgtttg
421	cttttatatta	ctttaaaatt	tatcctagtt	tttaaagatg	atgtaatgtg	tatgtttgaa
481	ataacgaaat	aatgggtttgc	tttaatctac	tttaatttat	cctagtttta	aagatgatgt
541	taatgtttcc	accattacca	taaccaattg	ataatggcaa	aactacggcg	gagcaaaagt
601	tagccccttg	ataaagttcg	gatgaattga	attagcttaa	ttactacgca	atgtcacacg
661	ttaacttcaa	ctattggatc	cacctggcga	tgtttcacac	aatcggttcg	tcggaaagt
721	atagaaactt	taataacttg	gcccacatt	aatgacaaat	actacataca	tgtctcttgt
781	tttatctact	gcttagatct	taaaatattt	ggaaaaagaa	gccgtttatt	acacatacaa
841	aaaagtatca	ttgatgctgt	gaagtaagtg	aaaggatgag	attgtgtttg	ggtaaagagt
901	tttgaagtaa	cattggtata	gcatagttga	acacttgtat	atthttgttg	aaagttgtga
961	tttttttagtg	acgggttatgt	tactgatttt	aaagttaaaa	atgaagtttt	caacttttaa
1021	gataataaag	aaacatagat	cgaaaatttg	aagtcaaaat	taagaaatag	tcttaggcat
1081	aaatatcttt	accatatcat	gatcatttga	ctaattggcat	atthtaccat	taatagtaac
1141	aaatatcttca	gtcataacat	tagacctata	tttagtgttt	taccaatatt	gttcttggat
1201	actataaaaa	catacaaagt	aaaatthtga	ttgca ^{caata}	tt ^{caat} atag	ctthttggtat
1261	atatatthtaa	atthaaataa	ataaagaaaa	tgaaacttht	tatcctaagg	aatthttggtta
1321	<u>aagg^{ttacc}</u> at	cat ^{caatt} tcg	at ^{tatatata}	ttggagacgt	gcactacaca	gaca ^{aa} attac
1381	tacacgcaga	gctagacaca	cacttatatc	aactgatctt	ctcccaaaagc	ctgagaataa
1441	agaaaaacct	ccatctthtt	acatatatag	ataatcatca	aagaag ^{atga}	^{agatgatgaa}
1501	^{ggtgatgatg}	^{ttgatcgtga}	^{tgatgatgat}	^{ggtgatggtg}	^{atggtgagtg}	^{aaggaagtat}
1561	^{aatagagcca}	^{acatgtaaag}	^{agacaccaga}	^{cttcaatctt}	^{tgtgtgtctc}	^{tccttaactc}
1621	^{cgatccacgt}	^{ggttcctctg}	^{ccgacacttc}	^{tgccctcgct}	^{ctcatcctca}	^{ttgataaaat}
1681	^{caaggtccta}	^{taacattata}	^{ttttgatctg}	^{gtttctttca}	^{tatatatcca}	^{attatcttca}
1741	^{agtatcttat}	^{aagaatcaga}	^{tctthaaaca}	^{aggthtctt}	^{aatthcagta}	^{tagtataag}

Sequenz des *Arabidopsis thaliana* Inhibitor 1 Promotors AT1 (Link unveröffentlicht).

Die codierende Sequenz ab dem ersten Methionin (inkl. des vermutlichen Signalpeptids) ist blau dargestellt, dazwischen (in grün) befinden sich die beiden Introns. Schwarz unterlegt ist der vermutliche Transkriptionsstart; in rot ist die vermutliche TATA-Box des Promotors, in pink sind CAAT-Boxen dargestellt. (Analyse mit WWW Promoter Scan und GenscanW) KpnI-Schnittstelle fett und unterstrichen.

1	1257	ATAGCTTTTGGTATATATATATTTAAATTAAAATAAATAAAGAAAAATGAAACTTTTTATCCT
2	1	ATAGCTTTTGGTATATATATATTTAAATTAAAATAAATAAAGAAAAATGAAACTTTTTATCCT *****
1	1317	AAGGAATTTTGGTAAA <u>GGTACC</u> -----ATCATCAATTCTGA
2	61	AAGGAATTTTGGTAAA <u>GGTACC</u> <u>TTTCTCTCTCCTCCTCCTT</u> <u>GGTACC</u> ATCATCAATTCTGA *****
		+1 Transkriptionsstart
1	1377	T ^{TATATATA} TTGGAGACGTGCACTACACAGACA ^A ATTACTACACGCAGAGCTAGACACAC
2	121	T ^{TATATATA} TTGGAGACGTGCACTACACAGACA ^A ATTACTACACGCAGAGCTAGACACAC *****

Clustal eines Sequenzausschnitts des unveränderten AT1-Promotors ohne (1) und mit inserierter Polypyrimidin-Box1-Sequenz (2) aus dem BVA c1-Promotor (Punkt 5.5). Der Transkriptionsstart ist markiert. Die KpnI-sites sind unterstrichen, die Polypyrimidin-Box1 gelb unterlegt und die putative TATA-Box ist in rot dargestellt.



```

1 TCTCTCTCGA GCTTTCGCGA GCTCGGTACC CGGGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA
61 TGCAAGCTCG AGTTTCTCCA TAATAATGTG TGAGTAGTTC CCAGATAAGG GAATTAGGGT
121 TCCTATAGGG TTTCGCTCAT GTGTTGAGCA TATAAGAAAC CCTTAGTATG TATTTGT

```

Sequenz der MCS des pFF19-Vektors (Punkt 3.13).