

**Protein-Protein-Interaktionen zwischen
Homöodomänenproteinen der Gerste:
Identifizierung und Charakterisierung
interagierender Partner von BKN3, dem
Genprodukt des *Hooded*-Lokus**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Judith Müller
aus München

2000

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang, in der Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie (Prof. Dr. F. Salamini) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Rohde angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Saedler
Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.99

KURZZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung des Hefe Two-Hybrid Systems Protein-Protein Interaktionen zwischen Gerstenproteinen untersucht. Ausgangspunkt war *BKn3*, ein KNOX-Gen der Klasse 1, dessen Mutation für den dominanten homöotischen Phänotyp der Kapuzengerste verantwortlich ist.

Mit den Translationsprodukten von *BM8*, einem MADS-Box-Gen aus Gerste und *tumba*, einem möglichen Zielgen von BKN3, konnten im Two-Hybrid System keine Interaktionen nachgewiesen werden.

Zwischen BKN3 und den Klasse 1 bzw. Klasse 2 KNOX-Proteinen BKN1 und BKN7 konnten Assoziationen identifiziert werden. Die drei Proteine bilden im Two-Hybrid System Homodimere aus und heterodimerisierten in allen möglichen Kombinationen.

Durch einen Two-Hybrid Screen mit einem N-terminal deletierten BKN3-Derivat als Köder konnten Klone aus einer cDNA-Expressionsbank isoliert werden, die zwei bisher unbekannte Homöoboxgene repräsentieren. Sie gehören der HD-BEL1-Familie der Homöoboxgene an, die ursprünglich in *A. thaliana* beschrieben wurde.

Die Interaktionen zwischen BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2 konnten durch *in vitro* Bindungsstudien bestätigt werden.

Two-Hybrid Experimente mit deletierten Derivaten von BKN3 und JUBEL1 ermöglichten die Eingrenzung für die Interaktionen notwendiger Bereiche der Proteine.

Durch cDNA-Screens und 5'-RACE wurde vermutlich die gesamte kodierende Region von *JuBel2* identifiziert. Bezüglich des Transkriptionsstartpunktes von *JuBel1* besteht noch Unklarheit. Die Isolierung genomischer Klone lieferte Informationen über die Intron/Exon-Struktur beider Gene.

Erste Ergebnisse aus *in situ* Hybridisierungen von Gerstenpräparaten mit *JuBel1*- und *JuBel2*-spezifischen Sonden weisen auf die Expression beider Gene in jungen Blütenorganen und im vaskulären Gewebe der Infloreszenzachse hin.

JuBel1 und *JuBel2* wurden in transgenen Tabakpflanzen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors überexprimiert. Blüten- und Blattphänotypen der Primärtransformanten wurden analysiert.

ABSTRACT

Hooded is a dominant barley mutant, characterized by the appearance of an epiphyllous floret on the lemma of the flower. This Ph.D. thesis addresses protein-protein interactions of BKN3, the gene product of the *Hooded* locus. *Bkn3* is a member of the class 1 of the KNOX genes, which belong to the TALE (Three Amino acid Loop Extension) superfamily of homeobox genes.

In the yeast two-hybrid system BKN3 was shown to interact with BKN1 and BKN7, encoded by class 1 and class 2 KNOX genes, respectively, which had been previously isolated in our group. The three proteins form homodimers and they heterodimerize in all possible combinations. Interactions among BKN3 and BM8, a barley MADS-box protein, and TUMBA, encoded by a putative target gene of BKN3, could not be shown by this approach.

Two-hybrid screening of a cDNA expression library with an N-terminally deleted derivative of BKN3 as a bait led to the identification of JUBEL1 and JUBEL2, two novel barley TALE proteins. They are encoded by members of the KNOX-related BEL-class of homeobox genes. The complete cDNA and genomic sequences of *JuBel1* and *JuBel2* were determined.

The interactions among BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 and JUBEL2 were confirmed by *in vitro* pull-down assays.

Putative interaction domains could be identified by two-hybrid interaction studies with deleted derivatives of BKN3 and JUBEL1.

Preliminary *in situ* hybridization experiments with *JuBel1*- and *JuBel2*-specific probes indicated their expression in meristematic tissues, young floral organs and their primordia and in the vascular tissue of the barley inflorescence.

JuBel1 and *JuBel2* were expressed in transgenic tobacco under the control of the CaMV 35S promoter. Leaf- and flower phenotype of primary transformants are described.

**Stets Gewohntes nur magst du verstehn:
doch was noch nie sich traf,
danach trachtet mein Sinn.**
Richard Wagner, Die Walküre

**Nature abhors many things;
and one of them is originality**
Serikawa, 1997

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Homöoboxgene und Entwicklung	1
1.2	Morphologie der Gerste	2
1.3.	<i>Hooded</i> -die Kapuzengerste	4
1.4.	Überblick über die Homöoboxgene der Pflanzen	6
1.5.	Die Rolle der KNOX-Gene in der Pflanzenentwicklung	11
1.5.1	Dominante Mutationen in Klasse 1 KNOX-Genen	12
1.5.2	Expression von Klasse 1 KNOX-Genen in transgenen Pflanzen	14
1.5.3	Expressionsmuster der Klasse 1 KNOX-Gene	16
1.5.4	Rezessive Mutationen in Klasse 1 KNOX-Genen	18
1.6	Die Rolle von Protein-Protein Interaktionen in der Genexpression	20
1.7	Das Hefe Two-Hybrid System	22
1.8	Zielsetzung	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Lösungen und Medien	24
2.1.3	Genbanken	24
2.1.4	Bakterienstämme	25
2.1.5	Hefestämme	25
2.1.6	Pflanzen	25
2.1.7	Plasmide	25
2.1.8	cDNA-Klone	26
2.1.9.	Verwendete Kits und Oligonukleotide	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	26
2.2.1.1	Präparation von Nukleinsäuren	26
2.2.1.2	Klonierungstechniken und Elektrophoresen	26
2.2.1.3	PCR-Amplifikationen	27
2.2.1.4	DNA-Transfer und Hybridisierungen	27
2.2.1.5	5'-RACE	27
2.2.1.6	Sequenzierungen und Sequenzdateien	28
2.2.2.	Arbeiten mit Proteinen	28
2.2.2.1	SDS-PAGE	28
2.2.2.2	Coomassie-Färbung von Proteingelen	28
2.2.2.3	"Western"-Transfer von Proteinen	28
2.2.2.4	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	28
2.2.2.5	Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	29
2.2.3	<i>In vitro</i> Protein-Bindungs-Test	29
2.2.3.2	<i>In vitro</i> Transkription	29
2.2.3.1	<i>In vitro</i> Translation	30
2.2.3.3	<i>In vitro</i> Interaktionsstudien	30
2.2.3.4	Nachweis ³⁵ S-markierter Proteine in Polyacrylamidgelen	30
2.2.5	Herstellung der Two-Hybrid cDNA-Bank	31
2.2.6	Arbeiten mit Hefe	31
2.2.7	Tabaktransformationen	31
2.2.8	<i>In situ</i> Hybridisierung	32

3. ERGEBNISSE	33
3.1 Das Hefe Two-Hybrid System	33
3.1.1 Verifizierung der Hefephänotypen	33
3.1.2 Klonierung der <i>BKn3</i> -Konstrukte für das Two-Hybrid System	34
3.1.2.1 BD-BKN3 Δ 2 als "Köder" für das Two-Hybrid System	34
3.1.2.2 Nachweis des "Köder"-Fusionsproteins in transgenen Hefen	36
3.1.3 Interaktionsstudien mit bekannten Gerstenproteinen	37
3.1.3.1 Interaktionsstudien mit BM8 und TUMBA	37
3.1.3.2 Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7	38
3.1.4 Two-Hybrid "Screen" zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von BKN3	39
3.1.4.1 Konstruktion einer HybriZAP cDNA-Bank	39
3.1.4.2 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von BKN3 durch Two-Hybrid "Screening"	40
3.1.4.3 Verifizierung potentiell positiver Klone	41
3.2 Charakterisierung der cDNA Sequenzen von <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>	43
3.2.1 Sequenzanalyse der <i>JuBel1</i> -cDNA	44
3.2.1.1 Screening einer Gersten cDNA-Bank	44
3.2.1.2 5'-RACE	44
3.2.2 Sequenzanalyse der <i>JuBel2</i> -cDNA	48
3.2.2.1 Screening einer Gersten cDNA-Bank	48
3.2.2.2 5'-RACE	48
3.2.3 Sequenzvergleich der HD-BEL-Proteine	50
3.3 Genomische Organisation von <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>	51
3.3.1 Isolierung eines möglichen <i>JuBel1</i> -Pseudogens	51
3.3.2 PCR-Amplifikationen genomischer DNA zur Isolierung von Intronsequenzen	51
3.3.2.1 Intronamplifikationen mit <i>JuBel1</i> -spezifischen Oligonukleotiden	51
3.3.2.2 Intronamplifikationen mit <i>JuBel2</i> -spezifischen Oligonukleotiden	52
3.3.3 Isolierung genomischer Klone von <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>	53
3.3.3.1 Isolierung genomischer <i>JuBel1</i> -Klone	53
3.3.3.2 Isolierung genomischer <i>JuBel2</i> -Klone	53
3.3.3.3 Genomische Struktur von <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i> im Vergleich zu den <i>BEL1</i> -verwandten Genen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
3.3.4 "Southern-Blot"-Analyse von <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>	57
3.4 Charakterisierung der für die Interaktionen zwischen BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2 verantwortlichen Domänen im Two-Hybrid System	58
3.4.1 Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7	58
3.4.1.1 BKN3-Homodimerisierung	60
3.4.1.2 Interaktionen von BKN3 mit BKN1 und BKN7	60
3.4.2 Interaktionen von JUBEL1 und JUBEL2	61
3.4.2.1 Interaktionen von JUBEL1 und JUBEL2 mit BKN3	62
3.4.2.2 Interaktionen von JUBEL1 und JUBEL2 mit BKN1 und BKN7	66
3.4.2.3 Interaktionen zwischen JUBEL1 und JUBEL2	66

3.5	Expression von JUBEL1 und JUBEL2 als Fusionen an Glutathion-S-Transferase (GST) in <i>E. coli</i>	67
3.6	Bestätigung der imTwo-Hybrid System beobachteten Interaktionen durch <i>in vitro</i> Bindungsstudien	68
3.7	Nachweis der <i>JuBel1</i>- und <i>JuBel2</i>-Transkripte durch <i>in situ</i> Hybridisierung	70
3.8	Überexpression der <i>JuBel</i>-Gene in Tabak	72
3.8.1	Expression von <i>JuBel1</i> unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors	72
3.8.2	Expression von <i>JuBel2</i> unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors	74
4.	DISKUSSION	78
4.1	BKN3 im Two-Hybrid System	78
4.2	<i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>	80
4.2.1	Charakterisierung der cDNA-Sequenzen	80
4.2.2	Genomische Organisation von <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>	81
4.3	Interaktionen zwischen JUBEL- und BKN-Proteinen	82
4.4	Interaktionsdomänen der TALE-Superklasse der HD-Proteine	84
4.5	<i>JuBel</i>-Überexpression in transgenem Tabak	88
4.6	Welche Rolle spielen <i>JuBel1</i> und <i>JuBel2</i>?	93
5.	ZUSAMMENFASSUNG	91
6.	LITERATURVERZEICHNIS	93
7.	ANHANG	110
7.1	Klonierungen	110
7.2	Sequenzen	115
7.2.1	cBkn7 (GA3-55)	115
7.2.2	Genomische Sequenz von <i>JuBel1</i>	116
7.2.3	Genomische Sequenz von <i>JuBel2</i>	120
7.3	Liste verwendeter Oligonukleotide	123
7.4	Abkürzungen	125

1. EINLEITUNG

1.1 Homöoboxgene und Entwicklung

Die Entstehung eines Organismus ist von der präzise regulierten räumlichen und zeitlichen Expression entwicklungsrelevanter Gene abhängig. Die molekulare Charakterisierung von Entwicklungsmutanten ist häufig mit der Identifizierung von Transkriptionsfaktoren verbunden. Diese werden von einer limitierten Anzahl von Multigenfamilien kodiert, die meist über Speziesgrenzen hinweg konserviert sind.

Die ersten Mitglieder der Familie der Homöoboxgene (HB-Gene) wurden in *Drosophila melanogaster* in Verbindung mit homöotischen Mutationen beschrieben (McGinnis *et al.*, 1984; Scott und Weiner, 1984). Unter homöotischen Transformationen versteht man die Entstehung eines normal ausgebildeten Organs in einer Position, die im Wildtyp von einer anderen Struktur eingenommen wird (Bateson, 1894; Leavitt, 1909). Diese Multigenfamilie wird durch die etwa 60 Aminosäuren umfassende Homöodomäne charakterisiert, deren Sekundärstruktur sich in drei α -Helices gliedert und die Fähigkeit zu sequenzspezifischer DNA-Bindung vermittelt. Helix 2 und Helix 3 bilden eine dem Helix-Turn-Helix-Motiv aus prokaryontischen Transkriptionsfaktoren verwandte Struktur, wobei die Helix 3, die sogenannte "Erkennungshelix", sequenzspezifische Kontakte mit Basen in der großen Furche der DNA-Doppelhelix eingeht. N-terminal der Homöodomäne gelegene Bereiche binden, ebenfalls sequenzspezifisch, Basen in der kleinen Furche, während die Schleife zwischen Helix 1 und Helix 2 unspezifisch mit dem Phosphatrückgrad der DNA interagiert (McGinnis *et al.*, 1984; Gehring *et al.*, 1994; Damante *et al.*, 1996). Verwandte Gene wurden aus Tieren, Pflanzen und Pilzen isoliert und konnten in vielen Fällen als Regulatoren grundlegender Entwicklungsprozesse identifiziert werden. Sie werden sowohl anhand von Sequenzhomologien innerhalb der Homöobox als auch aufgrund anderer Strukturmerkmale in verschiedene Familien eingeteilt (Kenyon, 1994; Taylor, 1997).

Sowohl in Tieren als auch in Pflanzen wird der Grundbauplan während der Embryogenese festgelegt. Beispielsweise wird das Schicksal der Bereiche entlang der anterior-posterioren Körperachse in Tierembryonen unter Beteiligung von HOX-Genen bestimmt (Duboule und Morata, 1994; Krumlauf, 1994; Sharkey *et al.*, 1997). Mit Beendigung der Embryonalentwicklung ist die Musterbildung weitgehend abgeschlossen;

in späteren Phasen der Entwicklung wird im Wesentlichen das zuvor determinierte Schicksal der einzelnen Körperregionen ausgeführt. Die Pflanzenentwicklung ist im Vergleich dazu durch eine stärkere Plastizität charakterisiert: die Aktivität von Meristemen ermöglicht die Entstehung neuer Organe während des gesamten Lebenszyklus der Pflanze. Im Embryo wird lediglich die Polarität der Körperachse durch die Organisation der apikalen Meristeme der Wurzel und des Sprosses bestimmt (Steeves und Sussex, 1989). Damit erhalten sessile Pflanzen die Fähigkeit, ihre Entwicklung gezielt an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Sato *et al.*, 1998). Auch in der Pflanzenentwicklung fallen Homöoboxgenen wichtige Aufgaben zu (Schna und Davis, 1992; siehe 1.5.). Es ist zumindest ein Fall bekannt, in dem eine Mutante mit homöotischem Charakter auf Veränderungen in einem HB-Gen zurückzuführen ist (siehe 1.3.). Diese Befunde motivieren dazu, die Parallelen zwischen der tierischen und pflanzlichen Entwicklung hervorzuheben: sowohl die Segmente der Insekten als auch Blütenwirtel oder Phytomere der Pflanzen können als Variationen seriell wiederholter Einheiten betrachtet werden (siehe 1.2.). Die Identität dieser Einheiten wird unter Beteiligung von Homöoboxgenen und anderen Genfamilien bestimmt (Theißen und Saedler, 1995; Goodrich *et al.*, 1997).

1.2 Morphologie der Gerste

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L.) wird innerhalb der monokotylen Pflanzen zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) gerechnet (Briggs, 1978). Der vegetative oberirdische Teil wird durch den Wechsel von Nodien und Internodien charakterisiert, wobei die Aktivität interkalärer Meristeme in den basalen Bereichen der Internodien Streckungswachstum ermöglicht. Die parallelnervigen Blätter entspringen der basalen Hälfte der Nodien in zweizeiliger Anordnung und gliedern sich in die den Halm umgebende Blattscheide und die Blattspreite. An der Grenze zwischen beiden befinden sich die Ligula (Blatthäutchen) und die Aurikel (Blattöhrchen; Dahlgreen *et al.*, 1985). Seitensprosse und adventive Wurzeln entspringen aus der apikalen Region basaler Nodien. Der gesamte Aufbau der Pflanze kann in Einklang mit Phytomermodellen als eine Aneinanderreihung sich wiederholender, teilweise modifizierter, aber homologer Abschnitte beschrieben werden (Bossinger *et al.*, 1990; Bossinger *et al.*, 1992).

Der Prototyp des Phytomers besteht aus dem apikalen Teil eines Nodiums, das Seitenknospe bzw. adventive Wurzeln tragen kann, einem Internodium und dem basalen Bereich des sich anschließenden Nodiums, dem in der Regel ein Blatt entspringt (Abb. 1.1.). In Abhängigkeit von der Position innerhalb der Pflanze werden bestimmte

morphologische Charakteristika exprimiert beziehungsweise unterdrückt. Die basalen Phytomere der Pflanze tragen neben Blättern sowohl adventive Wurzeln als auch Seitensprosse, die zur Verzweigung der Pflanze führen. Das erste Blattorgan nach einem Verzweigungspunkt, das sogenannte Prophyll, entsteht durch die Verschmelzung von zwei Phytomeren, was durch das Auftreten zweier Mittelrippen morphologisch erkennbar wird.

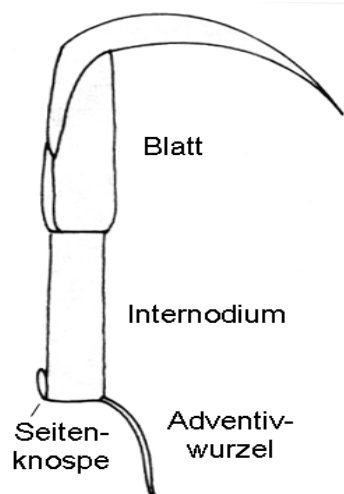


Abb. 1.1. Phytomer

Schematische Darstellung eines Maisphytomers mit Blatt, Internodium, Seitenknospe, und Adventivwurzel. (aus Jackson *et al.*, 1994).

Während die Seitenknospen des durch starkes Längenwachstum der Internodien gekennzeichneten Halmes unterdrückt werden, zeichnet sich die Infloreszenz durch zahlreiche Verzweigungen aus. Das Streckungswachstum in den Phytomeren der Ähre ist stark reduziert und die dort entstehenden Blattstrukturen unterscheiden sich von den Laubblättern. Die Infloreszenzachse (Rachis) bildet eine Verzweigungsachse erster Ordnung, aus deren Seitenknospe die Rachilla abzweigt. Aus dieser geht neben zwei verwachsenen Hüllspelzen die begrante Deckspelze (Lemma) hervor, deren Seitensproß dann die Blütenachse bildet. Die Lemma entspricht einem Blattorgan, wobei die Spelze selbst als Blattscheide, und die Granne als modifizierte Blattspreite anzusehen ist (Dahlgreen *et al.*, 1985). Die Vorspelze (Palea) entsteht als erstes Organ adaxial auf der Blütenachse und ist einem Prophyll homolog. Zwei Schwellkörper (Lodikuli), 3 Staubblätter (Stamina) und der Fruchtknoten (Karpell) mit der terminal gelegenen Ovule vervollständigen das einblütige Ährchen (Bossinger, 1990).

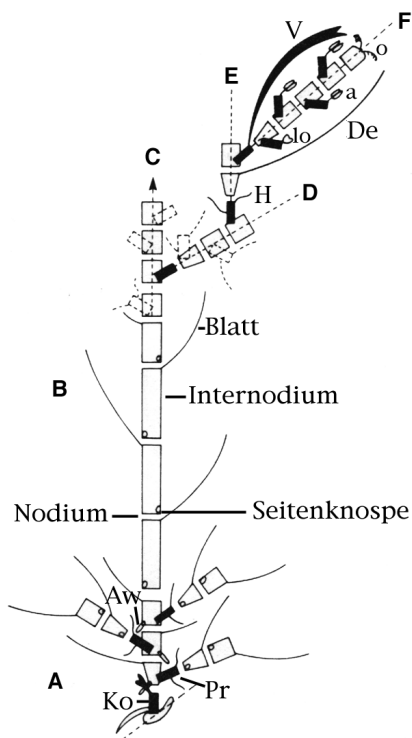


Abb. 1.2. Metamerer Aufbau der Gerste

A: basale Verzweigungsregion des Sprosses
 B: Halm
 C: Rachis
 D: Verzweigung erster Ordnung
 E: Rachilla
 F: Blütenachse

a: Anthere
 Aw: Adventivwurzel
 De: Deckspelze
 H: Hüllspelze
 Ko: Koleoptile
 lo: Lodikuli
 o: Fruchtknoten
 Pr: Prophyll
 V: Vorspelze

(aus Bossinger, 1990)

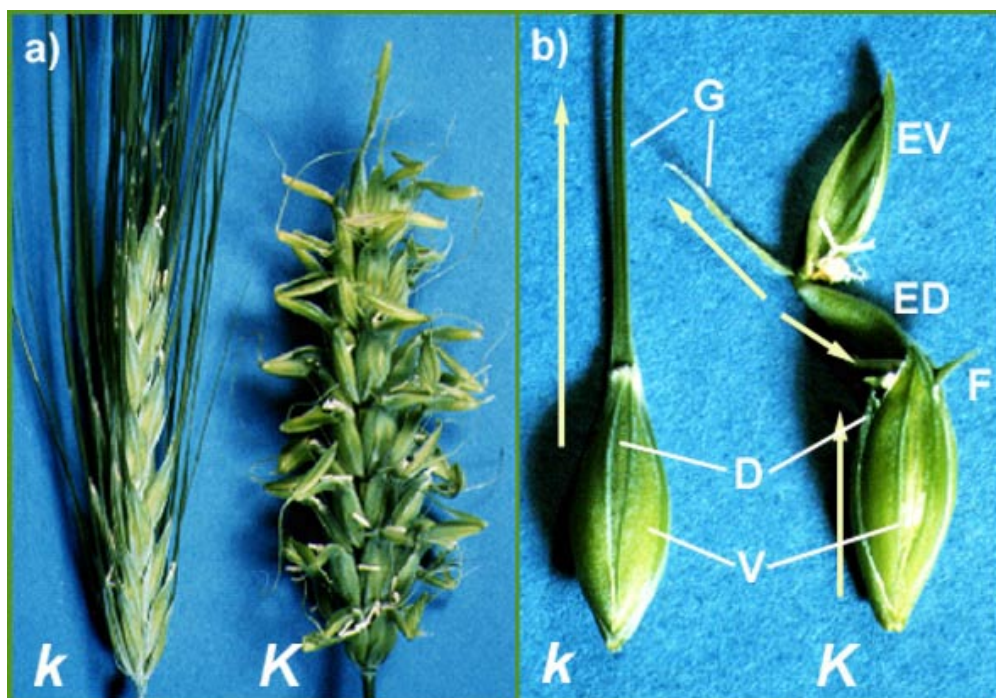
1.3 Hooded - die Kapuzengerste

Es wurden zahlreiche Mutanten in Gerste identifiziert, die durch Veränderungen des beschriebenen metameren Aufbaus charakterisiert sind. Dominante Mutationen des *K*-Lokus der Gerste bewirken die Entstehung einer Kapuzen-ähnlichen Struktur auf Deckspelzen der Gerstenblüte (Stebbins und Yagil, 1966). Durch perikline Zellteilungen in subepidermalen Zellschichten im Bereich des Grannenprimordiums entsteht *de novo* ein Polster meristematischen Gewebes ("Cushion"), das in der Folge eine vollständige Blüte produziert (Yagil und Stebbins, 1969). Auf der rudimentären Granne können noch ein bis zwei weitere Primordien entstehen, die aber nur selten zu kompletten Blüten ausdifferenzieren. Die Extrablüte besitzt eine Vorspelze und reproduktive Organe, wobei ihre Polarität in Relation zu der sie tragenden Lemma invertiert ist. An der Fusionsstelle beider Deckspelzen (der die Extrablüte tragenden und der ektopischen) entstehen zwei laterale Flügel (Abb. 1.3.). Diese Addition von Phytomeren entspricht einer "echten" Epiphyllie im Sinne der "*de novo*"-Entstehung von Organen auf einer ausdifferenzierten,

einem Blatt homologen Struktur wie der Deckspelze der Gerstenblüte (Dickinson und Sattler, 1974; Dickinson, 1978).

Der dominante *Hooded*-Phänotyp konnte auf eine Mutation in *BKn3*, einem Homöoboxgen der Klasse 1 der KNOX-Gene, zurückgeführt werden (siehe 1.4.). Es handelt sich um das orthologe Gerstengen zu *Knotted-1* aus Mais (siehe 1.5.). Ähnlichkeiten der beiden dominanten Phänotypen, starke Homologien zwischen den kodierenden Regionen und die genetische Kopplung beider Gene an ein Alkoholdehydrogenasegen (*Adh1*) in partiell synthenischen Bereichen der Gersten- und Maisgenome ermöglichten die Assoziation von Gen und Mutante. Der Phänotyp der Kapuzengerste entsteht durch die ektopische Expression des Gens in der Deckspelze der Blüte und hat seine molekulare Ursache in einer Duplikation von 305 bp im großen vierten Intron von *BKn3* (Müller *et al.*, 1995).

Abb. 1.3. Vergleich begrannter (*k*) und kapuzentragender (*K*) Gerstenblüten



a) Erscheinungsbild der *Hooded*-Infloreszenz (*K*) im Vergleich zum WT (*k*).

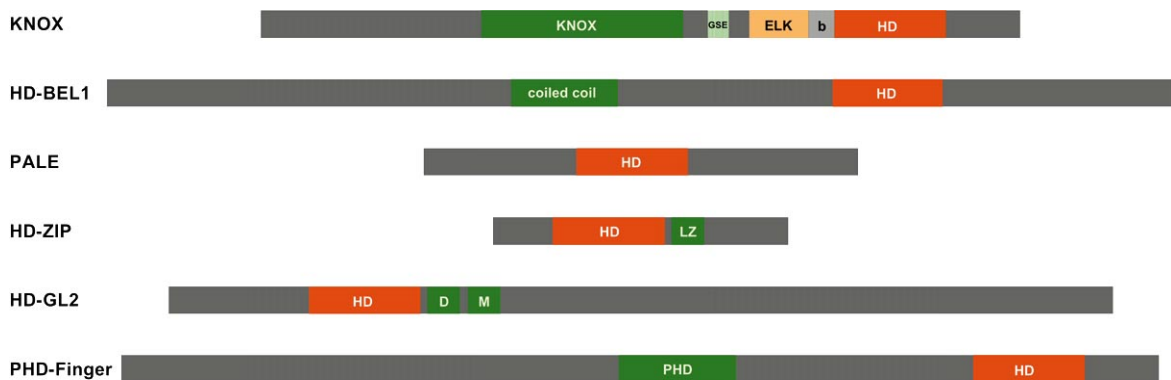
b) Detaildarstellung isolierter Blüten. Pfeile kennzeichnen die Polaritätsverhältnisse (siehe Text).

G: Granne; V: Vorspelze; D: Deckspelze; F: Flügel; EV: Extra-Vorspelze; ED: Extra-Deckspelze; (Abb. von Kai J. Müller zur Verfügung gestellt).

1.4 Überblick über die Homöoboxgene der Pflanzen

Auch im Pflanzenreich sind zahlreiche Homöoboxgene bekannt, die größtenteils über ihre Homologien zu bereits bekannten Genen dieser Gruppe, durch differenzielles Screening oder ihre Bindung an Promotoren isoliert wurden. Nur in wenigen Fällen konnten Mutanten auf Veränderungen in Homöoboxgenen zurückgeführt werden, so daß Hinweise zu möglichen Funktionen in Pflanzen vorwiegend aus Expressionsanalysen der Genprodukte und deren Überexpression in homologen oder heterologen Systemen stammen. Anhand der Ähnlichkeiten ihrer Homöoboxen und anderer konservierter Strukturelemente werden die pflanzlichen Homöoboxgene in sechs Familien eingeteilt: HD-KN1 (KNOX), HD-BEL1, HD-ZIP, HD-GL2, PHD-Finger und PALE (Abb. 1.4.).

Abb. 1.4. Familien der Homöoboxgene der Pflanzen

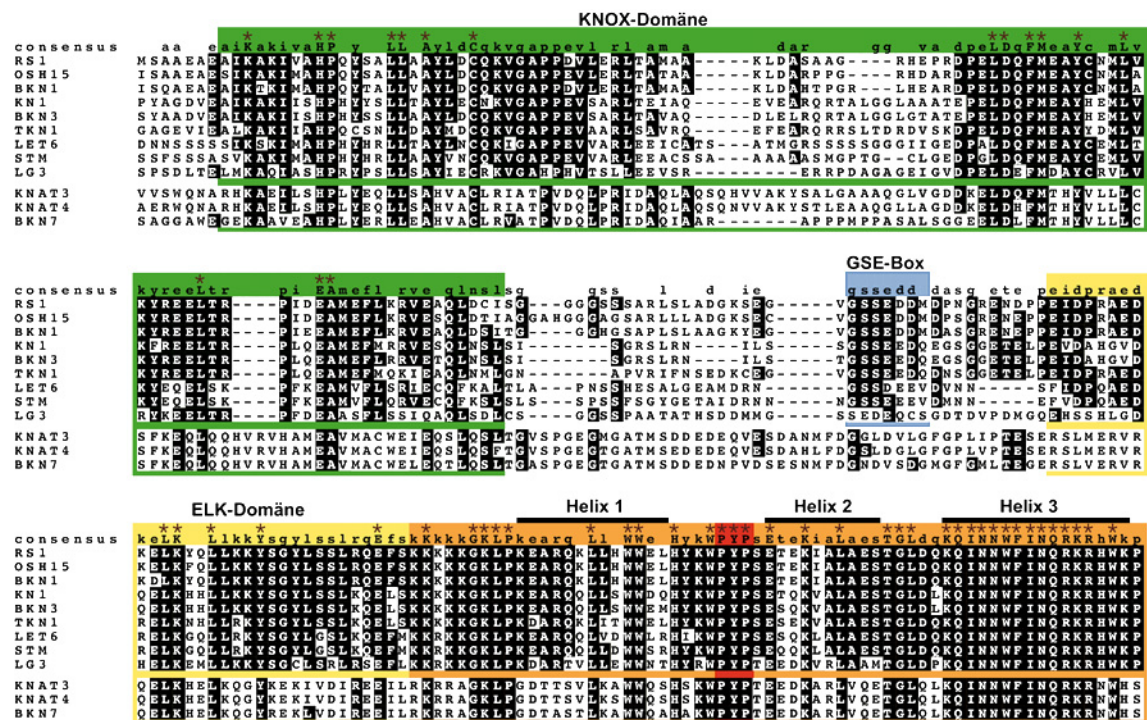


Schematische Darstellung der durch die bekannten HB-Genfamilien der Pflanzen kodierten Proteine. Homöodomänen wurden rot, andere konservierte Sequenzmotive, die möglicherweise eine Rolle in Protein-Protein Interaktionen spielen, grün gekennzeichnet. Einzelheiten siehe Text. b: basische Domäne; DM: Dimerisierungsdomäne; ELK: ELK-Domäne; GSE: GSE-Box; HD: Homöodomäne; LZ: Leuzin-Zipper-Domäne; PHD: PHD-Finger (verändert nach Chan *et al.* 1998).

HD-KN1 (KNOX)

Die best charakterisierte Familie der Pflanzen-Homöoboxgene ist die der KNOX-Gene. Die Zugehörigkeit zu dieser Gruppe wird neben den Homologien ihrer Homöodomänen aufgrund struktureller Ähnlichkeiten weiter N-terminal gelegener Abschnitte definiert.

Abb. 1.5. Multipler Sequenzvergleich der KNOX-, GSE-, ELK- und Homöodomänen einiger Klasse 1 und Klasse 2 KNOX-Proteine



Klasse 1: KNOTTED1(KN1), ROUGH SHEATH1 (RS1) und LIGULELESS3 (Lg3) aus Mais; BKN1 und BKN3 aus Gerste; Shootmeristemless (STM) aus *Arabidopsis*; LET6 aus Tomate; TKN1 aus Tabak.

Klasse 2: BKN7 aus Gerste; KNAT3 und KNAT4 aus *Arabidopsis*.

Die Domänen wurden durch Rahmen markiert: grün: KNOX-Domäne; blau: GSE-Box in Klasse 1 KNOX-Genen; gelb: ELK-Domäne; orange: Homöodomäne; rot: die zusätzlichen drei Aminosäuren (PYP) der TALE-Homöodomänen. Die drei Helices der Homöodomäne wurden durch Balken gekennzeichnet. Identische Aminosäuren wurden durch schwarze Unterlegung, ähnliche Aminosäuren grau markiert. Aminosäuren, die in allen Proteinen identisch sind, wurden durch braune Sterne über der Konsensussequenz angegeben. Bindestriche kennzeichnen Lücken, die für optimale Sequenzhomologie eingefügt wurden.

Durch einen kurzen basischen Bereich von der C-terminal gelegenen Homöodomäne getrennt tragen die KNOX-Proteine die als mögliche Dimerisierungsoberfläche diskutierte ELK-Domäne (Vollbrecht *et al.*, 1993). Außerdem besitzen sie N-terminal davon weitere konservierte Strukturelemente: die KNOX-Domäne und die GSE-Box in den Klasse 1 KNOX-Genen (Bürglin, 1997). Ebenso wie die HD-BEL1-Gene gehören sie der TALE-Superklasse (Three Aminoacid Loop Extension) einer Minderheit der "atypischen" Homöoboxgene an, die durch drei konservierte zusätzliche Aminosäuren zwischen Helix 1 und Helix 2 der Homöodomäne charakterisiert wird (Bertolino *et al.*, 1995). Mitglieder dieser Superklasse sind neben den KNOX- und HD-BEL1-Genen der Pflanzen die Familien der PBC-, MEIS-, TGIF- und IRO-Gene aus tierischen Organismen und Paarungstyp-Gene aus Hefe (Bürglin, 1997). Durch Sequenzvergleiche konnten Homologien zwischen N-terminal gelegenen Domänen der KNOX- und MEIS-Gene identifiziert werden, die auf eine sogenannte "MEINOX"-Domäne in einem gemeinsamen Vorfahren hindeutet (Bürglin, 1998; Abb. 1.5.).

Die Familie der KNOX-Gene wird anhand von Sequenzmerkmalen ihrer Homöodomänen und ihres Expressionsmusters in zwei Klassen unterteilt (Kerstetter *et al.*, 1994). Mehrere Mutanten in Mais, Gerste und *Arabidopsis* konnten auf Veränderungen in KNOX-Genen der Klasse 1 zurückgeführt werden (siehe 1.5.).

HD-BEL1

Die Gruppe der HD-BEL1-Gene wurde bisher nur in *A. thaliana* beschrieben. Mutationen in *BELL1*, nach dem die Genfamilie benannt wurde, verursachen Defekte in der Ovulenenwicklung (Reiser *et al.*, 1995). Ein weiterer Vertreter ist *ATH1* (*Arabidopsis thaliana homeobox 1*), dessen lichtregulierte Expression in photomorphogenetischen Mutanten abnormal ist (Quaedvlieg *et al.*, 1995). Wie die KNOX-Gene gehört diese Gruppe zur Superklasse der TALE-Homöoboxgene, wobei außerhalb der C-terminal gelegenen Homöobox keine Homologien zwischen beiden Genfamilien zu finden sind. Die Translationsprodukte der Gene dieser Gruppe tragen im N-terminalen Bereich eine mögliche coiled-coil Domäne, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln könnte und außerdem ein vermutetes Kernlokalisationsignal enthält (Reiser *et al.*, 1995; Bürglin, 1997).

PALE (Penta loop extension)

Vor kurzem wurden zwei Homöoboxgene aus *Populus tremula x tremuloides* isoliert, die sich von allen bisher beschriebenen Homöoboxgenen unterscheiden. Damit stellen sie Vertreter einer bisher unbekanntes kleinen Genfamilie dar, die auch in anderen Pflanzenspezies vorzukommen scheint. Ebenso wie die KNOX- und die HD-BEL-Gene sind sie den atypischen Homöoboxgenen zuzuordnen, wobei ihre Genprodukte im Gegensatz zu den TALE-Proteinen zusätzliche fünf AS in der Schleife zwischen Helix 1 und 2 der Homöodomäne tragen (Hertzberg und Olsson, 1998).

HD-ZIP

Die umfangreiche Familie der HD-ZIP-Gene (**H**omöodomäne-**L**euzin-**Z**ipper) umfaßt nach Schätzungen alleine in *Arabidopsis* um die fünfzig Mitglieder (Skena und Davis, 1994). Vertreter wurden inzwischen neben *A. thaliana* (Ruberti *et al.*, 1991, Mattson *et al.*, 1992; Skena und Davis, 1992; Carabelli *et al.*, 1993; Skena und Davis, 1994) auch aus *Daucus carota* (Karotte, Kawahara *et al.*, 1995), *Helianthus annuus* (Sonnenblume; Gonzalez *et al.*, 1997), *Lycopersicon esculentum* (Tomate; Meissner und Theres, 1995; Tornero *et al.*, 1996), *Glycine max* (Sojabohne, Moon *et al.*, 1996), *Oryza sativa* (Reis, Meijer *et al.*, 1997), *Pimpinella brachycarpa* (Moon *et al.*, 1996) und *Craterostigma plantagineum* (Frank *et al.*, 1998) isoliert. Unmittelbar C-terminal der Homöodomäne, die sich etwa in der Mitte der HD-ZIP-Proteine befindet, liegt ein Leuzin-Zipper Motiv. Durch Homo- bzw. Heterodimerisierung über diese Domäne werden die Homöodomänen der HD-ZIP-Proteine in eine Position gebracht, die eine Bindung an pseudopalindromische Erkennungssequenzen auf der DNA ermöglicht. Monomere sind nicht in der Lage an DNA zu binden. Dieser Mechanismus der DNA-Bindung unterscheidet sich grundsätzlich von dem anderer Homöodomänenproteine (HD-Proteine) (Sessa *et al.*, 1993; Sessa *et al.*, 1998). Die Familie der HD-ZIP-Gene scheint ausschließlich in höheren Pflanzen vorzukommen, was allgemein als Hinweis darauf gewertet wird, daß sie in der Evolution nach der Trennung von Tieren und Pflanzen entstanden ist und an der Regulation pflanzenspezifischer Prozesse beteiligt sein könnte (Ruberti *et al.*, 1991; Mattson *et al.*, 1992; Skena und Davis, 1992). Die Gruppe der HD-ZIP-Gene wird in drei bzw. vier Klassen unterteilt, wobei einige Autoren die *GLABRA2*-ähnlichen Gene dieser Familie zuordnen (DiCristina *et al.*, 1996), andere dagegen von einer eigenen Familie ausgehen (Lu *et al.*, 1996; Palena *et al.*, 1997).

HD-GL2

GLABRA2-ähnliche Gene sind bisher aus *A. thaliana* (Rerie *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1996; DiCristina *et al.*, 1996), *Phalaeonopsis sp.* (Nadeau *et al.*, 1996) und *H. annuus* (Valle *et al.*, 1997) bekannt. Ihre Genprodukte unterscheiden sich von denen der HD-ZIP-Gene durch einen ungewöhnlich langen C-Terminus, so daß die Homöodomäne eine eher N-terminale Position einnimmt. C-terminal davon befinden sich auch hier Dimerisierungsdomänen mit Homologien zu Leuzin-Zipper-Motiven, wobei im Gegensatz zu den Mitgliedern der HB-ZIP-Familie zwei durch eine Schleife getrennte Domänen vorliegen. Diese ermöglichen die Dimerisierung und DNA-Assoziation der Proteine über einen dem der HD-ZIP-Proteine ähnlichen Mechanismus (Palena *et al.*, 1997). Der Funktionsverlust des namensgebenden Vertreters dieser Gruppe, *GLABRA2*, bewirkt Abnormalitäten der Trichom- und Wurzelhaarentwicklung von *Arabidopsis* und vermindert die Ausbildung der die Samenhülle umgebenden Mukopolysaccharide (Rerie *et al.*, 1994; DiCristina *et al.*, 1996).

PHD-Finger

Die Familie der PHD-Finger-Gene (**P**lant **H**omeodomain-Finger; Schindler *et al.*, 1993) wird durch eine cysteinreiche Domäne N-terminal der Homöodomäne definiert, die Ähnlichkeit zu DNA-bindenden Zn-Finger-Motiven hat (Berg, 1990; Pabo und Sauer, 1992). Als mögliche Funktionen dieser konservierten Domäne werden Protein-Protein Interaktionen oder sequenzspezifische DNA-Erkennung diskutiert (Schindler *et al.*, 1993). Diese Gruppe der Homöoboxgene ist in ihrer Struktur relativ heterogen: einige Mitglieder enthalten neben der Homöodomäne und dem PHD-Finger weitere Strukturelemente wie einen putativen Leuzin-Zipper (Plesch *et al.*, 1997), eine zweite Homöodomäne oder "Collagen-like repeats" (Klinge *et al.*, 1996). Vertreter wurden bisher aus *A. thaliana* (Schindler *et al.*, 1993; Korfhage *et al.*, 1994), *Petroselinum crispum* (Petersilie; Korfhage *et al.*, 1994) und *Zea mays* (Mais; Bellmann und Werr, 1992; Klinge *et al.*, 1996) isoliert.

1.5 Die Rolle der KNOX-Gene in der Pflanzenentwicklung

Die Unterteilung der KNOX-Gene in zwei Klassen scheint aufgrund der grundsätzlich verschiedenen Expressionsmuster in Einklang mit ihren biologischen Funktionen zu stehen. Aus Mais sind zwölf KNOX-Gene bekannt; acht gehören der Klasse 1, vier der Klasse 2 an (Kerstetter *et al.*, 1994).

Über die Funktion der Mitglieder der Klasse 2 der KNOX-Gene ist nur wenig bekannt. Bisher konnte kein Phänotyp einer Mutante auf Veränderungen in einem dieser Gene zurückgeführt werden. Die Expression von Mitgliedern dieser Subfamilie wurde in Mais, *Arabidopsis*, Tomate und Gerste in beinahe allen untersuchten Geweben nachgewiesen (Kerstetter *et al.*, 1994; Serikawa *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1998; Yamei Wang, unveröffentlicht). Ihre ubiquitäre Expression und die starken Sequenzhomologien zwischen den Genen weisen auf eine mögliche funktionale Redundanz der Genprodukte hin. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, daß die Überexpression des Klasse 2 KNOX-Gens *KNAT3* aus *Arabidopsis* weder in *sense*- noch in *antisense*-Orientierung einen Phänotyp in transgenen Pflanzen bewirkt (Serikawa *et al.*, 1997). Eine mögliche Rolle der KNOX-Gene der Klasse 2 in der Regulation der Pflanzenentwicklung ist dennoch nicht ausgeschlossen, scheint aber in eher späten Entwicklungsstadien angesiedelt zu sein (Serikawa *et al.*, 1996, Serikawa *et al.*, 1997).

Klasse 1 KNOX-Gene wurden bisher aus Mais (Vollbrecht *et al.*, 1991; Kerstetter *et al.*, 1994; Schneeberger *et al.*, 1995), Gerste (Müller *et al.*, 1995), Reis (Matsuoka *et al.*, 1993; Sato *et al.*; 1996a; Serikawa *et al.*, 1997a; Sato *et al.*, 1999), *Glycine max* (Soja; Ma *et al.*, 1994), *A. thaliana* (Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996), *Brassica oleracea* var. *botrytis* (Blumenkohl; Granger *et al.*, 1996), Tabak (Müller, 1997; Tamaoki *et al.*, 1997) und Tomate (Hareven *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1998) isoliert. Neben der Ähnlichkeit ihrer Sequenzen zeichnen sich die Mitglieder der Klasse 1 der KNOX-Gene durch teilweise überlappende, gleichzeitig aber sehr distinkte Expressionsmuster aus. Sie werden vornehmlich in den meristematischen Geweben des Sprosses exprimiert; ihre Transkripte konnten bisher in Wildtyp-Pflanzen nicht in ausdifferenzierten Organen oder Wurzelgeweben nachgewiesen werden (Kerstetter *et al.*, 1994).

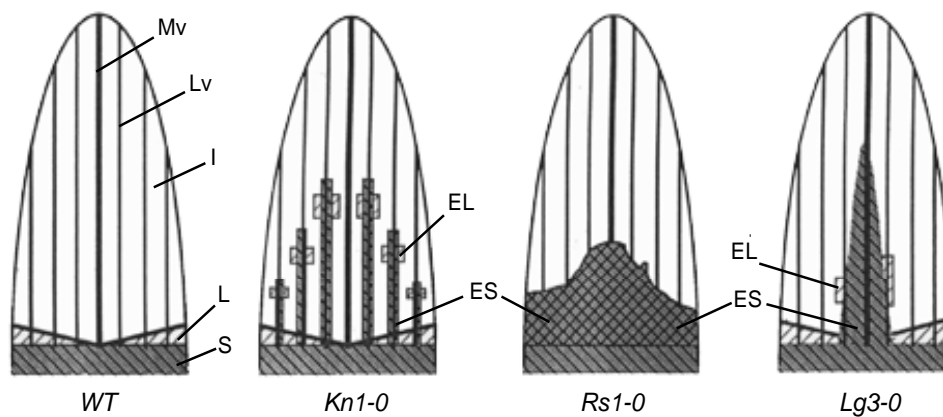
1.5.1 Dominante Mutationen in Klasse 1 KNOX-Genen

Zum Verständnis der Phänotypen einiger Maismutanten ist eine kurze Beschreibung der Blattentwicklung erforderlich: Das Maisblatt besteht, ebenso wie das der Gerste, aus der den Stengel umgebenden Blattscheide und der Blattspreite. Das Blatthütchen, die Ligula, und die Blattanhänge oder Aurikel markieren die Grenze zwischen Scheide und Spreite. Das apikale Sproßmeristem (SAM) gliedert in regelmäßigen Abständen Zellen ab, die sich in drei Schritten zu Blättern entwickeln. Die Positionen der Blattanlagen relativ zum SAM und damit ihre Entwicklungsstufen werden durch den Plastochron-Index beschrieben (Lamoreaux *et al.*, 1978). Zunächst wird eine Gruppe von etwa 250 Blattgründerzellen an der Flanke des vegetativen apikalen Sproßmeristems rekrutiert (Plastochronindex P0) und sich in der Folge durch intensive Teilungsaktivität auszeichnen (P1; Poethig, 1984). Durch weitere Zellteilungen entsteht ein ringförmiger, das Meristem umgebender Wulst (P2), der sich ab der primordialen Phase 3 zum Blattprimordium entwickelt (P3-P4). Der Reifungsprozess schreitet basipetal, d.h. ausgehend von der Spitze in Richtung der Blattbasis, voran. Zum Zeitpunkt der Differenzierung von Ligula und Aurikeln sind Zellteilungen nur noch in der Blattscheide zu beobachten, die sich im Vergleich zur Spreite in einem teilungsaktiveren und weniger gereiften Entwicklungsstadium befindet. Mittelrippe und laterale Blattvenen differenzieren sich im Gegensatz zum Rest des Blattes ausgehend von der Blattbasis (acropetal; Fowler und Freeling, 1996).

Mit der Klonierung von *Knotted-1 (Kn1)* aus Mais konnte erstmals eine Mutation in einem pflanzlichen Homöoboxgen mit einer Maismutante assoziiert werden (Vollbrecht *et al.*, 1991). Maispflanzen, die dominante *Kn1*-Allele tragen, zeichnen sich neben ihrer reduzierten Größe durch charakteristische Blattphänotypen aus. Vorzugsweise entlang der lateralen Blattvenen der Blattspreite entstehen durch epidermale und subepidermale perikline Zellteilungen knotenartige Verdickungen, die von ektopischen Ligulae begleitet werden (Gelinas, 1969). Die Epidermis dieser Wucherungen zeigt Oberflächeneigenschaften der Blattscheide (Becraft und Freeling, 1989). Das die laterale Blattvenatur umgebende Gewebe entwickelt sich in *Kn1*-Pflanzen nicht zum Sklerenchym, sondern behält weniger differenzierte, parenchymatische Eigenschaften (Freeling und Hake, 1985; Freeling, 1992).

In Mais wurden sechs weitere dominante Mutationen beschrieben, die ähnliche neomorphe Blattphänotypen verursachen. Allen gemeinsam ist eine Translokation von Gewebe mit Blattscheideneigenschaften in die Blattspreite, was als Anlaß zu ihrer Klassifizierung unter dem Oberbegriff der “Ligula-Polaritäts”-Mutanten genommen wurde. Der Übergang von Blattscheide zu Blattspreite wird in Richtung des distalen Endes des Blattes in die Spreite hinein verlagert, was durch das Auftreten von Ligula- bzw. Aurikel-ähnlichen Strukturen im Grenzbereich deutlich wird (Freeling, 1992).

Abb. 1.6. Schematische Darstellung der Blattphänotypen der Maismutanten *Kn1-0*, *Rs1-0* und *Lg3-0* im Vergleich zum Wildtyp



In den Blattspreiten der Mutanten *Kn1-0*, *Rs1-0* und *Lg3-0* entsteht Gewebe mit epidermalen Charakteristika der Blattscheide (siehe Text).

EL: Extra Ligula; ES: Extra Gewebe mit Blattscheideneigenschaften; I: intermediäre Venen; Lv: laterale Venen; L: Ligularregion; Mv: Mittelvene; S: Blattscheide; (verändert aus Freeling, 1992).

Neben *Knotted-1* konnten zwei weitere dieser Mutanten, *Liguleless3-0* (*Lg3-0*; Fowler und Freeling, 1996) und *Rough Sheath1-0* (*Rs1-0*, Becraft und Freeling, 1994) auf Veränderungen in Klasse 1-KNOX-Genen zurückgeführt werden.

Dabei sind verschiedene Bereiche bezüglich der lateralen Ausdehnung des Maisblattes betroffen (Abb. 1.6.). Im Falle der semidominanten Mutation *Lg3* beschränken sich die Defekte auf Gewebe oberhalb der Mittelrippe (Muehlbauer *et al.*, 1999). Dominante *Kn1*-Allele verursachen Abnormalitäten im Bereich der lateralen Blattvenatur, und bei den ebenfalls dominanten Allelen von *Rs1* erstreckt sich die Transition über die gesamte Breite des Blattes (Schneeberger *et al.*, 1995). Da der Entwicklungszustand der Blattscheide im Vergleich zur Blattspreite jünger ist, können diese Phänotypen als ein Verweilen der

Zellen in einem weniger differenzierten Zustand gedeutet werden. Diese These wird durch den Befund gestützt, daß durch fortgesetzte Teilungsaktivität in *Kn1-0-* und *Rs1-0-* mutanten Blättern Gewebewucherungen in den betroffenen Regionen entstehen.

Alle drei Mutationen werden durch die ektopische Expression der entsprechenden KNOX1-Gene in Blattorganen verursacht. Von den elf dominanten *Kn1*-Allelen tragen zehn Transposoninsertionen im 5'-Bereich des großen dritten Introns innerhalb der translatierten Region des Gens (Greene *et al.*, 1993); ein Allel kommt durch eine Duplikation des *Kn1*-Gens zustande (Veit *et al.*, 1992). Diese genomischen Veränderungen induzieren die ektopische Expression von *Kn1* in den Vorläuferzellen der Blattvenatur in frühen Blattstadien zusätzlich zu den *Kn1*-Expressionsdomänen des Wildtyps (Smith *et al.*, 1992). Ein *Rs1*-Allel ist ebenfalls auf eine Transposoninsertion in Intron III und eine daraus resultierende Überexpression des Genproduktes in Blattprimordien zurückzuführen (Schneeberger *et al.*, 1995). Die molekularen Ursachen für die *Lg3*-Mutation wurden bisher nicht veröffentlicht. Auch in diesem Fall besteht eine Korrelation zwischen mutantern Phänotyp und der ektopischen Expression des Gens in Blattgeweben (Muehlbauer *et al.*, 1999). Wie unter 1.3. beschrieben, bewirkt auch die Überexpression von *BKn3* in der Deckspelze der Gerste eine Transition in einen meristematisch aktiveren, weniger differenzierten Entwicklungszustand. Im Falle der *Hooded*-Mutation entsteht *de novo* meristematisches Gewebe, das eine extra Blüte auf der Deckspelze der normalen Gerstenblüte bildet.

1.5.2 Expression von Klasse 1 KNOX-Genen in transgenen Pflanzen

Der letzte Abschnitt befaßte sich mit der Beschreibung von Mutanten, die durch die ektopische Expression von Klasse 1 KNOX-Genen zustande kommen. In Anlehnung daran wurden ähnliche Situationen experimentell durch die Überexpression von KNOX-Genen in transgenen homologen und heterologen Pflanzenspezies nachgestellt. Beispielsweise gelang es, den *Hooded*-Phänotyp durch die Expression von *Kn1* unter der Kontrolle starker konstitutiver Promotoren in transgenen Gerstenpflanzen zu kopieren (Williams-Carrier *et al.*, 1997). Die ektopische Expression des *Kn1*-homologen Reisgens *OSH1* in Reis führte zu einem *Knotted*-ähnlichen Phänotyp transgener Pflanzen (Matsuoka *et al.*, 1993). In den meisten Fällen aber wurden dikotyle Pflanzen wie Tabak, *Arabidopsis* oder Tomate für entsprechende Experimente herangezogen.

In Tabak bewirkt die Überexpression von KNOX1-Genen bei gleichzeitiger Abschwächung der apikalen Dominanz eine Verzweigung der Pflanzen, was zu buschigem Wachstum

führt. Die Venatur betroffener Blätter läuft ausgehend von der Blattbasis fächerförmig auseinander, wobei sich das interfaszikulären Gewebe aufwölbt und außerdem Defekte in der Entwicklung des Palisadenparenchyms zu beobachten sind. In extremen Fällen entstehen durch die *de novo*-Ausbildung von meristematischem Gewebe ektopische Sprosse auf der adaxialen Blattseite. Diese können in Abhängigkeit von ihrer Position und dem Entwicklungszustand der Pflanze sowohl vegetative als auch reproduktive Identität besitzen. In einigen Fällen treten auch Abnormalitäten in der Entwicklung von Blütenorganen auf. Das Ausmaß der morphologischen Veränderungen korreliert dabei nicht immer mit der Expressionsstärke des Transgens; qualitative Faktoren wie die räumlichen und zeitlichen Expressionsdomänen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen (vergleiche Kano-Mukarami *et al.*, 1993; Matsuoka *et al.*, 1993; Sinha *et al.*, 1993; Lincoln *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995; Chuck *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996a und b; Müller, 1997; Parnis *et al.*, 1997; Tamaoki *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998).

Die Phänotypen KNOX1-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen sind ähnlich. Es werden verkleinerte, unregelmäßig gelappte Blätter gebildet, deren Einbuchtungen in einigen Fällen Stipulen tragen, wie sie normalerweise an der Basis von Blattprimordien auftreten. Auf den Rosettenblättern können ektopische vegetative Meristeme, auf den vom Infloreszenzmeristem gebildeten Tragblättern des Stengels regenerative Meristeme entstehen. Auch hier ist die Entwicklung des Leitgefäßsystems gestört, und die Ausbildung innerer Gewebe des Blattes wird beeinträchtigt (Matsuoka *et al.*, 1993; Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996; Pozzi, 1998).

In Pflanzenspezies mit zusammengesetzten Blättern, wie beispielsweise Tomate oder Kartoffel, bewirkt die Überexpression von KNOX-Genen der Klasse 1 die Entstehung von "super-zusammengesetzten" Blättern durch die Differenzierung zusätzlicher Fiedern höherer Ordnung (Hareven *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Parnis *et al.*, 1997). Auch die ektopische Expression von *BKn1* und *BKn3* verursacht eine erhöhte Komplexität transgener Kartoffelblätter (Kai J. Müller, unveröffentlicht).

Diese Studien zeigen, daß die ektopische Expression verschiedener KNOX1-Gene unabhängig davon, ob diese aus monokotylen oder dikotylen Pflanzen stammen, innerhalb einer Pflanzenspezies erstaunlich ähnliche Phänotypen bewirkt. Unterschiede werden weniger durch die Herkunft des Transgens, als vielmehr durch den genetischen Hintergrund der transformierten Pflanze bestimmt. Das Spezies-spezifische Entwicklungspotential, bestimmt durch mögliche Interaktionspartner und Zielgene, führt zu so unterschiedlichen Effekten wie den epiphyllen Sprossachsen in Tabak und den Blattphänotypen in Mais und Tomate. Gemeinsamkeiten zwischen den Phänotypen KNOX1-überexprimierender Pflanzen liegen in der Aufrechterhaltung bzw. *de novo*

Entstehung meristematischer Aktivität in normalerweise differenzierten Blattorganen und einer daraus resultierenden Verzögerung von Differenzierungsprozessen.

1.5.3 Expressionsmuster der Klasse 1 KNOX-Gene

Expressionsstudien in Form von RNA-Blots, *in situ*-Hybridisierungsexperimenten und Immunolokalisierungen liefern weitere Hinweise auf die möglichen Funktionen der KNOX-Gene der Klasse 1. In beinahe allen untersuchten Fällen beschränkt sich ihre Expression auf Bereiche mit meristematischer Identität, was die apikalen Sproßmeristeme (vegetatives Apikalmeristem, Infloreszenzmeristem, Blütenmeristeme und Meristeme der Seitensprosse) und das Grundgewebe der Sproßachse einschließt. Die Transkripte der Maisgene *Rs1* und *Kn1* werden in einem charakteristischen Muster im apikalen Sproßmeristem gebildet, was Rückschlüsse auf Aspekte der Phytomerentstehung zuläßt (Abb. 1.7.).

In situ-Hybridisierungen zeigen, daß die *Kn1*-mRNA im gesamten Korpus des SAM exprimiert wird, wobei die Blattprimordien und die Bereiche, aus denen sie entstehen, ausgespart bleiben. *Rs1* konnte in einem mit der Expressionsdomäne von *Kn1* überlappenden Ring unter den zukünftigen Blattprimordien nachgewiesen werden, der vermutlich dem entstehenden Internodium bzw. dem Bereich der Seitenknospe entspricht (Jackson und Hake., 1994). Wie bereits mehrfach angedeutet geht man davon aus, daß die KNOX-Gene der Klasse 1 eine wichtige Rolle in der Etablierung und/oder Aufrechterhaltung der Meristemidentität spielen. Die Expressionsmuster von *Kn1* und *Rs1* können vor diesem Hintergrund wie folgt interpretiert werden: *Kn1* erhält die Zellen in einem meristematischen Zustand, der sie für Differenzierungssignale unempfindlich macht. Durch das Fehlen der *Kn1*-Expression in den P0-Blattprimordien wird die Organinitiation und -differenzierung, in diesem Falle zu Blättern, ermöglicht. *Rs1* markiert dagegen möglicherweise ein sich vom SAM abtrennendes interkalares Meristem, aus dem Phytomere und Seitenknospen entstehen. Das für das vegetative SAM beschriebene Expressionsmuster von *Kn1* wiederholt sich in den Infloreszenz- und Blütenmeristemen und in den Meristemen der Seitensprosse.

Weitere Klasse 1 KNOX-Gene, deren mRNA-Expressionsmuster im vegetativen SAM dem von *Kn1* ähneln, wurden aus *Arabidopsis* (*SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*); Jackson *et al.* 1994; Smith *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1996), Tabak (*NTH15*; Tamaoki *et al.*, 1997) und Reis (*OSH1*; Sato *et al.*, 1996a; Sato *et al.*, 1996b) isoliert. Während *STM* in allen Zelltypen der Meristeme exprimiert wird, konnten die Transkripte von *Kn1* und *NTH15* nur im Korpus, nicht aber in der Tunika (der äußersten Zellschicht) des SAM nachgewiesen

werden. Durch Immunolokalisierungen wurde aber gezeigt, daß das KN1-Protein mittels eines gerichteten Transports durch Plasmodesmen auch in die L1-Schicht des Meristems gelangt (Jackson *et al.*, 1994; Lucas *et al.*, 1995). Auch Gene mit *Rs1*-ähnlichen vegetativen Expressionsmustern konnten aus Reis (*OSH15*; Sato *et al.*, 1998) und *Arabidopsis* (*KNAT1*; Lincoln *et al.*, 1994) isoliert werden (Abb. 1.7.).

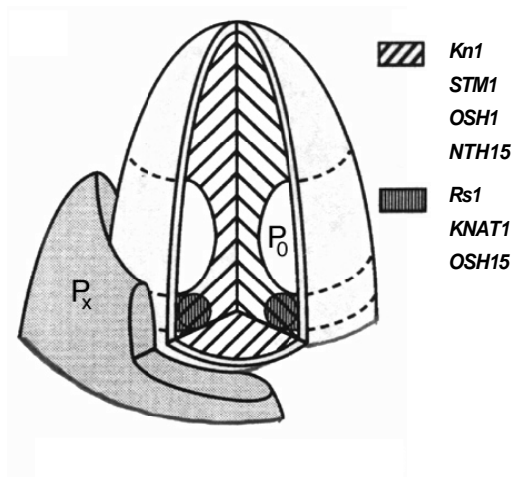


Abb. 1.7. Expression einiger KNOX-Gene der Klasse 1 im vegetativen SAM

Vergleichbare Expressionsdomänen einiger Klasse 1 KNOX-Gene aus verschiedenen Pflanzenspezies im vegetativen SAM wurden schematisch dargestellt (siehe Text). P_x/P₀ bezeichnet die Plastochron-Indices der Blattprimordien; (verändert nach Jackson *et al.*, 1994).

Die Parallelen zwischen den Expressionsmustern verschiedener Klasse 1 KNOX-Gene in monokotylen und dikotylen Pflanzenspezies sprechen für eine strenge Konservierung der Genfunktionen. Vergleicht man allerdings die Expressionsmuster derselben Gene in anderen Entwicklungsstadien, so wird deutlich, daß die Wirkungsmechanismen der Homöodomänenproteine (HD-Proteine) auch durch Flexibilität gekennzeichnet sind. Während beispielsweise die Expression sowohl von *Kn1*, *STM* und *OSH1* als auch von *OSH15* während früher embryonaler Stadien im Bereich des entstehenden Apikalmeristems auftritt, divergieren die Expressionsmuster in späteren Stadien beträchtlich: *Kn1*, *STM*, und *OSH1* markieren weiterhin das SAM, während *OSH15* das charakteristische *Rs1*-Expressionsmuster annimmt (Smith *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1998). *KNAT1*, dessen Expression während vegetativer Stadien der von *Rs1* und *OSH15* entspricht, kann im Gegensatz zu diesen nach der Transition zum Blütenmeristem nur noch im Infloreszenzstiel und in den Stempeln der Blüten nachgewiesen werden. Diese divergenten Expressionsmuster der einzelnen Gene sind einerseits ein Hinweis darauf, daß Klasse 1 KNOX-Gene verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien ausführen können. Andererseits kann aus den überlappenden Expressionsmustern auf eine teilweise funktionale Redundanz der Proteine geschlossen werden.

Eine Abweichung von den bisher beschriebenen "Standard"-Expressionsmustern der Klasse 1 KNOX-Gene stellen *Tkn1* und *Tkn2/LeT6* aus Tomate dar. Transkripte beider Gene konnten neben den üblichen KNOX1-Expressionsdomänen sowohl in jungen Blatt- und Fiederprimordien als auch in den Primordien von Blütenorganen nachgewiesen werden. *LeT6*-mRNA kommt außerdem in Ovulen und jungen Früchten vor (Hareven *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu der monopodialen Sproßachse, der indeterminierten Infloreszenz und den einfachen Blättern von *Arabidopsis* besitzenden Tomatenpflanzen sympodiale Sprosse, determinierte Infloreszenzen und zusammengesetzte Blätter. Die zusätzlichen Expressionsdomänen der Tomatengene könnten also Ausdruck der Etablierung verschiedener Baupläne unter der Kontrolle homologer regulatorischer Gene sein (Hareven *et al.*, 1996). Andererseits wurde auch die Expression der beiden KNOX1-Gene *BKn1* und *BKn3* aus Gerste zusätzlich zum SAM in jungen Blattprimordien und entstehenden Blütenorganen nachgewiesen (Yamei Wang, unveröffentlicht).

Zusammenfassend kann den Klasse 1 KNOX-Genen anhand ihrer Expressionsmuster eine Rolle sowohl in der Etablierung als auch in der Aufrechterhaltung meristematischer Identität zugewiesen werden. Während einige Gene, wie *Kn1* und *STM*, als Meristemmarkergene in allen Stadien der Pflanzenentwicklung gelten, werden andere KNOX1-Gene nur transient in bestimmten Phasen der Entwicklung exprimiert. Die Funktionen der HD-Proteine scheinen einerseits durch eine hohe Flexibilität ihrer Wirkungen, und andererseits durch Redundanz geprägt zu sein.

1.5.4 Rezessive Mutationen in Klasse 1 KNOX-Genen

Arabidopsis-Keimlinge, die homozygot für ein rezessives Nullallel von *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* sind, besitzen bei normaler Ausbildung der Kotyledonen kein apikales Sproßmeristem. Diese Abweichung von der Entwicklung des Wildtyps läßt sich bis in frühe Stadien der Embryogenese zurückverfolgen. Die charakteristischen Zellteilungen, die letztendlich zur morphologischen Organisation des embryonalen Apex in Tunika und Korpus führen, finden in *stm*-Mutanten nicht statt. Schwache *stm*-Allele ermöglichen die Entstehung adventiver Sprosse, deren Wachstum vorzeitig durch ein Blatt oder eine Blüte determiniert wird (Clark *et al.*, 1996; Endrizzi *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996).

Durch chemische Mutagenese heterozygoter *Kn1*-Pflanzen wurden auch rezessive Allele dieses Gens isoliert. Der Verlust von funktionalem *Kn1* führt zu diversen Abnormalitäten

der Maispflanzen: männliche und weibliche Infloreszenzen sind weniger verzweigt als im Wildtyp. Die weiblichen Blüten tragen zusätzliche Karpelle und wucherndes Ovulengewebe, was als ein Verlust des determinierten Wachstums der Blüte interpretiert wird und zu einer Verminderung der weiblichen Fertilität bis hin zu Sterilität führt. Außerdem bewirken einige Allele die Entstehung reduzierter zusätzlicher Blätter an den Nodien der normalen Blätter (Kerstetter *et al.*, 1994). Gerstenpflanzen, die homozygot für vermutliche rezessive *BKn3*-Allele sind, zeigen ähnliche wenig prägnante Phänotypen (F. Salamini, unveröffentlicht). Transposoninduzierte Nullallele des Reisgens *OSH15* bewirken starken Zwergwuchs der Pflanzen, der einerseits durch das Ausbleiben der Zellelongation in Epidermis und Parenchym, andererseits aber auch durch eine verminderte Aktivität der interkalaren Meristeme in den Internodien zustande kommt (Sato *et al.*, 1999).

Das komplette Fehlen eines apikalen Sproßmeristems in *stm*-Keimlingen von *Arabidopsis* bekräftigt die Rolle des betroffenen Klasse 1 KNOX-Gens in der Etablierung des embryonalen Sproßmeristems. Wenig eindeutige Phänotypen, die durch Funktionsverlust von *Kn1* in Mais, *BKn3* in Gerste bzw. *OSH15* in Reis verursacht werden, bestätigen einerseits die Rolle der Gene in verschiedenen Phasen der Entwicklung und andererseits die teilweise Kompensation ihres Fehlens durch redundante Faktoren.

Die Phänotypen der bisher beschriebenen rezessiven KNOX1-Mutanten zeigen, daß die betroffenen Gene keine offensichtliche Rolle in der Blattentwicklung spielen. Dennoch können aus den Effekten ihrer Überexpression Rückschlüsse auf die Blattentstehung gezogen werden. Die "maturation schedule"-Hypothese geht davon aus, daß die Überexpression von KNOX-Genen der Klasse 1 den zeitabhängigen Vorgang, der die spezifische Identität der Blattregionen bestimmt, beeinträchtigt (Freeling, 1992). Im frühen Blattprimordien erhalten zunächst distale Zellen die Information Blattspreitencharakter anzunehmen. Dann werden benachbarte Zellen dazu induziert, die Ligula/ Aurikel Region zu bilden, während die noch weiter proximal gelegenen Bereiche Blattscheidencharakter beibehalten. Das Schicksal der Zellen hängt dabei von ihrer Empfänglichkeit für die entsprechenden Signale ab. Diese könnte durch die Expression von KNOX1-Genen beeinflusst werden. Die Überexpression von *Kn1*, *Rs1* oder *Lg3* beispielsweise würde laut dieser Theorie die Annahme von Spreitencharakter verzögern und damit zu einem verlängerten Beibehalten des weniger differenzierten Scheidencharakters führen, was sich räumlich in der Verlagerung von Scheideneigenschaften in Spreitenregionen ausdrückt (Muehlbauer *et al.*, 1999).

1.5 Die Rolle von Protein-Protein Interaktionen in der Genexpression

Funktionale Analysen der durch HB-Gene kodierten Proteine lassen sowohl in Tieren als auch in Pflanzen auf eine Beteiligung dieser Genklasse an spezifischen und komplexen biologischen Prozessen schließen. Ihre funktionale Vielfältigkeit und Spezifität kann nicht alleine durch die wenig selektive Bindspezifität an eine limitierte Anzahl kurzer und ähnlicher DNA-Bindestellen erklärt werden (Laughon, 1991; Ekker *et al.*, 1994; Copeland *et al.*, 1996; Peltenburg und Murre, 1996; siehe 1.1.). Carr und Biggin (1999) zeigten durch *in vivo* Kreuzvernetzungsstudien, daß die Homöodomänenproteine BICOID und PAIRED an regulatorische Elemente vieler Gene im Drosophila-Genom binden. Funktionale Spezifität muß also durch zusätzliche regulatorische Mechanismen unabhängig von der intrinsischen Sequenzspezifität der DNA-Erkennung erreicht werden. Unterstützt wird diese Idee durch Untersuchungen von Sharkey *et al.* (1997), die zeigen, daß Unterschiede zwischen den Subgruppen der HOX-Proteine vor allem durch Aminosäuren bestimmt werden, die nicht an der DNA-Bindung beteiligt sind, da sie entweder in der Peripherie der Homöodomäne oder in anderen konservierten Bereichen liegen. Eine Möglichkeit der Regulation bietet die präzise Kontrolle der räumlichen und zeitlichen Expressionsdomänen vieler Homöoboxgene. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Expression von KNOX-Genen durch Myb-Proteine reprimiert wird (Timmermanns *et al.*, 1999; Tsiantis *et al.*, 1999). Die Aktivität der KNOX-Genprodukte kann durch alternatives Spleißen (Tamaoki *et al.*, 1995; Tamaoki *et al.*, 1996), posttranslationale Modifikationen (Jaffe *et al.*, 1997) oder ihre subzelluläre Lokalisierung (Rieckhof *et al.*, 1997; Azpiazu und Morata, 1998; Abu-Shaar *et al.*, 1999) reguliert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch Veränderungen der Chromatinstruktur die Zugänglichkeit der DNA für HD-Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen (Carr und Biggin, 1999). Am besten untersucht ist bisher die Modulation ihrer Funktionen und DNA-Bindspezifitäten durch Assoziationen mit Protein-Kofaktoren (Mann und Afolter, 1998).

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt im Studium von Protein-Protein Interaktionen unter der Beteiligung von HD-Proteinen der Gerste. Vor allem aus tierischen Systemen und aus Pilzen ist bekannt, daß durch die Assoziation mit anderen Proteinen ein hohes Maß kombinatorischer Komplexität erreicht werden kann. Die Bandbreite beobachteter Interaktionen reicht von Homodimerisierungen (Chalepakakis *et al.*, 1994; Suh *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1996) über Interaktionen zwischen verschiedenen HD-Proteinen gleicher oder verschiedener Familien (z.B. Kämper *et al.*, 1995; Lichtsteiner und Tijan, 1995; Pomerantz *et al.*, 1995; Copeland *et al.*, 1996; Mann und Chan, 1996; Mead *et al.*, 1996; Florence *et al.*, 1997; Pinsonneault *et al.*, 1997; Di Rocco *et al.*, 1999) bis zur Ausbildung von Heterodimeren mit Mitgliedern anderer Proteinklassen. Bisher wurden unter anderem

MADS-Box-Proteine (Vershon und Johnson, 1993; Chen und Schwartz, 1996), Zn-Finger-Proteine (Lee *et al.* 1998), HMG1 (High Mobility Group)-ähnliche Proteine (Zappavigna *et al.*, 1996), ein Mitglied der Hormonrezeptorsuperfamilie (Yu *et al.*, 1997), eine Phosphatase (Kawabe *et al.*, 1997) und auch Bestandteile der generellen RNA-Polymerase I Transkriptionsmaschinerie (Zhang *et al.*, 1996) als Interaktionspartner von HD-Proteinen identifiziert.

Aus dem Pflanzenreich sind bisher vorwiegend Homo- und Heterodimerisierungen von HD-ZIP-Proteinen bekannt. Die Assoziation erfolgt über die Leuzin-Zipper-Domänen der Proteine und ermöglicht die DNA-Bindung mittels der Homöodomänen beider Interaktionspartner (Sessa *et al.*, 1993; Meijer *et al.*, 1997). Auch in der Gruppe der HD-GL2-ähnlichen Gene konnten Dimerisierungsdomänen mit Ähnlichkeiten zu Leuzin-Zipper-Motiven identifiziert werden (Palena *et al.*, 1997). Aus Reis wurden Gene mit Homologien zu HMG1 isoliert, deren Translationsprodukte mit DNA-Erkennungssequenzen von Homöodomänen assoziieren. Interaktionen zwischen beiden Proteinklassen könnten also möglich sein (Meijer *et al.*, 1996).

Trotz der eher rudimentären Kenntnisse bezüglich der Interaktionen zwischen Homöodomänenproteinen aus pflanzlichen Organismen kann ihre Beteiligung an Multiproteinkomplexen in vergleichbarem Maße wie die ihrer Verwandten aus dem Tier- und Pilzreich als gegeben vorausgesetzt werden. Wie unter 1.4. beschrieben, gehören die KNOX-Gene der Superklasse der TALE-Homöoboxgene an. Aus *Drosophila* und Vertebraten ist bekannt, daß die Funktion der HOX-Proteine durch Interaktionen mit Proteinen der PBC-Klasse moduliert wird, und daß diese wiederum mit MEIS-Proteinen interagieren (Chang *et al.*, 1997b; Knoepfler *et al.*, 1997; Mann und Affolter, 1998; Berthelsen *et al.*, 1998; siehe 4.4.). Sowohl PBC- als auch die MEIS-Gene werden den TALE-Homöoboxgenen zugeordnet. Außerdem konnte dem C-terminalen Bereich der eng mit der KNOX-Domäne verwandten MEIS-Domäne eine Rolle in diesen Protein-Protein Interaktionen zugewiesen werden. Die MEIS-, PBC- und KNOX-Domänen werden entwicklungsgeschichtlich auf eine MEINOX-Vorläuferdomäne in dem gemeinsamen Vorfahren von Tieren und Pflanzen zurückgeführt (Bürglin, 1998). Die strukturelle Konserviertheit läßt auf mögliche funktionale Ähnlichkeiten der Domänen schließen, was Protein-Protein Interaktionen unter Beteiligung von Produkten der KNOX-Gene wahrscheinlich macht.

1.6 Das Hefe Two-Hybrid System

Als Methode zum Studium möglicher Protein-Protein Interaktionen von BKN3 wurde das Hefe Two-Hybrid System gewählt. Zu dessen Durchführung werden drei Komponenten benötigt: ein Hefestamm, der Reportergene unter der Kontrolle eines bestimmten Transkriptionsfaktors (beispielsweise GAL4) trägt, und zwei Fusionsproteine, die in diesem Stamm überexprimiert werden. Das System macht sich den modularen Aufbau vieler Transkriptionsfaktoren zunutze, der die Trennung von DNA-bindender und transaktivierender Domäne ohne deren Funktionsverlust ermöglicht. Werden die beiden isolierten Domänen getrennt in diesem Hefestamm koexprimiert, findet keine Aktivierung der Reporterexpression statt. Wird die Aktivierungsdomäne an einen Partner eines interagierenden Proteinpaares und die DNA-Bindedomäne an den anderen Partner fusioniert, so können beide Domänen bei Koexpression in Hefe durch die Assoziation der interagierenden Proteine zu einem funktionalen Transkriptionsfaktor vereinigt werden. Die zugrundeliegende Protein-Protein Interaktion wird anhand der Reporterexpression nachgewiesen. Mit diesem System können in Hefe sowohl bereits bekannte Proteine auf Interaktionen getestet, als auch unbekannte Interaktionspartner zu einem bekannten Protein durch Screenen einer cDNA-Expressionsbibliothek identifiziert werden (Fields und Song, 1989; Chien *et al.* 1991).

Das Two-Hybrid System bietet gegenüber biochemischen Methoden zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen, wie Koimmunopräzipitation oder klassischer Proteinaufreinigung, deutliche Vorteile: die Durchführung ist vergleichsweise einfach und schnell. Interaktionspartner werden direkt als cDNA-Klone isoliert und stehen zu weiteren Analysen zur Verfügung. Da die Studien in lebenden Hefezellen, also *in vivo*, durchgeführt werden, befinden sich die untersuchten Proteine in einer den natürlichen Bedingungen ähnlichen Umgebung. Dadurch wird eine hohe Sensitivität erreicht, die das Two-Hybrid System auch zum Nachweis schwacher und transienter Interaktionen geeignet macht.

1.7 Zielsetzung

Der Rahmen, in den sich die vorliegende Arbeit einfügt, besteht in dem Versuch, Entwicklungsmutanten der Gerste mit Hilfe des sogenannten "Candidate Gene Approach" mit Genen zu assoziieren. Grundlage dafür liefert die Charakterisierung und Kartierung von Entwicklungsmutanten der Gerste in Kombination mit der Isolierung und Kartierung potentiell entwicklungsrelevanter Gene der Homöobox- und MADS-Box-Genfamilien (Bossinger *et al.*, 1992; Bossinger *et al.*, 1993; Müller, 1997; Castiglioni *et al.*, 1998; Pozzi, 1998; Schmitz, in Vorbereitung).

Die Assoziation des Klasse 1 KNOX-Gens *BKn3* mit *Hooded* bietet ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieses Ansatzes (Müller *et al.*, 1995). Der Phänotyp der Mutante resultiert aus der ektopische Expression von *BKn3* in der Deckspelze der Gerstenblüte. In dem Versuch, den HD-Transkriptionsfaktor BKN3 in ein regulatorisches Netzwerk einzugliedern, wurden durch One-Hybrid Screening potentielle Regulatoren der *BKn3*-Expression identifiziert (Kai J. Müller und Luca Santi, unveröffentlicht). Differentielles Screening führte außerdem zur Isolierung eines möglichen Zielgens (Müller, 1997).

Der *Hooded*-Phänotyp kann durch die Expression von *Kn1* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors in transgener Gerste kopiert werden. Nicht das lokalisierte Vorhandensein des Genproduktes, sondern eine besondere Eigenschaft des betroffenen Blütenorgans scheint also eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Kapuze zu spielen (Williams-Carrier *et al.*, 1997). Es stellt sich die Frage, welche molekularen Faktoren für die einzigartige Kompetenz der Deckspelze verantwortlich sind, in dieser spezifischen Weise auf die ektopischer Anwesenheit von Klasse 1 KNOX-Proteinen zu reagieren.

Protein-Protein Interaktionen spielen eine wichtige Rolle in der Modulierung der Funktionen von HD-Proteinen - so vielleicht auch im Falle der Lemmaentwicklung der Kapuzengerste. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung möglicher Assoziationen von BKN3 mit bereits bekannten HD- und MADS-Box-Proteinen aus Gerste. Außerdem sollten mittels eines Two-Hybrid Screens neue Interaktionspartner - und damit neue Kandidatengene für den "Candidate Gene Approach" - identifiziert und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien, Antibiotika und Phytohormone wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Schwalbach); Plano (Marburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München) und Höchst (Frankfurt) bezogen. Radionukleotide, Röntgenfilme und Nylonmembranen wurden von Amersham Buchler (Braunschweig), Nitrozellulosemembranen von Schleicher & Schüll (Dassel) erworben.

Enzyme stammten von Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Neu Isenburg), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Uppsala, Schweden) und Stratagene (Heidelberg).

2.1.2 Lösungen und Medien

Standardlösungen wie SSPE, SSC, TBE etc. und die Medien zur Kultivierung von *E.coli* wie NZCYM, LB und DYT sind in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. *A.tumefaciens* wurde kultiviert in YEB-Medium: Casaminsäuren, Fleischextrakt, Saccharose (je 5 g/l), Hefeextrakt (1 g/l) und 2 mM MgSO₄. Für *A.tumefaciens* LBA4404 (s.u.) wurde aufgrund des Plasmids pAl4404 mit Rifampicin (100 mg/l) und Streptomycin (300 mg/l) selektiert, pBin19-Transformanten wurden auf Kanamycin (25 mg/l) selektiert.

Zur Regeneration und Kultivierung transgener Pflanzen wurden nach Murashige und Skoog (1962) modifizierte MS-Medien benutzt: Allgemeine Komponenten sind MS-Basalsalzmedium (Sigma; 4,5 g/l) sowie Myo-Inositol (100 mg/l), Thiaminhydrochlorid (0,1 mg/l), Glycin (2 mg/l), Nikotinsäure (0,5 mg/l) und Pyridoxinhydrochlorid (0,5 mg/l). MSI und MSII-Medium enthalten zusätzlich Glucose (30 g/l). MSII enthält ferner Kanamycin (100 mg/l), Claforan (500 mg/l), sowie die Phytohormone Zeatin (2 mg/l), GibberelinsäureA₃ (GA₃; 20 µg/l) und Naphtylelessigsäure (NAA; 20 µg/l). In MSIII fehlen die Phytohormone und anstelle von Glucose wird Saccharose (20 g/l) zugesetzt. Der pH-Wert der MS-Medien wird mit NaOH auf 5,8 eingestellt.

2.1.3 Genbanken

cDNA-Banken

K-Atlas-cDNA-Bank in λNM1149 : cDNA aus PolyA(+)RNA aus Infloreszenzen in Stadien der frühen Entwicklung epiphyller Meristeme wurde über *EcoRI*-Schnittstellen kloniert (Müller, 1993).

K-Atlas HybriZAP™ Two-Hybrid Bank: cDNA aus PolyA(+)RNA aus Infloreszenzen in Stadien der frühen Entwicklung epiphyller Meristeme wurde wie unter 2.2.4. beschrieben kloniert.

genomische Banken

K-Atlas genomische Bank: genomische DNA wurde partiell mit *Mbol* verdaut und in die *Bam*HI-Schnittstelle von λ EMBL4 kloniert.

Ca/C15 genomische Bank: genomische DNA wurde partiell mit *Mbol*-partial verdaut und in die *Bam*HI-Schnittstelle von λ EMBL3 kloniert.

2.1.4 Bakterienstämme

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH10B (Stratagene) verwendet. Für die Propagation der λ -Phagen kamen K803 (für λ EMBL3 und λ EMBL4; Fedoroff, 1983) und POP13 (für λ NM1149; Murray, 1983) zum Einsatz. Für die Pflanzentransformation wurde *A. tumefaciens* LBA4404 (Hoekema et al., 1983) verwendet. Die Proteinexpressionen wurden in BL21DE (Frangioni, 1993) durchgeführt.

2.1.5 Hefestämme

Two-Hybrid Experimente wurden mit den Hefestämmen Y187 und Y190 durchgeführt (Harper et al., 1993).

2.1.6 Pflanzen

Für Tabaktransformationen wurde *Nicotiana tabacum* Petit Havanna, Linie SR1, verwendet. Gerstenvarietäten, deren Gewebe für DNA- und RNA-Präparationen und zur Herstellung histologischer Präparate zur Durchführung von *in situ* Hybridisierungen verwendet wurden, waren Bonus, *Ca/C15*, *k-Atlas* und *K-Atlas* (G.L. Stebbins, Department of Genetics, University of California, Davis, USA).

2.1.7 Plasmide

Als Standard-Klonierungsvektoren wurden pBluescript II KS+/- (Stratagene), pUC19 (Clontech) und pCR®2.1 (Invitrogen) verwendet. Für Proteinexpressionen in *E. coli* kamen pGEX1 (Amrad), pGEX-5X-1 (Pharmacia) und pTYB1 (New England Biolabs) zum Einsatz. Konstrukte für Pflanzentransformationen wurden zunächst in pRT101, pRT104 oder pRT103-GUS (Töpfer et al., 1987) kloniert. Die Kassetten, bestehend aus Promotor, zu exprimierendem Gen und Terminator wurden dann in den binären Vektor pBIN19 (Bevan, 1984) integriert. Als Shuttle-Vektoren für *E. coli* und Hefe wurden pACT2 (Durfée et al.), pAS2 (Harper et al., 1993), pCL1 (Fields und Song, 1989), pAD-GAL4 (Stratagene) und pBD-GAL4(Cam) (Stratagene) verwendet.

2.1.8 cDNA-Klone

Die cDNA Sequenzen und Klone der Gerstengene *BKn1*, *BKn3*, *tumba* und *BM8* (cM33) wurden von Kai J. Müller zur Verfügung gestellt. Die Sequenz des cDNA-Klons von GA3-55 (*Bkn7*) lag teilweise sequenziert vor und wurde im Rahmen dieser Arbeit vervollständigt (siehe 7.1.).

2.1.9 Verwendete Kits und Oligonukleotide

Das Hefe-Two-Hybrid System wurde mit Komponenten des MATCHMAKER Two-Hybrid Systems von Clontech und des HybriZap™-Systems von Stratagene durchgeführt. Für RACE Amplifikationen wurden die Marathon™ cDNA Amplification und SMART™ RACE cDNA Amplification Kits von Clontech verwendet. PCR-Produkte wurden teilweise mittels des Original TA Cloning® Kits von Invitrogen kloniert. RNA-Präparationen aus Pflanzenmaterial erfolgten mit dem RNeasy™ Plant Mini Kit von Qiagen, und Plasmidpräparationen aus *E.coli* mit dem Qiagen Plasmid Kit. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit QIAEX® oder über QIAquick™-Säulen von Qiagen.

Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried), MWG (Ebersberg) und Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit QIAEX® oder über QIAquick™-Säulen aufgereinigt (Qiagen, 1995). Plasmidpräparationen aus *E.coli* erfolgten nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) und nach der Qiagen-Midipräparations-Methode (Qiagen, 1995). λ -DNA wurde nach der Methode von Benton und Davis (1977) präpariert. Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzen erfolgte nach dem Protokoll von Logeman *et al.* (1987) oder mit dem RNeasy™ Plant Mini Kit von Qiagen.

2.2.1.2 Klonierungstechniken und Elektrophoresen

Nicht näher beschriebene molekularbiologische Techniken wurden nach den Protokollen in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.2.1.3 PCR-Amplifikationen

PCR Amplifikationen, deren Produkte für Klonierungen bestimmt waren, wurden mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Diese zeichnet sich im Vergleich zu Taq-Polymerase durch eine geringe Fehlerrate aus. Die doppelsträngigen Amplifikationsprodukte der *Pfu*-Polymerase besitzen stumpfe Enden, über die sie bei Bedarf nach Phosphorylierung direkt in *Sma*I-geschnittene Vektoren kloniert wurden. Für die übrigen PCR-Amplifikationen wurde Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet. Die Reaktionen wurden im Triblock von Biometra durchgeführt.

PCR-Standardprotokoll:

1-10 ng	DNA-Matrize
1x	PCR-Puffer (enthält 1,5-2,5 mM MgCl ₂)
0-10%	DMSO
2 pmol/μl	Primer 1
2 pmol/μl	Primer 2
200 μM	dNTPs
1 U	Polymerase

Anzahl der Amplifikationszyklen, Dauer der einzelnen Schritte und Annealing-Temperaturen wurden in Abhängigkeit von den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten und den Primersequenzen bestimmt. Bei der Verwendung von Primern mit integrierten, zur Matrize nicht homologen Restriktionsschnittstellen wurden Amplifikationen mit zwei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt. Nach 5 Amplifikationszyklen bei einer Temperatur, die 2-4°C unter der für das Primerpaar errechneten Annealing-Temperatur lag, folgten 25 Zyklen bei der errechneten Temperatur.

2.2.1.4 DNA-Transfer und Hybridisierungen

DNA-Transfer aus Agarosegelen (Southern, 1975) auf Nylonfilter wurde mit SSPE als mobiler Phase durchgeführt. DNA-DNA-Hybridisierungen erfolgten im SSPE-Puffersystem bei unterschiedlichen Temperaturen (siehe Sambrook *et al.*, 1989). Für die Hybridisierung von Southern-Blots genomischer Gersten-DNA wurde ein Puffersystem mit 10% (w/v) Dextranesulfat, 6x SSC, 0.5% (w/v) SDS und 5x Denhardt's bei 68°C verwendet. Radioaktive DNA-Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) synthetisiert. Das Screening von Genbibliotheken mit radioaktiv markierten Sonden und die Filterhybridisierung wurden nach Benton und Davis (1977) durchgeführt.

2.2.1.5 5'-RACE

5'-RACE Amplifikationen wurden nach den Protokollen der verwendeten Kits durchgeführt. Die PolyA(+)RNA zur Herstellung der cDNA für die Verwendung des Marathon™ cDNA Amplification Kits von Clontech wurde aus jungen Infloreszenzen der Gerstenvarietät Bonus gewonnen (von Jürgen Schmitz zur Verfügung gestellt). Als Pflanzenmaterial für die 5'-RACE mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit von Clontech dienten Deckspelzen der Gerstenvarietät Bonus (von Carlo Pozzi zur Verfügung gestellt).

2.2.1.6 Sequenzierungen und Sequenzdateien

DNA-Sequenzen wurden auf PE/Applied Biosystems 377 und 3700 Sequenzern unter Verwendung der BigDye-Terminator Methode von der ADIS-Service-Einheit am MPIZ erstellt.

Sequenzdateien wurden mit Programmen der GCG-Software erstellt (Devereux *et al.*, 1984). Sequenzvergleiche in Datenbanken wurden mit BLAST durchgeführt (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; Altschul *et al.*, 1990).

2.2.2 Arbeiten mit Proteinen

2.2.2.1 SDS-PAGE

Proteinproben wurden mit 1 Volumen 2 x Probenpuffer versetzt, 5 Min auf 95°C erhitzt und anschließend auf 10% bzw. 12,5% Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Probenpuffer (2x): 100 mM, Tris-HCl (pH6,8), 20% Glycerin, 4% SDS, 5,5% β -Mercaptoethanol

2.2.2.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Um die Proteine nach der SDS-PAGE im Gel sichtbar zu machen, wurden diese in Abhängigkeit von ihrer Dicke 10 Min - 2 Std in Färbelösung (0,2% Coomassie-Brilliant-Blue, 45%Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen in der Entfärbelösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure) wieder entfärbt.

2.2.2.3 "Western"-Transfer von Proteinen

Proteine wurden nach SDS-PAGE durch elektrischen Transfer auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (Transfer-Puffer: 250 mM Tris, 1,92M Glycin, pH8,2-8,4). Zur Kontrolle des Protein-Transfers wurden die Nitrozellulose-Filter anschließen 5 Min in Ponceau gefärbt und in H_2O_{bidest} entfärbt.

2.2.2.4 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Die Proteinfiler wurden nach einstündiger Inkubation in Blocking-Puffer (1 x TBS, 0,1% Tween20, 5% Magermilch-Pulver) in TBS-T (1 x TBS, 0,1% Tween) überführt und 2 Std mit dem verdünnten primären Antikörper (GAL4 DNA-BD mAB: 1 : 20 000, Clontech) bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-T erfolgte die Hybridisierung mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Maus: 1 : 3000) ebenfalls für 2 Std bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in TBS-T wurden die Protein-gebundenen Antikörper mittels des ECL-Kits nach den Angaben des Herstellers nachgewiesen.

2.2.2.5 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Überexpression der GST-Fusionsproteine wurde in dem *E.coli*-Stamm BL21DE durchgeführt. Aus einer über Nacht-Kultur wurde eine Tageskultur angeimpft, wobei die Expression des Fusionsproteins zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Für Expressionskontrollen wurden 2 ml der Kulturen abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 2 x Probenpuffer resuspendiert, 5 Min auf 95°C erhitzt und nach SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt.

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte nach Frangioni (1993) mittels Glutathion-Sepharose.

Für *in vitro* Interaktionsstudien wurden die Glutathionsepharose-assoziierten GST-Fusionsproteine verwendet.

Zur Antikörperproduktion wurden die GST-Fusionen durch SDS-PAGE von der Matrix getrennt. Die Banden wurden im Gel durch Inkubation in eiskaltem 1 M KCl gefärbt ausgeschnitten und in Laemmli-Elektrophoresepuffer (Laemmli, 1970) elektroeluiert.

2.2.3 *In vitro* Protein-Bindungs-Test

2.2.3.1 *In vitro* Transkription

cDNA-Abschnitte der zu untersuchenden Gene wurden entweder in der Orientierung des T3- oder T7- Promotors in pBlueskript kloniert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdau linearisiert und als Matrize für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Die Restriktionsendonuklease wurde dabei so gewählt, daß sie eine einzige Erkennungssequenz jenseits des 3'-Endes des gewünschten Transkriptes besaß und außerdem 5' überhängende Enden generierte. Pro Transkriptionsansatz wurde etwa 1 µg linearisierter Plasmid-DNA eingesetzt.

5 µl	Template (200 ng/µl)
5 µl	10 x Reaktionspuffer
7,5 µl	3,3 mM CTP/ATP/UTP
5 µl	0,5 mM GTP
5 µl	m ⁷ G(5')ppp(5')G
1,5 µl	RNase Inhibitor (40U/µl)
1,5 µl	T3/T7 RNA-Polymerase (5U/µl)

Gesamtvolumen 50 µl

Die Ansätze wurden 90 Min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl DNase erfolgte eine weitere 10-minütige Inkubation bei 37°C.

Nach Phenol-Chlorophorm-Extraktion und Ethanol-fällung wurden die Pellets in 10 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und durch Gelelektrophorese getestet.

2.2.3.2 *In vitro* Translation

Die *in vitro* transkribierte RNA wurde 1:100 verdünnt und in der *in vitro* Translation verwendet.

2,5 µl	<i>in vitro</i> transkribierte RNA
2 µl	Transaktionsmix (vom Hersteller mitgeliefert)
1 µl	1 M KOAc
2 µl	³⁵ S-Methionin (1000 Ci/mmol) bei 10 mCi/ml
1 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)
8 µl	H ₂ O _{bidest}
10 µl	Wheat Germ Extract (Promega)

Die Ansätze wurden 90 Min bei 25°C inkubiert und durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie getestet.

2.2.3.3 *In vitro* Interaktionsstudien

Diese Methode diente zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen *in vitro*. Dazu wurde einer der möglichen Interaktionspartner als Fusion an Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* überexprimiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose (GS) aufgereinigt (siehe 2.2.2.5.). Ein zweites Protein wurde in Form von radioaktiv markiertem *in vitro* Translationsprodukt zugegeben. Die Interaktionsansätze wurden in Interaktionspuffer (20 mM TrisHCl (pH 8,0), 0,1% NP40, 50/75/100/125 mM NaCl) 2 Std bis über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Im Falle einer Interaktion wurde ein Anteil des radioaktiv markierten Proteins durch Bindung an das GST-Fusionsprotein mit der Glutathion-Sepharose pelletiert.

20 µl der an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteine wurden durch Zentrifugation bei 1000 rpm 4 x in Interaktionspuffer gewaschen und in einem Endvolumen von etwa 50 µl aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl der radioaktiv markierten, *in vitro* translatierten Proteine wurden die Ansätze unter Schwenken 2 Std bis über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen und mit einem Volumen 2 x Probenpuffer versetzt. Die Pellets wurden nach 4-5 Waschrissen mit Interaktionspuffer ebenfalls mit einem Volumen 2 x Probenpuffer versetzt. Nach 5 Min bei 95°C wurden Überstände und Pellets durch SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

2.2.3.4 Nachweis ³⁵S-markierter Proteine in Polyacrylamidgelen

Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine wurden die Gele nach SDS-PAGE 1 Std in 40% Methanol, 10% Acetat fixiert, 2 x 30 Min in DMSO geschwenkt, 1 Std in RotifluoreszintD inkubiert und anschließend 1 Std in H₂O_{bidest} gewässert. Dann wurden die Gele bei 60°C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

2.2.4 Herstellung der Two-Hybrid cDNA-Bank

Die Herstellung der cDNA für die HybriZAP™-Bank (Stratagene) erfolgte nach Anleitung und mit Hilfe von Hans Sommer. Die RNA wurde nach Logemann *et al.* (1987) aus jungen Infloreszenzen von *Hooded*-Gerstenpflanzen isoliert. Aufreinigung der PolyA(+)RNA erfolgte über Oligo-dT-Cellulose (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers.

In die Erststrangsynthese mittels MMLV-Reverser Transkriptase wurden 5 µg Poly(A)+ RNA eingesetzt. Dabei wurde ein Zufallsprimer (siehe Anhang: Primer) verwendet, der zur Erleichterung der späteren Klonierung eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle trägt. Die Erststrangsynthese fand in Gegenwart von methyliertem dCTP statt. Außerdem wurde zur erleichterten Mengenabschätzung $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP inkorporiert. Nach Zweitstrangsynthese durch DNA-Polymerase, RNase-Verdau und Auffüllen überhängender Enden durch T4 DNA Polymerase wurden *Eco*RI-Adaptoren an die glatten Enden der doppelsträngigen cDNA ligiert. Durch Restriktionsverdau mit *Xho*I entstanden cDNA-Fragmente mit *Eco*RI- bzw. *Xho*I-Überhängen an ihren 5'- bzw. 3'-Enden. Nach Größenfraktionierung über Sephacell-Säulen wurde die cDNA in die *Eco*RI und *Xho*I-geschnittenen Vektorarme des HybriZAP™-Systems von Stratagene ligiert. Für die cDNA-Ligation, Verpackung, Amplifikation und *in vivo*-Exzision des pAD-GAL4 Phagemid-Vektors wurden die Protokolle des Stratagene HybriZAP™ Two-Hybrid Vektor-Kits befolgt. Die Bank wurde in Form der amplifizierten Primärbibliothek aufbewahrt.

2.2.5 Arbeiten mit Hefe

In dieser Arbeit wurden anfänglich die Vektoren pACT2 und pAS2 des MATCHMAKER Two-Hybrid Systems von Clontech für Interaktionsstudien verwendet. Die Vektoren pAD-GAL4 und pBD-GAL4Cam des HybriZap™-Systems von Stratagene kamen bei der Herstellung der cDNA-Bank und den späteren Konstrukten zur Charakterisierung von Interaktionen zum Einsatz. Als Hefestamm diente vorwiegend Y190, der als Reportergene sowohl *LacZ* als auch *HIS3* unter der Kontrolle GAL4-abhängiger Promotoren trägt. Für einige Experimente wurde außerdem Y187, der nur das *LacZ*-Reportergen besitzt, parallel als Kontrolle eingesetzt.

Hefetransformationen und Plasmidpräparationen wurden nach den Protokollen der verwendeten Kits, Hefe-Proteinextraktionen nach dem Clontech Produktprotokoll zu den monoklonalen GAL4-Antikörpern durchgeführt. β -Galaktosidase-Tests erfolgten nach Essers und Kunze (1996).

2.2.6 Tabaktransformationen (vgl. Horsch *et al.*, 1986)

Transformierte Agrobakterien-Kulturen wurden bei 28 °C über Nacht in YEB-Medium angezogen und mit einem Kulturvolumen 10 in situ mM MgSO₄ und MSI-Medium gewaschen. Die Zellsuspension (ca. 30 ml) wurde auf eine OD=1 eingestellt und mit leicht verwundeten Blattscheibchen inkubiert. Nachfolgend wurden die Blattscheiben 2 Tage bei 26 °C im Dunkelraum auf MSI-Agar kultiviert. Die weitere Kultivierung erfolgte unter Langtag-Bedingungen (16 Std Licht, 25 °C; 8 Std Dunkelheit, 18 °C; 55% rel. Luftfeuchte). Vor dem Transfer und der Kultivierung auf MSII-Medium wurden die Blattscheiben in Claforan (1 g/l in MSI) gewaschen. Nach der Entwicklung von Kalli und nachfolgenden

Sproßachsen auf MSII-Medium (nach ca. 1-3 Monaten; Medienwechsel ca. alle 2 Wochen) wurden die Sproßachsen auf MSIII-Medium überführt. Nach der Wurzelbildung auf MSIII (ca. 2-4 Wochen) erfolgte der Transfer der transgenen Klone in Erde und nach einer Woche in der Phytokammer wurden die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt.

2.2.7 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung erfolgte in den Grundzügen nach dem Protokoll von DeBlock und Debrouwer, 1996. Das Gewebe wurde über Nacht nach Vakuuminfiltration in 4% FAE fixiert (50% Ethanol, 10% Essigsäure, 4% Formaldehyd). Nach Einbettung in Histowax (Leica) wurden Schnitte von 10 µm (Leica RM2065) hergestellt. Zur Vorbereitung des Gewebes auf die Hybridisierung wurde eine 20-minütige Inkubation in 0,2 N HCl vor dem PNK-Verdau eingeschoben. Dieser wurde 5 Min mit 20 µg/µl PNK in 2 x SSC/ 0,1% SDS durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte bei einer Probenkonzentration von 2 ng/µl über Nacht bei 42°C.

Hybridisierungspuffer:

50%	Formamid
2,5 µl	tRNA (10 mg/ml)
1 µl	PolyA (10 mg/ml)
10%	Dextransulfat
4 µl	50 x TE pH7,0
6 µl	5 M NaCl
2 µl	50 x Denhardt Mix

Die Waschungen nach der Hybridisierung wurden bei 45°C durchgeführt. Der Entwicklungspuffer enthielt 10% w/v PVA (70-100 kDa).

3. ERGEBNISSE

3.1 Das Hefe Two-Hybrid System

3.1.1 Verifizierung der Hefephänotypen

Zur Kontrolle ihrer Auxotrophien wurden die Stämme Y187 und Y190 auf verschiedene Selektivmedien ausplattiert. Beide Stämme sind Urazil-autotroph, benötigen aber Leuzin, Tryptophan und Histidin für normales Wachstum. Durch Transformation mit pACT2 bzw. pAD-GAL4 erhalten sie die Fähigkeit, auf Medium ohne Leuzin zu wachsen. pAS2 und pBD-GAL4Cam verleihen Tryptophan-Autotrophie. Im Gegensatz zu häufig auftretenden *petite*-Mutanten wachsen Y187 und Y190 auch auf Vollmedium, das 3% Glycerin anstelle von 2% Glukose enthält.

Tab. 3.1. Verifizierung der Hefephänotypen

Hefestamm	SD ⁻ Trp	SD ⁻ Leu	SD ⁻ His	SD ⁻ Ura	Glyze- rin	Blaufär- bung ^{**}
Y187	-	-	-	+	+	-
Y190	-	-	-*	+	+	-
Y187 (pCL1)	-	+	+	+	+	+
Y190 (pCL1)	-	+	+*	+	+	+
Y187 (pACT2)	-	+	-	n.d.	n.d.	-
Y190 (pACT2)	-	+	-*	n.d.	n.d.	-
Y187 (pAS2)	+	-	-	n.d.	n.d.	-
Y190 (pAS2)	+	-	-*	n.d.	n.d.	-
Y187 (pAD-GAL4)	-	+	-	n.d.	n.d.	-
Y190 (pAD-GAL4)	-	+	-*	n.d.	n.d.	-
Y187 (pBD-GAL4Cam)	+	-	-	n.d.	n.d.	-
Y190 (pBD-GAL4Cam)	+	-	-*	n.d.	n.d.	-

* bei Zugabe von ≥ 25 mM 3AT.

** Nachweis der Aktivität des *LacZ*-Reportergens durch β -Galaktosidasetests der Hefekolonien.

In Abwesenheit eines interagierenden Paares von Fusionsproteinen sollte keines der unter Kontrolle GAL4-abhängiger Promotoren stehenden Reportergene (*HIS3* und *LacZ* in Y190, *LacZ* in Y187) exprimiert werden. Eine geringe Wachstumsfähigkeit des Stammes Y190

auf Minimalmedium (SD) ohne Histidin wird durch die Basalexpression des *HIS3*-Reportergens verursacht. Diese kann durch Zugabe geringer Mengen (20-50 mM) eines kompetitiven Inhibitors der Histidinbiosynthese (3-Aminotriazol, 3AT) eliminiert werden. Die Aktivität der Reporter gene nach Testtransformationen der Hefen mit verschiedenen Plasmiden wurde überprüft. Die Plasmide pACT2, pAS2, pAD-GAL4 und pBD-GAL4Cam verursachten weder einzeln noch in Kombination eine Expression der Reporter gene. In Hefen dagegen, die mit pCL1, das die *GAL4*-kodierende Sequenz voller Länge enthält, transformiert wurden, konnte die Aktivität der Reporter gene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Kontrollexperimente wurden in Tab. 3.1. zusammengefaßt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Phänotypen der Hefestämme Y187 und Y190 bezüglich ihrer Auxotrophien und ihres Wachstums auf Glycerin den erwarteten Genotypen entsprachen. Die Expression der Reporter gene konnte durch das Wildtyp *GAL4* Protein, nicht aber durch die Expression der *GAL4* DNA-bindenden und/oder *GAL4* Aktivierungsdomäne induziert werden.

3.1.2 Klonierung der *BKn3*-Konstrukte für das Two-Hybrid System

BKn3, das den *Hooded*-Lokus repräsentiert, gehört zur Klasse 1 der *KNOX*-Gene (*KNOX1*). Es weist den typischen Aufbau der Mitglieder dieser Genfamilie auf. Nahe des C-terminalen Endes des Proteins befindet sich die Homöodomäne. Durch einen kurzen basischen Bereich davon getrennt trägt es außerdem die sogenannte ELK-Domäne, der eine mögliche Rolle in Protein-Protein Interaktionen zugeschrieben wird (Vollbrecht *et al.*, 1993). Weitere konservierte Bereiche, die *KNOX*-Domäne und die sogenannte GSE-Box (Bürglin, 1997), befinden sich weiter N-terminal (Abb .3.1.).

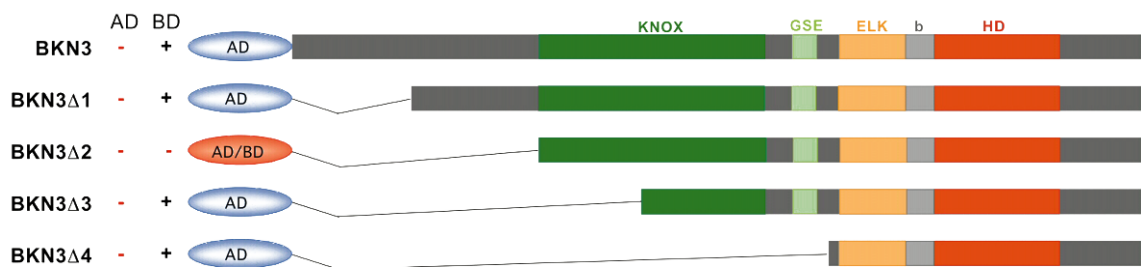
3.1.2.1 BD-BKN3 Δ 2 als "Köder" für das Two-Hybrid System

Zur Durchführung von Two-Hybrid Studien muß gewährleistet sein, daß die Konstrukte nicht in der Lage sind einzeln die Transkription der Reporter gene des verwendeten Hefestammes zu aktivieren. Insbesondere Fusionen an die DNA-bindende Domäne ("Köder" in Two-Hybrid Screens) haben durch interne Transaktivierungsdomänen der untersuchten Proteine häufig diese Fähigkeit.

Auch die Fusion des vollständigen *BKN3*-Proteins an die *GAL4* DNA-bindende Domäne induzierte die Reporter genexpression in Hefe. Im Rahmen der Suche nach geeigneten Konstrukten wurden N-terminalen Deletionsderivaten entsprechende cDNA-Abschnitte

von *BKn3* in die Vektoren des Two-Hybrid Systems kloniert (Abb. 3.1.). Diese Konstrukte wurden zunächst in den Vektoren pAS2/pACT2 hergestellt. Die Fusionen an die Aktivierungsdomäne verursachten alleine keine Aktivierung der Reportergenexpression, die Fusionen an die DNA-bindende Domäne dagegen bewirkten mit einer Ausnahme, pAS-*BKn3Δ2*, nachweisbare β -Galaktosidaseaktivität in den transformierten Hefen (Abb. 3.2.a). Die Deletion dieses Derivates umfaßte die N-terminalen 108 AS von BKN3, wobei KNOX-, GSE-, ELK-, basische und Homöodomäne und der vollständige C-Terminus des Proteins erhalten blieben. Auch in Kombination mit pACT2 ohne Insert aktivierte pAS-*BKn3Δ2* die Reportergenexpression nicht. Damit wurde eine für Two-Hybrid Studien geeignete Fusion eines BKN3-Derivates an die GAL4 DNA-Bindedomäne identifiziert.

Abb. 3.1. N-terminale Deletionsderivate von BKN3



Kästen kennzeichnen die in den Konstrukten enthaltenen Bereiche des Proteins. Domänen wurden farblich gekennzeichnet. Die Ovale repräsentieren die Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors, wobei die für Two-Hybrid Studien geeignete BD-Fusion durch rote Farbgebung gekennzeichnet wurde. Autoaktivierungen der AD- bzw. BD-Fusionen in Hefe wurden durch +/- angegeben.

AD: GAL4 Aktivierungsdomäne, BD: GAL4 DNA-bindende Domäne; b: basische Domäne; ELK: ELK-Domäne; GSE: GSE-Box; HD: Homöodomäne; KNOX: KNOX-Domäne; (zur Herstellung der Konstrukte, siehe 7.1.).

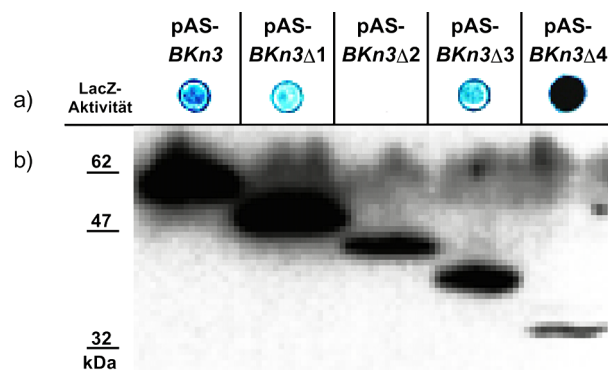
Zur Vereinfachung beziehen sich die meisten Angaben auf Fusionsproteine und nicht auf die transformierten Konstrukte. BD-XYZ bezeichnet Fusionen an die GAL4 DNA-bindende Domäne (kodiert durch Konstrukte in den Vektoren pAS2 oder pBD-GAL4Cam), AD-XYZ benennt Fusionen an die GAL4 Aktivierungsdomäne (kodiert durch Konstrukte in den Vektoren pACT2 oder pAD-GAL4).

3.1.2.2 Nachweis des Köder-Fusionsproteins in transgenen Hefen

Um sicherzustellen, daß das Fehlen der Reporterexpression in pAS-*BKn3Δ2*-transgenen Hefestämmen nicht auf eine verminderte/fehlende Expression des Fusionsproteins zurückzuführen war, wurde ein "Western"-Blot mit Proteinextrakten der mit pAS-*BKn3*, pAS-*BKn3Δ1*, pAS-*BKn3Δ2*, pAS-*BKn3Δ3* und pAS-*BKn3Δ4* transformierten Hefen durchgeführt. Die Fusionsproteine wurden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen die GAL4 DNA-bindende Domäne immunologisch nachgewiesen (Abb. 3.2.b).

Western-Analysen zeigten, daß das durch pAS-*BKn3Δ2* kodierte Fusionsprotein BD-BKN3Δ2 in vergleichbaren Mengen wie BD-BKN3, BD-BKN3Δ1, BD-BKN3Δ3 und BD-BKN3Δ4 in Hefe exprimiert wurde.

Abb. 3.2. β-Galaktosidasetest und immunologischer Nachweis verschiedener BKN3-Deletionsderivate als Fusionen and die GAL4 DNA-bindende Domäne in Hefe



- a) LacZ-Tests transgener Hefestämme mit den Plasmiden pAS-*BKn3*, pAS-*BKn3Δ1*, pAS-*BKn3Δ2*, pAS-*BKn3Δ3* und pAS-*BKn3Δ4*. Nur pAS-*BKn3Δ2* verursachte alleine keine nachweisbare β-Galaktosidaseaktivität.
- b) Fusionsproteine wurden mittels Western-Analyse in den transgenen Hefestämmen nachgewiesen. Die hybridisierenden Banden entsprachen den erwarteten Größen der Fusionsproteine: BKN3 (364 AS), BKN3Δ1 (311 AS), BKN3Δ2 (257 AS), BKN3Δ3 (200 AS), BKN3Δ4 (137 AS) zuzüglich der jeweils 147 AS der GAL4 DNA-Bindedomäne. Die Banden eines Proteingrößenmarkers wurden in kDa angegeben.

Wegen der Vorzüge des pAD-GAL4/pBD-GAL4Cam-Vektorsystems gegenüber den pACT2/pAS2 Vektoren (siehe 2.2.5.) wurde *BKn3Δ2* auch in pBD-GAL4Cam kloniert (siehe 7.1.). Dieses Konstrukt bewirkte ebenfalls keine Aktivierung der Reporterexpression und konnte durch Western-Blot in transgenen Hefen nachgewiesen werden.

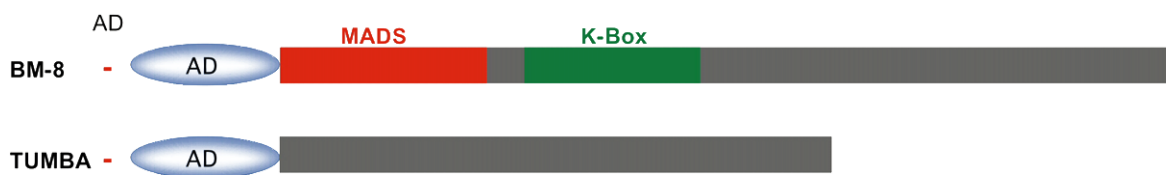
3.1.3 Interaktionsstudien mit bekannten Gerstenproteinen

Zunächst wurden die Produkte bereits bekannter Homöobox- und MADS-Box-Gene der Gerste mittels des Two-Hybrid Systems auf Interaktionen getestet.

3.1.3.1 Interaktionsstudien mit BM8 und TUMBA

BM8 ist ein MADS-Box-Gen, das in der Deckspelze der Gerste exprimiert wird (Schmitz *et al.*, in Vorbereitung). Bei *tumba* handelt es sich um ein Gen mit Homologie zu Translationally Controlled Tumor Proteins (TCTPs), das durch differentielles Screening als potentiell Zielgen von *BKn3* isoliert wurde. In *in situ* Hybridisierungsexperimenten konnte für *tumba* ein ähnliches Expressionsmuster wie für *BKn3* gezeigt werden (Müller, 1997).

Abb. 3.3. BM-8 und TUMBA im Two-Hybrid System



Kästen kennzeichnen die in den Konstrukten enthaltenen Bereiche der Proteine. Domänen wurden farblich gekennzeichnet. Die Ovale repräsentieren die GAL4 Aktivierungsdomäne. AD: GAL4 Aktivierungsdomäne; MADS: MADS-Box; (Herstellung der Konstrukte, siehe 7.1.).

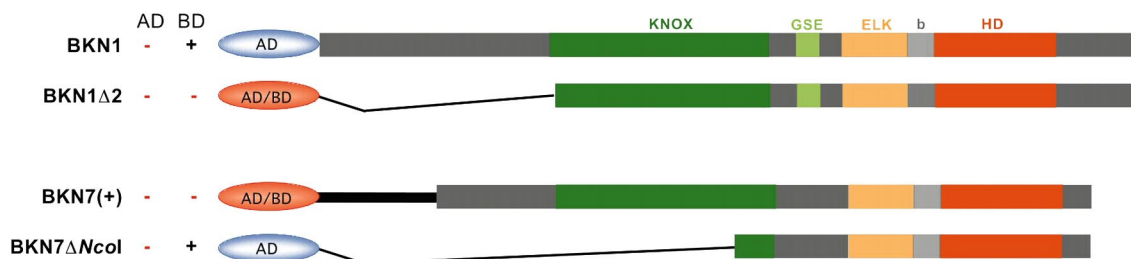
Die kodierenden Sequenzen von *BM8* und *tumba* wurden an die transaktivierende Domäne von GAL4 fusioniert und im Two-Hybrid System auf Interaktionen getestet (Abb. 3.3.). Weder die Koexpression von pACT-*BM8* noch von pACT-*tumba* mit pAS-*BKn3Δ2*, pAS-*BKn1Δ2* oder pAS-*BKn7(+)* (siehe 3.3.2.) in Hefe führte zu nachweisbarer Reporterexpression.

3.1.3.2 Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7

Die cDNA-Klone der Gene *BKn3* und *BKn1* lagen bereits zu Beginn dieser Arbeit vollständig sequenziert vor (Müller, 1997). Sie werden der Klasse 1 der KNOX-Gene zugeordnet und weisen den typischen Aufbau der Mitglieder dieser Genfamilie auf (siehe 3.1.2.). Die Sequenz des *BKn7* repräsentierenden cDNA-Klons GA3-55 wurde im Rahmen dieser Arbeit vervollständigt (siehe 7.2.1.). *BKn7* gehört zur Klasse 2 der KNOX-Gene, deren Aufbau dem der KNOX1-Gene ähnelt, denen jedoch eine GSE-Box fehlt.

Wie BKN3 verursacht auch BKN1 als Fusion an die GAL4 DNA-bindende Domäne eine Aktivierung der Reportergenexpression in Hefe. Daher wurde durch N-terminale Deletion das Derivat BKN1 Δ 2 erzeugt, das als Fusion an die DNA-Bindedomäne alleine eine minimale β -Galaktosidaseaktivität induziert. Für die Interaktionsstudien wurde außerdem die Fusion von BKN1 voller Länge an die GAL4 Aktivierungsdomäne eingesetzt.

Abb. 3.4. BKN1 und BKN7 im Two-Hybrid System



Kästen markieren die in den Konstrukten enthaltenen Bereiche der Proteine. Domänen wurden farblich gekennzeichnet. Die Ovale repräsentieren die Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors, wobei die für Two-Hybrid Studien geeigneten BD-Fusionen durch rote Farbgebung hervorgehoben wurden. Autoaktivierungen der AD/BD-Fusionen in Hefe wurden durch +/- angegeben.

















AD: GAL4 Aktivierungsdomäne; BD: GAL4 DNA-bindende Domäne; b: basische Domäne; ELK: ELK-Domäne; GSE: GSE-Box; HD: Homöodomäne; KNOX: KNOX-Domäne; (zur Herstellung der Konstrukte, siehe 7.1.).

Die hier als *BKn7(+)* bezeichnete Sequenz kodiert für ein N-terminal verlängertes Derivat des Proteins. Der Translationsstartpunkt von *BKn7* liegt vermutlich etwa 150 bp 3' des bei der Herstellung der Two-Hybrid Konstrukte angenommenen (Kai J. Müller, pers. Mitteilung). Die Fusion von BKN7(+) an die GAL4 DNA-bindende Domäne aktivierte im Gegensatz zu BD-BKN7 Δ Ncol alleine keine Expression der Reportergene in Hefe. *BKn7(+)* wurde sowohl in pAS2 als auch in pACT2 kloniert und in Two-Hybrid Studien eingesetzt (Abb. 3.4.).

Zum Nachweis möglicher Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7 wurden DNA-Bindedomänen- und Aktivierungsdomänenfusionen der drei Proteine paarweise in dem Hefestamm Y190 gegeneinander getestet: pAS-*BKn3Δ2* aktivierte in Kombination mit pACT-*BKn3*, pACT-*BKn1Δ2* und pACT-*BKn7(+)* die Expression des *LacZ*-Reportergens. In transgenen Hefen, die entweder pAS-*BKn1Δ2* oder pAS-*BKn7(+)* zusammen mit einem der pACT-Konstrukte von *BKn1*, *BKn3* oder *BKn7(+)* enthielten, konnte ebenfalls β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.5.). Parallele Experimente in dem Hefestamm Y187 führten zu identischen Ergebnissen.

Die Interaktionsstudien zeigten, daß BKN1, BKN3 und BKN7 im Two-Hybrid System homodimerisieren. Außerdem können die drei Proteine in allen Kombinationen Heterodimere ausbilden.

Abb. 3.5. Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7

		A D - F u s i o n e n			
		AD	BKN3	BKN1	BKN7(+)
B D - F u s i o n e n	BD				
	BKN3 Δ 2				
	BKN1 Δ 2				
	BKN7(+)				

LacZ-Tests zum Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität transgener Hefen des Stammes Y190. Verschiedene Kombinationen von AD- und BD-Fusionen wurden getestet. Die für die Interaktionsstudien eingesetzten Klone zeigten bei Einzeltransformation keine (bzw. im Falle von BKN1 Δ 2 nur eine geringfügige) Aktivierung der Reporterexpression.

3.1.4 Two-Hybrid "Screen" zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von BKN3

3.1.4.1 Konstruktion einer HybriZAP cDNA-Bank

Das HybriZAP™ System von Stratagene wurde zur Herstellung einer Phagemid cDNA-Bank verwendet. Die cDNA wurde aus PolyA(+)-RNA junger *Hooded*-Infloreszenzen unter Verwendung von Zufallsprimern hergestellt (siehe 2.2.4.). Über 5' *EcoRI*- und 3' *XhoI*-Schnittstellen wurde die doppelsträngige cDNA gerichtet in die HybriZAP-Vektorarme ligiert. Die primäre Lambda-Bank wurde anschließend amplifiziert und dann durch *in vivo* Massenexzision in zirkuläre Phagemide (pAD-GAL4) konvertiert.

Die Lambda-Primärbank hatte eine Komplexität von etwa 2×10^6 pfu. Um diese Anzahl an Primärklonen zu erreichen, mußten fünf unabhängige Ligationen und Verpackungen durchgeführt werden. Nach der Amplifikation wurde ein Titer von $4,5 \times 10^8$ pfu erreicht. PCR-Analysen einzelner Plaques zeigten, daß mehr als 90% der Phagen rekombinant waren. Die Insertgrößen bewegten sich zwischen 300 bp und etwa 2 kb, wobei der Durchschnitt im Bereich von 400-800 bp lag.

3.1.4.2 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von BKN3 durch Two-Hybrid "Screening"

Das *BKn3* Derivat pBD-*BKn3Δ2* konnte in mehreren Tests als geeigneter Köder für Two-Hybrid Studien in dem Hefestamm Y190 verifiziert werden, da es in Hefe exprimiert wird und die Reporterexpression alleine nicht induziert (siehe 3.1.2.2.). Außerdem zeigten die Interaktionsstudien mit BKN1, BKN3 und BKN7, daß BD-BKN3Δ2 die für Interaktionen mit KNOX-Genen nötigen Abschnitte enthält (siehe 3.1.3.2.).

Wie unter 3.1.1. beschrieben, weist der Hefestamm Y190 eine geringe Basalexpression des *HIS3*-Reportergens auf, die durch Zugabe von 3AT eliminiert werden kann. Dabei sollte die Konzentration des Inhibitors so niedrig wie möglich gehalten werden, da sonst das Wachstum von Hefeklonen mit schwach interagierenden Proteinpaaren zu sehr verlangsamt wird. Andererseits besteht bei einer zu niedrigen Dosierung die Gefahr starken Hintergrundwachstums. Die geeignete 3AT-Konzentration muß für jede Kombination aus Köder-Konstrukt und Hefestamm neu ausgetestet werden, da DNA-Bindedomänenfusionen die Expression des *HIS3*-Reportergens geringfügig beeinflussen können, selbst wenn sie keine nachweisbare β -Galaktosidaseexpression verursachen. Für pBD-*BKn3Δ2* in Kombination mit Y190 wurde eine 3AT-Konzentration von 25-35 mM als geeignet ermittelt.

Köder-Plasmid und cDNA-Bank wurden sequenziell in die Hefen eingebracht, d.h. für die Bank-Transformation großen Maßstabs wurden Y190 Zellen verwendet, die bereits mit pBD-*BKn3Δ2* transformiert waren. In vier unabhängigen Transformationsexperimenten wurden insgesamt etwa 10^6 transgene Hefeklone untersucht, wobei die transformierten Hefen zur Hälfte auf Selektivmedium ohne Tryptophan, Leuzin und Histidin mit 25 bzw. 35 mM 3AT ausplattiert wurden. Potentiell positive Kolonien, die sich in Koloniegröße und/oder -morphologie vom Hintergrundwachstum unterschieden, konnten in der Regel nach vier bis vierzehn Tagen Inkubation bei 30°C identifiziert werden. Sie wurden auf Selektivmedium vereinzelt und β -Galaktosidasetests unterzogen.

3.1.4.3 Verifizierung potentiell positiver Klone

Ein Großteil der etwa fünfhundert gepickten Kolonien zeigte im *LacZ*-Test keine Blaufärbung und wurde in den weiterführenden Analysen nicht berücksichtigt. Es kommt vor, daß Hefekolonien nach der cDNA-Bank-Transformation verschiedene Bank-Plasmide enthalten. Aus diesem Grund wurden nur solche potentiell positiven Kolonien weiter untersucht, deren β -Galaktosidaseaktivität und Histidinautotrophie auch nach mehrfacher Vereinzellung reproduzierbar waren. Hier ist anzumerken, daß das Verhalten der Hefekolonien von Transformation zu Transformation, insbesondere bezüglich ihrer β -Galaktosidaseaktivitäten, variierte. Aus dem ersten Transformationsansatz gingen vierundzwanzig im Vergleich zum Hintergrund deutlich schneller wachsende Kolonien hervor, von denen lediglich die größte β -Galaktosidaseaktivität aufwies. In weiteren Transformationen vergleichbarer Effizienz gab es kaum Unterschiede in den Koloniegrößen, dafür färbte sich ein beträchtlicher Anteil des vermutlichen Hintergrundes blau. In Tab. 3.2. wurden die Klone berücksichtigt, die sich sowohl durch verstärktes Wachstum unter selektiven Bedingungen als auch durch reproduzierbare β -Galaktosidaseaktivität auszeichneten.

Als "falsch Positive" werden solche Hefen bezeichnet, die in Two-Hybrid Screens aufgrund der Expression eines oder beider Reportergene identifiziert werden, die aber kein interagierendes Fusionsproteinpaar tragen. Um solche Ereignisse auszuschließen, wurden Retransformationskontrollen durchgeführt. Plasmid-DNA aus den zu testenden Hefen wurde isoliert und durch Elektroporation in *E.coli* überführt. Die Transformationsansätze wurden zur Hälfte auf LB-Medium mit Chloramphenicol (Selektion auf das Köder-Plasmid) und mit Ampicillin (Selektion auf das pAD-cDNA-Plasmid) plattiert. Plasmid-DNA wurde isoliert und Restriktionsanalysen unterzogen. Die Untersuchung der Chloramphenicol-resistenten Kolonien diente als Kontrolle, ob das Köder-Plasmid in unveränderter Form in den Hefen vorlag. Die Plasmide der jeweils vier bis fünf analysierten Ampicillin-resistenten Kolonien aus jeder Bakterientransformation setzten nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* DNA-Fragmente gleicher Größe frei. Diese Plasmide wurden für Retransformationen verwendet. Sie wurden alleine, in Kombination mit dem "leeren" pBD-GAL4Cam Plasmid und in Kombination mit dem Köder-Plasmid pBD-*BKn3Δ2* in Y190 und Y187 eingebracht. Die transgenen Hefen wurden erneut auf ihre β -Galaktosidaseaktivität getestet (siehe Tab. 3.2.).

Die Klone 1, 14, 23 und 31 verliehen den Hefen in Kombination mit dem Köder-Plasmid pBD-*BKn3Δ2* sowohl Histidin-Autotrophie als auch β -Galaktosidaseaktivität. Diese Eigenschaften konnten durch Retransformation der isolierten Plasmide reproduziert werden. Dabei trat eine Aktivierung der Reportergenexpression nur in Anwesenheit des

Köder-Fusionsproteins auf. Sequenzanalyse ergab, daß es sich bei den isolierten Plasmiden 1, 14 und 31 um identische Klone handelte.

Tab. 3.2. Zusammenfassung der im Two-Hybrid Screen mit pBD-*BKn3Δ2* als Köder isolierten Klone

Klon	Wachstum auf SD-His	LacZ-Test	LacZ-Test nach Retransformation in Kombination mit			Insertlänge/ offener Leserahmen/ Homologien*
			-	pBD	pBD <i>BKn3Δ2</i>	
1**	+	+++	-	-	+++	656 bp/217 AS BEL1-Hom
2	+	+	-	-	+/-	721 bp/7 AS keine Homologien
14**	+	+	-	-	+	656 bp/217 AS BEL1-Hom
15	+	+	-	-	+/-	740 bp/9 AS
18	+	+	+	+	+	225 bp/68 AS (Z97339) hypothetical protein <i>Arabidopsis thaliana</i>
20***	+	+	+	+	+	845 bp/159 AS (AC005956) hypothetical protein <i>Arabidopsis thaliana</i>
23	+++	+++	-	-	+++	936 bp/312 AS BEL1-Hom
30	+	+	-	-	+/-	335 bp/24 AS keine Homologien
31**	+	+	-	+	+	656 bp/217 AS BEL1-Hom
43	+	+	-	-	+/-	1000 bp/21 AS (S12206)hypothetical protein 2 <i>Mus musculus</i>
61	+	+	-	-	-	n.d.
62	+	+	-	-	-	n.d.
65	+	+	-	-	-	n.d.
66***	+	+	+	+	+	840 bp/275As (AC005956) hypothetical protein <i>Arabidopsis thaliana</i>
67	+	+	-	-	+	n.d.
85	+	+	-	-	+/-	535 bp/2 AS

* Angegeben ist jeweils die Länge des offenen Leserahmens, der das Leseraster der GAL4 Aktivierungsdomäne fortsetzt.

** Klone 1, 14 und 31 sind identisch.

*** Klone 20 und 66 sind identisch. Da sie die Reportergenexpression in Abwesenheit des Köder-Fusionsproteins aktivieren, wurden sie nicht weiter untersucht.

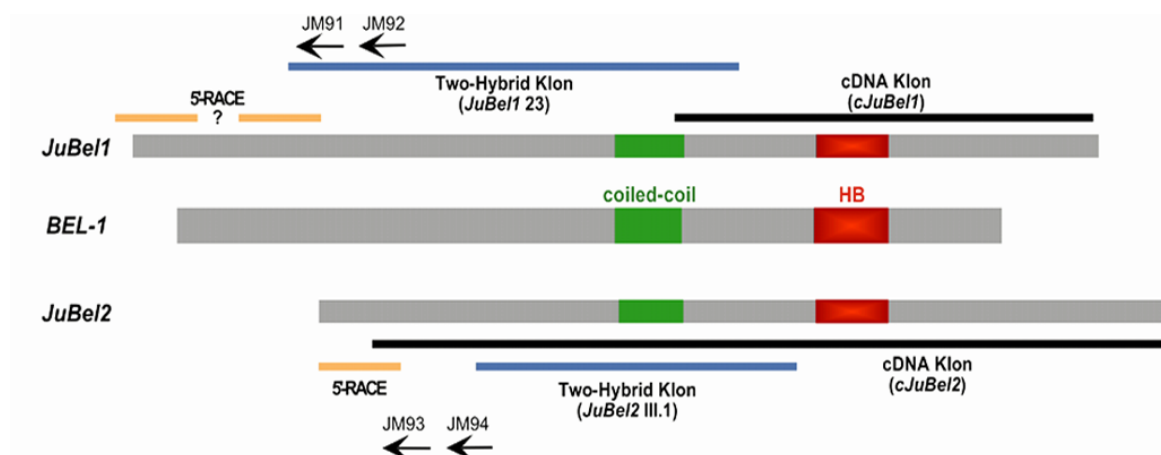
Vermutlich "echt positive" Hefeklone wurden durch graue Unterlegung hervorgehoben. Durch +++ wird eine besonders schnelle und intensive Blaufärbung im LacZ-Test angedeutet; +/- steht für schwache und variable β -Galaktosidaseaktivitäten.

3.2 Charakterisierung der cDNA-Sequenzen von *JuBel1* und *JuBel2*

Laut Datenbank-Suchergebnissen (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) weisen beide im Two-Hybrid Screen identifizierte cDNA-Fragmente Homologien zu Mitgliedern einer in Gerste bisher unbekanntenen Gruppe von Homöoboxgenen auf und scheinen zwei neue Mitglieder dieser Familie zu repräsentieren. *BELL1* (*BEL-1*) ist der am besten charakterisierte Vertreter dieser in *Arabidopsis thaliana* beschriebenen Genfamilie. Im Folgenden wird das dem Two-Hybrid Klon 23 entsprechende Genfragment mit *JuBel1* (***Judith Bel1 Homolog1***), und das durch die identischen Klone 1, 14 und 31 repräsentierte Gen mit *JuBel2* (***Judith Bel1 Homolog2***) bezeichnet.

Die Gene der HD-BEL-Familie sind eng mit der Klasse 1 der KNOX-Gene verwandt. Die Homologien beschränken sich allerdings auf die Homöodomänen der Genprodukte. Die BEL1-ähnlichen Proteine besitzen keine ELK-Domäne. In ihrer N-terminalen Hälfte befindet sich ein Bereich, der neben einem Kernlokalisierungssignal möglicherweise eine coiled-coil Domäne enthält (Reiser *et al.*, 1995). Abb. 3.6. zeigt eine schematische Darstellung der *JuBel1* und *JuBel2* repräsentierenden Klone im Vergleich zu *BEL-1* aus *Arabidopsis*.

Abb. 3.6. Schematische Darstellung der durch Two-Hybrid bzw. cDNA-Screening und 5'-RACE isolierten cDNA-Abschnitte von *JuBel1* und *JuBel2* im Vergleich zu *BEL-1*



Kästen zeigen die vermutlich translatierten Bereiche der Transkripte von *JuBel1*, *JuBel2* und *BEL1*, wobei die Homöobox rot und der für die vermutliche coiled-coil Domäne kodierende Abschnitt grün unterlegt ist. Blaue Balken bezeichnen die im Two-Hybrid System isolierten Bereiche der cDNAs. Durch die schwarzen Balken wird jeweils der längste λ cDNA-Klon repräsentiert. Die orangenen Balken entsprechen den durch 5'-RACE identifizierten Fragmenten. Die Pfeile geben die Positionen der für die 5'-RACE verwendeten Primer an. HB: Homöobox.

3.2.1 Sequenzanalyse der *JuBel1*-cDNA

3.2.1.1 Screening einer Gersten cDNA-Bank

Da der im Two-Hybrid System isolierte Klon nur Teile der kodierenden Sequenz von *JuBel1* umfaßte, sollte das vollständige Transkript durch Screening einer cDNA-Bank isoliert werden. Insgesamt wurden etwa 4 Millionen pfu einer aus Infloreszenzen der Gerstenvarietät *K-Atlas* hergestellten cDNA-Bank ausplattiert und in drei Hybridisierungsrunden nach *JuBel1*-homologen Klonen durchsucht. Als Sonde diente das im Two-Hybrid System isolierte cDNA-Fragment. Insgesamt wurden neun hybridisierende Lambda-Klone isoliert, die Inserts von etwa 1,4 kb Länge enthielten. Eines der cDNA-Inserts wurde über seine flankierenden *EcoRI*-Schnittstellen in pUC umklont und sequenziert. Dieser cDNA-Klon, in der Folge als pUC-*cJuBel1* bezeichnet, vervollständigte das 3'-Ende der kodierenden Region von *JuBel1* einschließlich der Homöobox, des Translationsendpunktes und des PolyA-Schwanzes. Zusätzliche 5'-Sequenzen von *JuBel1* wurden mit diesem Klon nicht identifiziert, da er mit dem Two-Hybrid Klon um nur 164 bp überlappt. Die Übereinstimmung beider Sequenzen in diesem Bereich beträgt 100%.

3.2.1.2 5'-RACE

Zur Isolierung des vollständigen 5'-Endes von *JuBel1* wurde 5'-RACE durchgeführt. Zunächst wurde der Marathon™ cDNA Amplification Kit von Clontech in Kombination mit den genspezifischen Primern JM92 und JM91 (nested) verwendet (Abb. 3.6.). Die cDNA wurde nach den Angaben des Herstellers aus PolyA(+)-RNA hergestellt, die aus jungen Infloreszenzen der Gerstenvarietät Bonus gewonnen worden war. Eine durch die primäre PCR mit den Primern AP1 und JM92 erhaltene Bande von etwa 400 bp reduzierte sich durch Amplifikation mit dem "nested" Primerpaar AP2 und JM91 auf eine Größe von 200 bp. Dieses Fragment wurde nach Phosphorylierung in pBluescript kloniert und sequenziert. Es lieferte im Vergleich zum Two-Hybrid Klon lediglich 21 bp, entsprechend 7 AS, an zusätzlicher cDNA-Sequenzinformation.

Weitere 5'-RACE Experimente zur Charakterisierung des 5'-Endes von *JuBel1* wurden unter Verwendung des SMART™ RACE cDNA Amplification Kits von Clontech unternommen. PCR-Amplifikation der nach den Vorgaben des Herstellers synthetisierten cDNA (verwendet wurde PolyA(+)-RNA aus Deckspelzen der Gerstenvarietät Bonus, von Carlo Pozzi zur Verfügung gestellt) mit dem genspezifischen Primer JM92 und dem

Universal Primer des Kits (UP) lieferten mehrere Banden, die sich bei einer zweiten Amplifikation mit JM91 und dem Nested Adaptor Primer (NUP) um die erwarteten 180 bp verkürzten. Sieben PCR-Produkte, deren Längen etwa 180 bp, 280 bp, zwei Banden von etwa 500 bp, 930 bp und 1320 bp betragen, wurden mittels des TA Cloning® Kits von Invitrogen in den Vektor pCR®2.1 kloniert (siehe 7.1.). Sequenzanalyse zeigte, daß sechs verschiedene 5'-RACE Produkte isoliert worden waren (Abb. 3.7.).

Alle sechs Banden zeigten im Bereich des Überlapps 100% Übereinstimmung mit dem im Two-Hybrid System isolierten cDNA-Fragment. Die Klone 21 und 1 begannen kurz 3' bzw. kurz 5' der bereits bekannten Sequenz und enthielten kein weiteres ATG-Startkodon. Klon 10 enthielt zusätzliche 306 bp, die mit der genomischen Sequenz von *JuBel1* übereinstimmten (siehe 3.3.3.). Darauf lagen vier potentielle Startkodons im Leseraster der bekannten Sequenz (ATG 3, 4, 5 und 6). Zwei weitere ATG-Kodons (ATG 1 und 2) wurden durch die Klone 5 und 23 erhalten. Ein Vergleich mit der genomischen Sequenz zeigte, daß die Klone 5, 7 und 23 ein Intron von 278 bp enthielten, das von den Basen GT...AG eingeschlossen wurde, was dem Konsensus intronflankierender Sequenzen entspricht (Brown, 1996). Unmittelbar 5' des vermutlichen Introns befand sich ein Stop-Kodon im Leseraster des angenommenen Translationsproduktes. Klon 17 wies im Vergleich zur genomischen Sequenz eine weitere Deletion von 658 bp auf, deren flankierende Basen nicht mit dem Konsensus typischer Introns übereinstimmten. Diese Deletion führte im Vergleich zu den Klonen 5 und 23 zu einer Veränderung im Leseraster der weiter 5' gelegenen Sequenzen. Die Klone 13 und 23 enthielten außerdem Bereiche, die in den verbleibenden 2500 bp sequenzierter genomischer *JuBel1*-Sequenz keine Entsprechung hatten. Die Frage, ob es sich bei der Deletion in Klon 17 und den unbekanntenen Sequenzen in Klon 13 und 23 um Syntheseartefakte oder um tatsächliche mRNA-Sequenzen handelte, konnte hier nicht geklärt werden (siehe 4.2.1.).

Abb. 3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der 5'-RACE Amplifikationen von *JuBel1*

a) Schematische Darstellung der 5'-RACE Fragmente von *JuBel1* unter Berücksichtigung möglicher Intronsequenzen. Gelbe Kästen zeigen die Bereiche mit Homologien zur genomischen *JuBel1*-Sequenz, schwarze Balken markieren Abschnitte, für die im genomischen *JuBel1*-Klon keine Entsprechung gefunden wurde. Mögliche ATG-Startkodons wurden durch rote Balken, ein Stopkodon durch einen braunen Balken gekennzeichnet. Die grüne Linie repräsentiert das vermutete Intron in den Fragmenten 5, 17 und 23, gestrichelte Linien stellen ebenfalls mögliche Introns dar, die allerdings nicht durch die typischen GT...AG-Sequenzen eingeschlossen werden.

b) Sequenzvergleich der 5'-RACE Produkte mit der genomischen *JuBel1*-Sequenz. Der bereits im Two-Hybrid Klon enthaltene Abschnitt wurde durch gelbe Unterlegung, die Bereiche, für die im genomischen Klon keine Entsprechung gefunden wurden, durch graue Unterlegung gekennzeichnet. Unter den DNA-Sequenzen sind die Sequenzen des vermuteten Translationsproduktes und kurzer ORFs im angenommenen nicht-translatierten Leader angegeben, wobei die Klone 5 bzw. 23 als Matrize verwendet wurden. Die möglichen ATG-Startkodons 1-7 wurden rot, die Startkodons der kurzen ORFs orange und Stopkodons braun markiert.

gJ1: genomische Sequenz von *JuBel1*; 1, 5, 10, 13, 17, 21, 23: 5'-RACE Produkte.

Geht man von Klon 5 als Repräsentant des 5'-Endes der kodierenden Sequenz von *JuBel1* aus, so ergibt sich insgesamt ein Transkript von 2960 bp Länge. Der längste offene Leserahmen kodiert für ein Protein von 760 AS (Abb. 3.8.). Vergleiche der Basenfolge im Bereich der ATG-Kodons im 5'-Bereich der cDNA-Fragmente ergaben in keinem Fall überzeugende Übereinstimmungen mit der für monokotyle Pflanzen ermittelten Konsensus-Sequenz für die Translationsinitiation (Joshi *et al.*, 1997).

Abb. 3.8. *JuBel1*-cDNA

```

GAGACAGAGATGGTGGCGAGGAGGTCCTCCCGAGGCAAGCCTTCTCACTCCCTCCACGAGATAACGATGTGCTCCTCCTCCTCATCTTCTTCTTAGGTTTGTCTGCTGCGCG
CGGCTCGCGGAGAAAGGGGATTTTTTTCTTTTTCGCGCCGACGACGACGACGATGATGACAGTGGCGCCGCGCATGATGGGGATAGCGGCGCCACCGTGTGAGGCGACCGGCGACGACGCTG
M G I A A P P C Q A T R Q H V
AGCACGCCCAAGAGCAGTGGCGGATCCAGGACGACGCGCCGCGCCGCGCCAGGCGAGTTCTATGTCCCACTCCAGGGATTCCACCAGGGCAGCAGCGCGCTCTATGGCTTCTCCTCGGAT
S T P K S S A A I Q D D G R P A T A S S M S H S Q G F H Q G S S G V Y G F S S D
GGCTTCGACCGCCGGGATCCAGCCAGGACGACGATCAAGAGCAGCACCAGTGGCGGAGCAGAGCCGACGAGACAAGCTGAGGGTCCAGGGCTTCGACCCCGCCGCGCGCGGCTG
G F D R P G S S Q D Q Q H Q E H D H V A Q Q S R R D K L R V Q G F D P A A A G L
CTCCTATCGATGGCGACGACGCTCGAGCCGCGCCATGTACGACCAGCCGCGCGCCGCGCCCTCCAACATGCTCGCCGAGATGTTCAACTTCTCCGCCAGACCGCGTGGGG
L P I D G D Q H V E A G A M Y D H A A A A G A S N M L A E M F N F S A Q T P S G
CCGTCGCGCCAGCTGCTGGCCAGCAGATGAACGCCAATACCGCTTCGGGTTCCGGCAGCAGCGCCGGGAGCGGTAGCCGGCTTCGCCGCGACGCGGTTGGTTCCGGGAGCGCC
P S A T E L L A S Q M N A N Y R F G F R Q Q A P G A V A G L P G D G G W F G S A
GGGCGCGCGCTGGCTGGTCTCGCGGGGCAACTATTAGGTGAGAGCTCCTCGCCAAGCAGCAAGCGGATGGCGGGCTCGCCACGACCGCGCGCGGATGACGCTG
G P G R A G V V L G G A N L L L G E T S S P K Q Q G G M A G L A T D P A A A M Q L
TTCTTGATGAACCTCAGCAGCAGCAGTCAAGTCTCGCCGACATCCCTCCGCGTGTGACGCGCAGTCCGGCCATCCAGCACACGAGGGCTTCAGGCGTACGGCAACGCGGG
F L M N P Q Q Q Q S R S S P T S P P P S D A Q S A I Q H H E A F Q A Y G N A A
AGCTCGTTCGCGCGCGCGCGCGCGCTGGTGAAGGCCAGGGCTCTCCCTCCTCCTGTCCGCGTCCGCTACAGCAGCTTGAGATGGCGAAGCAGGCGGAGGACTAAGGTTGAGAGAC
S S F G G G A G V V E G Q G L S L S L S P S L Q Q L E M A K Q A E E L R V R D
GGCGTGTCTACTTCAACCGCAGCAGCAGCAGCGCGCGCTCGGTGCAACAGCTCCCGATGGCATTGCAACGCGCAGGTGGGCTCGAGCGCAGCTCCACGTCGGGTACGGG
G V L Y F N R Q Q Q Q Q A A S V Q Q L P M A L H G Q V G S M G Q Q L H V G Y G
CCCCGGGGTTCGCGCGTCTCGCAACTCCAAGTACACGCGCGCGCCAGGAGCTCTCGACGAATTCTGACGCTGGGCGCGGCGAGCAGTCAAGGGAGGCGGGCGCGCGCG
P A G V A G V L R N S K Y T R A A Q S L R L D E F C S V G R G Q T I K G G R G G
TCCTCGTGAACCTAACCGCAGCAAGGCGCGCCCTCCAGCTCCGCGCGCCAGTCCGCTCATCGCGTCCAAGGAGCCCCGCGAGCTTCCCCCGCGACCGGTTTCGAGCAGCAG
S S S N P N A S K G G P S S S G A A Q S P S S A S K E P P Q L S P A D R F E Q Q
CGCAAGGCCAAGCTCATCTCCATGCTCGCAGAGGTGGATCGGAGGTAACAACCTACTCGCAGCAGATGCAGATGGTGGTGAACCTTCTCGACTCGGTGATGGGTTCCGGGCGCGG
R K K A K L I S M L D E V D R R Y N H Y C D G Q M Q M V V N F F D S V M G F G A A
ACGCCCTACCGCGCTGGCGCAGAAGGCCATGTGCGGCACTTCCGGTGCCTCAAGGACGCCATCGCCGCGCAGTCCGCGCACCTGCGAGCTGCTGGGGAGAAGGACGCGCGCAC
T P Y T A L A Q K A M S R H F R C L K D A I A A Q L R H T C E L L G E K D A G T
AGCTCCGGGTGACCAAGGGGAGACCGCGCGGCTCCGCGCCATCGACGAGCCTCCGCGCAGCAGCGCGCTTCCACCACATGGGCATGATGAGCAGGAGCGTGGCGGCCACCGC
S S G L T A G V L R N S R L R A T I D A Q S L R L Q D R A F H H M G M M E Q E A G W R P Q R
GGCCTCCCGAGCGCTCCGTCAGCATCTCCGCTCTGGCTCTTCGAGCACTTCCTACACCCGTACCCGACGACCGGATAAGCACCTGTTGGCAGGCGACGCGGGCTGTCCAGGAAC
G L P E R S V S I L R S W L F E H F L H P Y P S D A D K H L L A R Q T G L S R N
CAGTCTCGAATTGGTTCAACGCGCCGCTCCGGTGTGGAAGCCATGATCGAGGAGATGTACAGCAGGAGACCAAGGAGCTCGAGGGCTCCTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
Q V S N W F I N A R V L W K P M I E E M Y Q E T K E L E G S S A G G G G G G
GGCGCGGGGGCGGGGGCGGGCCGAGTCCGGCAACGACCCCTCTGCGCCGACGACTTGCACCTCCCGCAGCACCAGGCTCGCAGCAGCAGTTAGTAATAACACCGCGCGCGG
G G G G G G G G P E S G N D P S G A D D L H S P T T T G S Q Q Q L V I H H G G G
AGGTACGGCCAAAGAACACGGGATGTCCGGCTCCACCCCATAAAGTCCGACCCCGCGCGGGCCATCCGTGGCGGACCGCGCTTCGTGGTCTTGACCCGGCGGAGCTCTTGGC
R Y G Q Q E H G M S G V H P H K L D P G A G P S V A D A A F V G L D P A E L L G
GGCAGCGCGCAGTGGTCCCGCAGCAGCTGTACGGGAGGTTTCGAGCCGGGGTGGAGTGGAGTACGGGCGCCCGCAGCAGCGCGGCTTCGGCGCAGTGTCCCTTACGCTGGG
G D A H V G A A D D L Y G R F E P G V R M R Y G P A T T G A V S G D V S L T L G
CTGCAGCAGCGCGCGCGGCAACAGGGGGCGGACGGCAGCGCGGGTTCCTTGTAGAGACTACAATGGTTGTTGATGGCTCACTACACATATCTTGATTATTCATTCATGGCTCA
L Q H A G A G N Q G P D G S G R F S L R D Y N G C *
GGCATGCATTGCATTATTGGAGCAGCTGAGGAGATTTCGAAGAGAGAAGAAAGCAGTAGCACCAGAGAAGACAGAGAGATAAAATGCATGGTCCCTCGGAGGTGGTGCAG
GGGATGGGAATATATATAATATACAGAGCAAATCATCATCTTCTTTCTTCTCCTCAGATGATTCTTAATTTAGCTAGGTTAATCTTTTCGTTAGGCATTATTGTTGGGGGGCTAA
GGAAAATCGATCTGTATACAGGAAAAGAAAGATAGGAAGTGTATGTTATAGATTTGTTTGGTCACTCCTTTTTTTGGTCTCTTGTCTGTTCCATGTTCTGTTCTCGTTTT
AGTCTGGTGTACCATTTTTTTCTCCTTTTCATCTGTAACATAAGAGAACATACATACATATAAAAAAAAAAAAA
    
```

Dargestellt ist das vermutete *JuBel1*-Transkript, zusammengesetzt aus dem 5'-RACE Klon 5, dem im Two-Hybrid System isolierten Klon und dem cDNA-Klon. Der längste offene Leserahmen ist unter der cDNA-Sequenz angegeben. Die Homöodomäne wurde orange, die vermutete coiled-coil Domäne grün gekennzeichnet. Das postulierte Kernlokalisierungssignal wurde durch einen Balken markiert.

3.2.2 Sequenzanalyse der *JuBel2*-cDNA

3.2.2.1 Screening einer Gersten cDNA-Bank

Für die Isolierung *JuBel2*-homologer cDNAs wurde ebenfalls das im Two-Hybrid System isolierte Genfragment als Sonde eingesetzt. Die cDNA-Inserts der nach drei Hybridisierungsrounden identifizierten positiven Einzelplaques wurden mit Hilfe von PCR (Phagenprimer FP1149 und BP1149) amplifiziert. Siebzehn von einundzwanzig analysierten Phagen enthielten hybridisierende Fragmente von etwa 2 kb, vier Phagen resultierten in Banden von etwa 800 bp Länge. Je ein Vertreter beider Bandenkategorien wurde über die flankierenden *EcoRI*-Schnittstellen in pBluescript kloniert und sequenziert. Der längere der beiden cDNA-Klone ergänzte sowohl das fehlende 3'-Ende von *JuBel2* einschließlich der Homöobox und des Translationsendpunktes als auch weitere 5'-Sequenzen (Abb. 3.6.). Der im Two-Hybrid Screen isolierte Klon III.1 stimmte über seine gesamte Länge von 656 bp 100% mit dem entsprechenden Bereich des λ -Inserts überein.

3.2.2.2 5'-RACE

Abb. 3.9. Vergleich der 5'-RACE Fragmente von *JuBel2* mit der genomischen Sequenz

```

gJ2 TACGCGCGGGCGCTCGCC1ATGTCGTCTCCC2GCGGGCGGTACGGCGGCGCCGAGGCCACCACCAGGCCAC3ATGCTGCTTCACAGCCATGCACACCAC4ATG
37 GGGCGCTCGCCATGTCGTCTCCC2GCGGGCGGTACGGCGGCGCCGAGGCCACCACCAGGCCAC3ATGCTGCTTCACAGCCATGCACACCAC4ATG
M S S P A G G Y G G A E A H H H G H M L L H S H A H H M

gJ2 GCGGCGCGCGCGCGCTCGGGCGGGCAGCTTACCACGTGCCGAGCACAGCCCGCGGAGAAGCTCCGGTTCCCGCCGGACGCCCGCGGAGGACTCA
37 GCGGCGCGCGCGCGCTCGGGCGGGCAGCTTACCACGTGCCGAGCACAGCCCGCGGAGAAGCTCCGGTTCCCGCCGGACGCCCGCGGAGGACTCA
32 ACGGGGAATGCTGCCCGGAGGACTCA
A A A A A A S G G Q L Y H V P Q H S R R E K L R F P P D A A A E D S

gJ2 CCGCGACCCCCCTCGCCCCGCA5CACCAGCACCACCAGCCGGGGCGTGGCCTCCCCCGCCTTCTACTCCTACGCGTCTCCTCCTCCTACTCACC6G
37 CCGCGGCCCCCTCGCCCCGCA5CACCAGCACCACCAGCCGGGGCGTGGCCTCCCCCGCCTTCTACTCCTACGCGTCTCCTCCTCCTACTCACC6G
32 CCGCGGCCCCCTCGCCCCGCA5CACCAGCACCACCAGCCGGGGCGTGGCCTCCCCCGCCTTCTACTCCTACGCGTCTCCTCCTCCTACTCACC6G
P P A P L A P H H Q H H Q A G A W P P A F Y S Y A S S S S S Y S P

```

Der bereits im cDNA-Klon enthaltene Bereich wurde durch gelbe Unterlegung gekennzeichnet. Unter den DNA-Sequenzen ist die Sequenz des vermutlichen Translationsproduktes angegeben. Mögliche ATG-Startkodons wurden rot markiert.
gJ2: genomische Sequenz von *JuBel2*; 32, 37: 5'-RACE Produkte.

5'-RACE Amplifikationen zur Charakterisierung des 5'-Endes der *JuBel2*-cDNA wurden wie unter 3.2.1.2. für *JuBel1* beschrieben durchgeführt. Versuche mit dem Marathon™ Kit mit den genspezifischen Primern JM93 (nested) und JM94 blieben erfolglos. Durch 5'-RACE mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit konnten mit der Primerkombination

JM94 x UP2 Banden von 590 bzw. 400 bp und mit JM93 x NUP um 115 bp kürzere DNA-Fragmente amplifiziert werden. Diese wurden in den Vektor pCR®2.1 kloniert und sequenziert (siehe 7.1.).

Der Klon 32 lieferte 202 bp zusätzlicher Sequenzinformation, enthielt aber kein Startkodon im Leseraster der bereits bekannten *JuBel2*-Sequenz. Mit Klon 37 konnten weitere 166 bp 5'-Sequenz, die drei potentielle Translationsstartpunkte enthielt, identifiziert werden. cDNA-Klon und 5'-RACE Fragment ergaben insgesamt ein Transkript von 2132 bp. Der längstmögliche offene Leserahmen umfaßt 608 AS (Abb. 3.10.). Nimmt man das 3. ATG, dessen benachbarte Basen am ehesten der für monokotyle Pflanzen ermittelten Konsensussequenz für die Translationsinitiation entspricht (Joshi *et al.*, 1997), als Translationsstartpunkt an, so erhält man ein Protein von 581 AS.

Abb. 3.10. *JuBel2*-cDNA

```

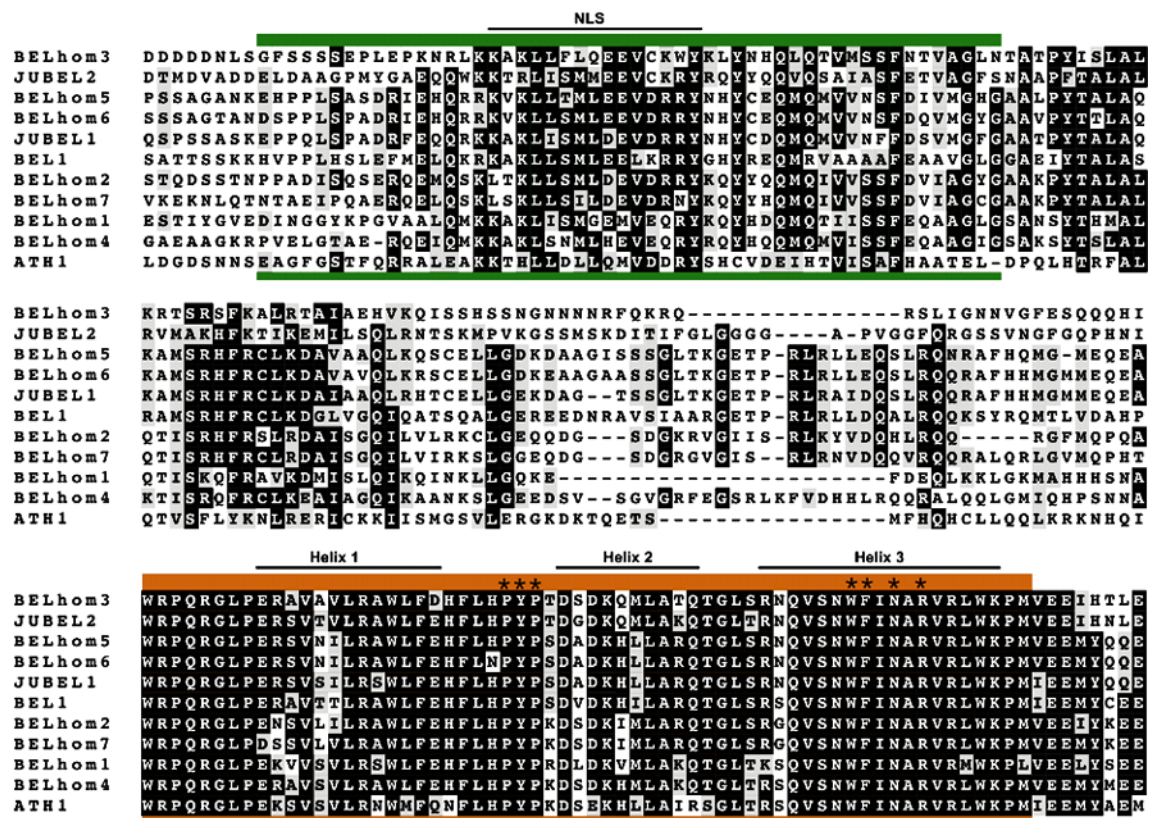
GGGCGCTCGCCATGTCTCTCCCGCCGGCGGGTACGGCGGCCCGAGGCCACCCACCGCCACATGCTGCTTCAACAGCCATGCACACCACATGGCGCCGCCCGCCCGCGCTCG
M S S P A G G Y G G A E A H H H G H M L L H S H A H H M A A A A A A S
GGCGGGCAGCTCTACCACTGCCGACGACAGCCGCGGAGAAGCTCCGGTTCCCGCCGACGCGCGCGGAGGACTCACCGCCGCCCCCTCGCCCCGACACCAGCACCACAG
G G Q L Y H V P Q H S R R E K L R F P P D A A A E D S P P A P L A P H H Q H H Q
GCGGGGCGTGGCGCCCGCCGCTTCTACTCTACTACGCTCCTCTCTCTCTACTACCCGACAGCCCAAGTCCGCGCCGAGGCTGGTGTCTCAACGGGCTCACCGCCAG
A G A W P P P A F Y S Y A S S S S S Y S P H S P T V P Q G Q Q L V L N G L T A Q
CAGGTCACCGCGCAGCAGTTCGCCACATCCCCACGCACAACCTTCTCGCTCTCCCTCTCTCCGCTCGTCCAATCCCGCCACCGCGCCCGCAGCCAGGAAGCAGCAGGAGCGGGGA
Q V T A Q Q F P H I P T H N F S L S L S S A S S N P A T A P P T P R K Q Q E P G
GGCGCCGGCGTGGCGCTCCCTTCCCGGCTACGCTCGGTGCTCGGGCGATCAAAGTTCCTCGTCCCGCGCAGAGGCTTCTGGAGGAGATCTCGACGCTGGGAGCGCCGCGCCGCGCAG
G A G P C G P F T G Y A S V L G R S K F L V P A Q R L L E E I C D V G G A A A H
GCCGACCGCAGCCTCCCGACGAGGGCTGCTCGACCGGACAGATGGACGTCGCGGACGACGAGCTGGACCGCCGAGCCCATGTACGGCCCGCAGCAGCAGTGGAAAGACGAGG
A D R S L P D E G L L D A D T M D V A D D E L D A A G P M Y G A E Q Q W K K T R
CTCATCTCCATGATGGAAGAGGTGTCAAGAGGTACCGGCAGTACTACAGCAGGTCCTCAATCCGCGATCGCTCGTTCGAGACGGTCCGCGGGTTCAGCAACCGCCCGCCGTTCCGGCG
L I S M M E E V C K R Y R Q Y Y Q Q V Q S A I A S F E T V A G F S N A A P F T A
CTGGCCCTGAGGGTATGGCCAAGCACTTCAAGACCATCAAGGAGATGATACTAGGCGAGTGGCCACACAGCAAGATGCCGGTCAAGGGTCTCCATGAGCAAGGACATCACCATC
L A L R V M A K H F K T I K E M I L S Q L R N T S K M P V K G S S M S K D I T I
TTCGGCCTCGCGCGCGCGCCCGCTCCAGAGAGGGAGCAGCGTGAACGGCTTCGGCCAGCCGACAACTCTGGCGCCCGCAGAGGGCCCTCCCGAGCGCTCCCGAGCGCTCCGCTC
F G L G G G G A P V G G F Q R G S S V N G F G Q P H N I W R P Q R G L P E R S V
ACCGTCTCCGGGCTGGCTCTCGAGCACTTCTGCAACCGTATCTTACCGATGGCGACAAGCAAATGCTGGCCAAGCAAACCTGGTTAACAAAGGAATCAGGTGCGAACTGGTTCATC
T V L R A W L F E H F L H P Y P T D G D K Q M L A K Q T G L T R N Q V S N W F I
AACCGAGGGTGAAGCTCTGGAAGCCAATGGTGGAGGAGATCCACAACCTGGAGATGAGGCGAGTCAAGCAGTCCCGCACGACAATGGCAGCCAGCACGGCGTCCCGCCATGCT
N A R V R L W K P M V E E I H N L E M R Q V H K Q S P H D N G S Q H G V H G H A
CACCAGCCATCGTCACAGCAGCAGCAGCAGCGCAGCGGCAAGCGCTCCGAGCCCTGCGACTCGCACCTCGGCCAGTGCAGCGCGCTCACCGGAACCAACCACCACAGCAACCTT
H Q P S S Q Q Q Q Q R S G K R S E P C D S H L G Q C S G V T R N H H H S N P
GCGGCTCTCCCATGGTGGCGGCTTCCCGGACGACCTCTCCAGATGTCCCACTCCATGACGACAGGGCCAGGTGACCTTCGCGCGCTACGGCGCGCTGCCCTCCAGTCCAGCAGCAC
A A S S H G G G F P D D L S Q M S H S M Q Q G Q V T F A G Y G A L P S Q S Q Q H
CAGCACCAGCAGCAGCATGGCTCGCCGACGACCCCCATCATCAGCATCAGTTCGGCGCTGCGGGGCGGGTAAACGGCGCGCGCTGCTGCTCACCTCGGCTCCAGCAACAAC
Q H Q H S S M A S P Q H P H H Q H H V G A A G A G N G G G V S L T L G L H Q N N
AGGGTCTGCTTCGGGGAGCCGCTCCCGCCAACTCGCGCACCGGTTCCGGCTGGAGGACGTCGTGAGCGACCCCTACGTGATGGGCTCCTTCGGCGCGCGCCAGGACCGGCACTTCGCC
R V C F G E P L P A N L A H R F G L E D V V S D P Y V M G S F G G G Q D R H F A
AAGGAGATCGCGGCCACCTGCTCCAGATTTCGTGGGTGACCGATGCTCAGCTCAGCTCAGCTCCGCTCGCGCGCTCCACGCTGATGCACATTGTTGTAATGTACGCACTTACTGCT
K E I G G H L L H D F V G *
GATAATCCTAGGCTGTATATAAGTCGATCATGAAAATCACTTGGCGGCTTGGCTTGACGATCGGCATGAAGAACAACGGTCGATTCCTTTGGAGGGCGGATGAAACATTGACATGCCCTC
ACATGTGACTCTACTAGATCCCCAGGCATGATGCCCTCAACATCAAGCACCTTGGGGTACACATAGCTTCAAATACTTGTCCAAA
    
```

Dargestellt ist das vermutete *JuBel2*-Transkript, zusammengesetzt aus dem 5'-RACE Klon 37 und dem cDNA-Klon. Der längste offene Leserahmen ist unter der cDNA-Sequenz angegeben. Die Homöodomäne wurde orange und die vermutete coiled-coil Domäne grün gekennzeichnet. Das postulierte Kernlokalisierungssignal wurde durch einen Balken markiert.

3.2.3 Sequenzvergleich der HD-BEL-Proteine

Ein Sequenzvergleich der anhand der cDNA-Sequenzen von *JuBel1* und *JuBel2* abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den bisher bekannten HD-BEL-Proteinen aus *Arabidopsis* zeigte, daß Homologien zwischen den Familienmitgliedern v.a. im Bereich der Homöodomäne und des vermuteten coiled-coils liegen (Abb. 3.11.). Die Homöodomänen der HD-BEL-Proteine besitzen die vier invarianten Aminosäuren in Helix 3 (Scott *et al.* 1989), und die drei zusätzlichen Aminosäuren zwischen Helix 1 und Helix 2, die für die TALE-Superklasse der HB-Gene typisch sind (Bertolino *et al.*, 1995).

Abb. 3.11. Multipler Sequenzvergleich konservierter Bereiche der bisher bekannten HD-BEL-Proteine



Konservierte Abschnitte der bisher bekannten HD-BEL-Proteine ATH1 (Quaedvlieg *et al.*, 1995), BEL-Homolog 1-7 (Altschul *et al.*, 1997; Kennnummern AC007290/AC006233.2; AL023094; AC006929; AC007017; Z99707/AF173816; AC004482; AC007047-8) aus *Arabidopsis* und JUBEL1 und JUBEL2 aus Gerste (diese Arbeit) wurden mit BEL1 (Reiser *et al.*, 1995) verglichen. Die vermutliche coile-coil Domänen wurde grün, die Homöodomäne orange gekennzeichnet; die drei konservierten Aminosäuren (PYP) zwischen Helix 1 und Helix 2 und die vier invarianten Aminosäuren der Helix 3 wurden durch Sternchen markiert. Identische Aminosäuren wurden schwarz, ähnliche Aminosäuren grau gekennzeichnet.

3.3 Genomische Organisation von *JuBel1* und *JuBel2*

3.3.1 Isolierung eines möglichen *JuBel1*-Pseudogens

Zur Ermittlung der genomischen Organisation von *JuBel1* wurden zunächst etwa fünf Millionen Klone einer genomischen Gersten-Bank (genomische DNA der Gerstenvarietät *K-Atlas* in λ EMBL4) in drei Hybridisierungsrounds mit dem bereits im cDNA-Screen eingesetzten *JuBel1*-23-Fragment als Sonde nach *JuBel1*-homologen Klonen durchsucht. Dabei wurde ein hybridisierender λ -Klon isoliert. Teile des Inserts wurden subkloniert (pKS-*JuBel1*(pseudo), siehe 7.1.) und ansequenziert. Die ermittelte genomische Sequenz zeigte 100% Identität mit der cDNA-Sequenz von *JuBel1*, und wurde nicht durch Intronsequenzen unterbrochen. Da die Mitglieder der *BEL1*-Genfamilie aus *Arabidopsis* in ihrer kodierenden Region drei Introns in konservierten Positionen besitzen (siehe 3.3.2.), ist davon auszugehen, daß die isolierte genomische Sequenz einem Pseudogen entspricht.

3.3.2 PCR-Amplifikationen genomischer DNA zur Isolierung von Intronsequenzen

Um festzustellen, ob die *JuBel*-Gene Introns in entsprechenden Positionen wie ihre Verwandten aus *Arabidopsis* besitzen, wurden genomische Sequenzen beider Gene mittels PCR-Amplifikation von DNA der Varietät *K-Atlas* isoliert. Die Primer wurden dabei so gewählt, daß sie erwartete Exon/Intron-Grenzen flankierten (Abb. 3.12.). Die Größen der genomischen PCR-Produkte im Vergleich zu den entsprechenden Bereichen der cDNAs lieferten einen ersten Hinweis auf die Existenz von Introns im kodierenden Bereich beider Gene. Durch Klonierung und Sequenzierung der PCR-Fragmente konnte dies bestätigt werden.

3.3.2.1 Intronamplifikationen mit *JuBel1*-spezifischen Oligonukleotiden

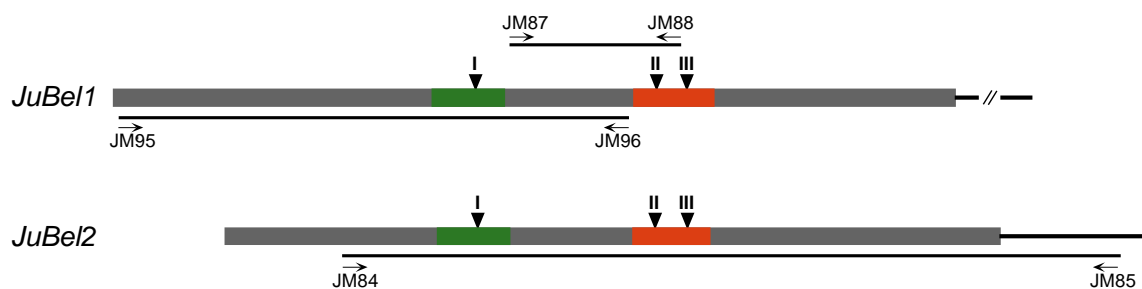
Das Primerpaar JM87 x JM88 amplifizierte mit *JuBel1*(cDNA) als Matrize ein DNA-Fragment von 380 bp. PCR mit genomischer DNA ergab ein Produkt von 1,6 kb, das also vermutlich ein Intron von etwa 1,2 kb enthielt. Mit dem Primerpaar JM95 und JM96 und cDNA als Matrize wurde ein DNA-Fragment von 1,05 kb amplifiziert. Das genomische PCR-Produkt

hatte eine Größe von 2,5 kb, was auf eine Intronlänge von etwa 1,4 kb schließen ließ (Abb. 3.12.).

Die Klonierung des 2,5 kb-Fragmentes in pBluescript erfolgte über die *Bam*HI bzw. *Sal*I-Schnittstellen der Oligonukleotide JM95 und JM96 (siehe 7.1.). Das mit den Primern JM87 x JM88 erzeugte genomische PCR-Fragment wurde nach Phosphorylierung der glatten Enden in *Sma*I-linearisierten pBluescript ligiert (siehe 7.1.). Die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen konnten wegen interner *Sal*I-Erkennungsstellen des PCR-Fragmentes nicht genutzt werden.

Sequenzanalysen der klonierten genomischen PCR-Fragmente zeigten, daß *JuBel1* in Position I und II Introns besitzt, wobei die Intron/Exon-Übergänge im Vergleich zu den *BEL1*-homologen Genen konserviert sind (siehe 3.3.3.3.).

Abb. 3.12. PCR-Amplifikationen von genomischen und cDNA-Matrizen



Schematische Darstellung der *JuBel1* und *JuBel2* cDNAs. Translatierte Sequenzen sind als Kästen abgebildet. Der rot unterlegte Abschnitt entspricht der Homöobox, die grüne Markierung hebt die Sequenz hervor, die für die vermutete coiled-coil Domäne kodiert. Gefüllte Dreiecke deuten die anhand von Sequenzvergleichen mit *BEL1*-verwandten Genen aus *Arabidopsis* erwarteten Positionen der drei Introns (I, II und III) innerhalb der kodierenden Region an. Die für genomische PCR-Amplifikationen verwendeten Primer und deren Amplifikationsprodukte sind durch Pfeile/Balken gekennzeichnet.

3.3.2.2 Intronamplifikationen mit *JuBel2*-spezifischen Oligonukleotiden

Das Primerpaar JM84 und JM85 amplifizierte einen Großteil der *JuBel2* cDNA-Sequenz einschließlich der drei erwarteten Intronpositionen (Abb. 3.12.). PCR mit der *JuBel2*(cDNA) ergab eine Bande von 1,6 kb. Die Amplifikation genomischer DNA lieferte ein Fragment von etwa 3,8 kb, entsprechend 2,2 kb Intronsequenzen. Dieses genomische DNA-Fragment wurde über die flankierenden *Bam*HI bzw. *Sal*I-Schnittstellen der Oligonukleotide in pBluescript integriert.

Die Sequenzanalysen zeigten, daß *JuBel2* in den konservierten Positionen I, II und III Introns besitzt (siehe 3.3.3.3.).

3.3.3 Isolierung genomischer Klone von *JuBel1* und *JuBel2*

Um eine erneute Isolierung intronloser Pseudogene zu vermeiden (siehe 3.3.1.), wurden Intronfragmente von *JuBel1* und *JuBel2* als Sonden für genomische Screens eingesetzt. Insgesamt wurden jeweils etwa 6 Millionen Klone einer *Ca/C15* genomischen Bank in λ EMBL3 nach homologen Klonen durchsucht. Genomische Klone beider Gene einschließlich möglicher Promotor-Sequenzen konnten isoliert und subkloniert werden.

3.3.3.1 Isolierung genomischer *JuBel1*-Klone

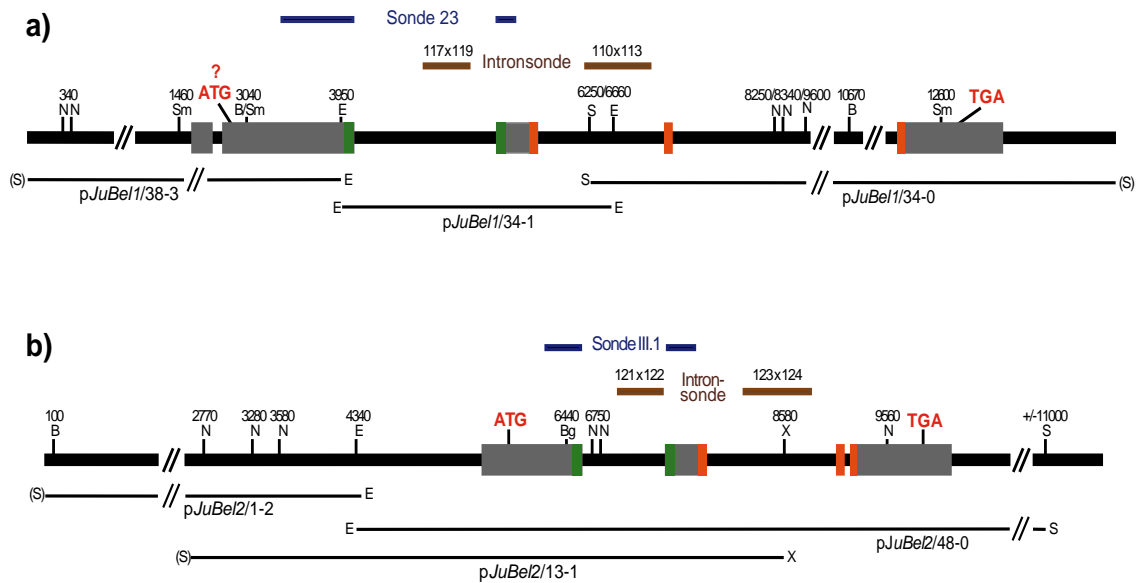
Mit den Primerpaaren JM110 x JM113 (Intron II, 470 bp), bzw. JM117 x JM119 (Intron I, 665 bp) wurden durch PCR Intronbereiche von *JuBel1* amplifiziert und gemeinsam als gemischte Sonde für den genomischen Screen verwendet (Abb. 3.13.a).

Insgesamt wurden in vier Hybridisierungsrounden sieben stark hybridisierende Lambda-Plaques isoliert. Nach DNA-Präparation, Restriktions- und "Southern"-Analyse beschränkten sich weitere Untersuchungen auf zwei *JuBel1* überspannende genomische Lambda-Klone. Die kodierende Region einschließlich flankierender Sequenzen von *JuBel1* wurde durch die Plasmidsubklone *gJuBel1/38-3*, *gJuBel1/34-1* und *gJuBel1/34-0* repräsentiert (siehe 7.1.). Die Nachbarschaft der nicht überlappenden Subklone *gJuBel1/38-3* und *gJuBel1/34-1* ergab sich durch die Homologie zur bereits bekannten cDNA-Sequenz. Abb. 3.13.a zeigt eine schematische Darstellung der genomischen Struktur von *JuBel1*. Die genomische Sequenz von *JuBel1* wurde unter 7.2.2. angegeben.

3.3.3.2 Isolierung genomischer *JuBel2*-Klone

Mit den Primerpaaren JM121 und JM122 bzw. JM123 und JM124 wurden durch PCR DNA-Fragmente aus Intron I (450 bp) bzw. Intron II (670 bp) von *JuBel2* amplifiziert und als gemischte Sonde für das Screening der genomischen Bank verwendet (Abb. 3.13.b).

In drei Hybridisierungsrounden wurden vier stark hybridisierende Einzelplaques isoliert. Nach DNA-Präparation, Restriktions- und Southern-Analyse konnten zwei der Phagen-Klone als identisch identifiziert werden. Überlappende DNA-Fragmente wurden in pBlueskript ligiert und sequenziert, wobei die Subklone *gJuBel2/1-2*, *gJuBel2/13-1* und *gJuBel2/48-0* die kodierende Region und flankierende Sequenzen von *JuBel2* vollständig umfassten (siehe 7.1.). Eine schematische Darstellung der genomischen Struktur von *JuBel2* findet sich in Abb. 3.13.b, die Sequenz wurde unter 7.2.3. angegeben.

Abb. 3.13. Genomische Struktur von *JuBel1* und *JuBel2*

a) Genomische Struktur von *JuBel1*.

b) Genomische Struktur von *JuBel2*.

Transkribierte Sequenzen sind als Kästen dargestellt, wobei grün unterlegte Bereiche für die vermutliche coiled-coil Domäne kodieren und rote Markierungen die Homöobox hervorheben. Unklarheiten bezüglich des Introns im 5'-nicht-translatierten Bereich von *JuBel1* wurden durch ein Fragezeichen vermerkt. Restriktionsschnittstellen und ihre relativen Positionen auf den sequenzierten genomischen Abschnitten sind angegeben. Unter den Genen wurden die zur Sequenzierung herangezogenen Plasmidsubklone mit ihren flankierenden Restriktionsschnittstellen abgebildet. (S) bezeichnet dabei die *SalI*-Schnittstelle des Lambda-Polylinkers und entspricht keiner genomischen Erkennungssequenz. Die für Southern-Hybridisierungen und Bank-Screen verwendeten Sonden sind als blaue bzw. braune Balken über den Genen dargestellt. Zahlen über diesen Balken bezeichnen die zur Erzeugung der Sonden verwendeten Primerpaare. B: *Bam*HI, Bg: *Bg*II, E: *Eco*RI, N: *Nco*I, S: *Sal*I, Sm: *Sma*I, X: *Xba*I.

3.3.3.3 Genomische Struktur von *JuBel1* und *JuBel2* im Vergleich zu den *BEL1*-verwandten Genen aus *Arabidopsis thaliana*

Der Vergleich der cDNA- und genomischen Sequenzen von *JuBel1* und *JuBel2* zeigte, daß beide Gene drei Introns in der translatierten Region besitzen (Abb. 3.13). Sie befinden sich innerhalb des für den vermuteten coiled-coil kodierenden Abschnittes (Intron I) und zwischen Helix 1 und Helix 2 (Intron II) bzw. innerhalb der Helix 3 (Intron III) der Homöobox. In Tabelle 3.3. wurden die bisher publizierten Daten zur Organisation der *BEL1*-ähnlichen Gene aus *Arabidopsis* und Gerste schematisch zusammengefaßt. Von den *Arabidopsis*-Genen wurde nur für *BEL1* und *ATH1* die Isolierung von cDNA-Klonen beschrieben. *BEL1* wurde bisher als cDNA-Sequenz einschließlich der Intronpositionen, nicht aber als genomische Sequenz veröffentlicht. Die hier als *BEL1-hom1* bis *BEL1-hom7* bezeichneten Sequenzen stammen aus Datenbanken (Altschul *et al.*, 1997). Die Gene wurden durch verschiedene Computer-Programme identifiziert; zu Transkripten oder möglichen biologischen Funktionen dieser vermuteten Gene liegen keine experimentellen Daten vor. Die Exon/Intron-Übergänge sind in allen untersuchten Genen konserviert.

Tab. 3.3. Exon/Intron-Struktur der *BEL1*-homologen Gene aus *Arabidopsis* im Vergleich zu *JuBel1* und *JuBel2*

Dargestellt sind die Exon/Intron-Übergänge und -Größen von Vertretern der *BEL1*-ähnlichen Homöoboxgene aus *Arabidopsis* und Gerste. Die mit *BEL1-hom1-8* bezeichneten Sequenzen wurden der GenBank entnommen, wobei die dort angenommenen Exon/Intron-Grenzen weitgehend übernommen wurden. Die Kennnummern der Sequenzen sind in Klammern angegeben. Exons wurden durch graue Unterlegung hervorgehoben.

* Zahlen in Klammern geben die Längen der translatierten Bereiche der cDNAs vom ATG bis zu Intron I bzw. von Intron III bis zum Stop-Kodon an.

** Die genomische Sequenz von *BEL1* wurde nicht veröffentlicht.

*** *ATH1* besitzt 2 Introns, *JuBel1* besitzt vermutlich ein Intron im 5'-nicht-translatierten Bereich der mRNA

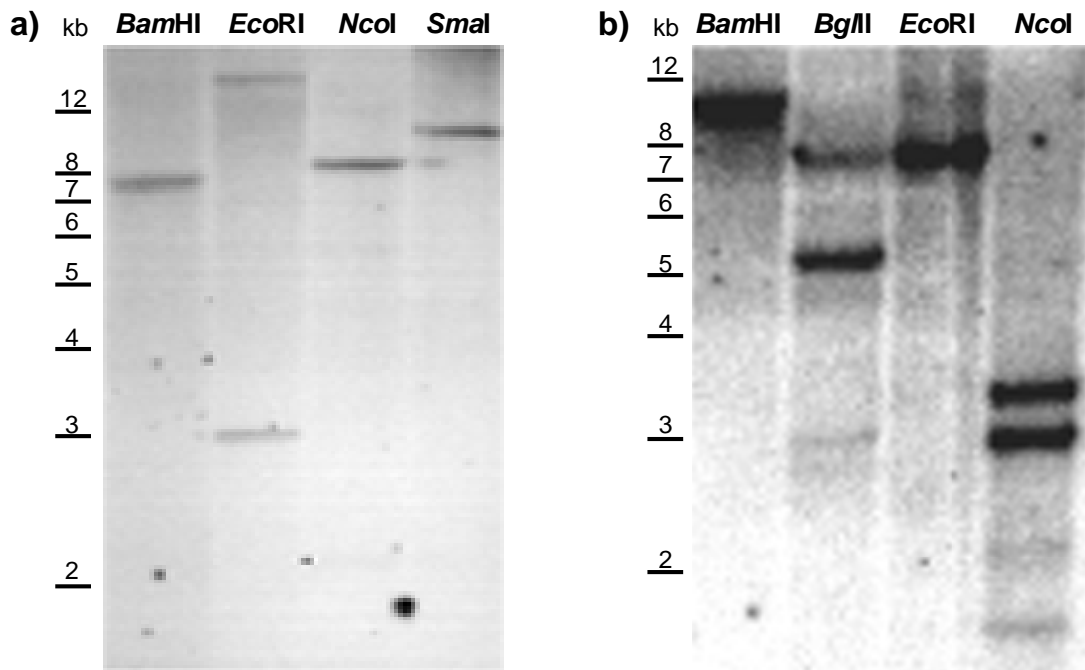
**** Die der Datenbank entnommene Vorhersage der Intron/Exon-Struktur wurde zugunsten einer höheren Homologie mit den anderen Mitgliedern der *BEL1*-ähnlichen Genen verändert. Durch Annahme eines zusätzlichen Introns von 73 bp nahe des 3'-Endes der kodierenden Region wird eine starke Homologie zu *BEL1-Hom4* erreicht. Das 3'-Ende wird dadurch in zwei Exons von 189 bzw. 324 bp unterteilt.

	Exon I	Intron I	Exon II	Intron II	Exon III	Intron III	Exon IV	
BEL1 (A57632)	(925bp)* GAA GAG E E	?**	CTT AAA L K	CTT CAC CC L H (P)	?**	A TAT CCG (P) Y P	AGT CAG S Q	GTA TCA V S
BEL1-Hom1 (AC007290/ AC006233.2)	(435bp)* GAA ATG gt... E M	240bp ...ag GTG GAA V E	CTT CAT L H (P)	176bp ...ag gt... (P)	61bp TAT CCG Y P	AGT CAG gt... S Q	522bp ...ag GTG TCA V S	(471bp)*
BEL1-Hom2 (AL023094)	(651bp)* GAT GAG gt... D E	191bp ...ag GTG GAT V D	CTT CAC L H (P)	76bp ...ag gt... (P)	61bp TAC CCA Y P	GGT CAG gt... G Q	87bp ...ag GTT TCA V S	(516bp)*
BEL1-Hom3 (AC006929)	(999bp)* GAA GAG gt... E E	88bp ...ag GTT TGC V C	CTT CAT L H (P)	96bp ...ag gt... (P)	61bp TAC CCC Y P	AAC CAG gt... N Q	423bp ...ag GTA TCA V S	(342bp)*
BEL1-Hom4 (AC007017)	(843bp)* CAT GAG gt... H E	317bp ...ag GTG GAG V E	CTT CAT L H (P)	84bp ...ag gt... (P)	61bp TAC CCT Y P	AGC CAG gt... S Q	85bp ...ag GTG TCG V S	(747bp)*
BEL1-Hom5 (Z99707/ AF173816)	(1179bp)* GAA GAG gt... E E	846bp ...ag GTG GAC V D	CTT CAC L H (P)	47bp ...ag gt... (P)	61bp TAT CCA Y P	AAT CAG gt... N Q	764bp ...ag GTA TCA V S	(189 (73) 324bp) ****
BEL1-Hom6 (AC004482)	(957bp)* GAA GAG gt... E E	767bp ...ag GTG GAC V D	CTT AAT L N (P)	1159bp ...ag gt... (P)	61bp TAC CCA Y P	AAT CAG gt... N Q	974bp ...ag GTG TCA V S	(471bp)*
BEL1-Hom7 (AC007047-8)	(492bp)* GAC GAG gt... D E	85bp ...ag GTG GAT V D	CTC CAC L H (P)	81bp ...ag gt... (P)	61bp TAT CCA Y P	GGC CAG gt... G Q	96bp ...ag GTA TCG V S	(453bp)*
ATH1 (AC.3688169)	(789bp) CAA ATG gt... Q M	92bp ...ag GTG GAT V D	CTT CAC L H (P)	92bp ...ag gt... (P)	61bp TAC CCG Y P	AGT CAG gt... S Q	403bp ...ag GTA TCA V S	(165bp)*
JuBel1	(1281bp) GAC GAG gc... D E	1428bp ...ag GTG GAT V D	CTA CAC L H (P)	1284bp ...ag gt... (P)	61bp TAC CCC Y P	AAC CAG gt... N Q	4878bp ...ag GTC TCG V S	(540bp)*
JuBel2	(726bp) GAA GAG gt... E E	770bp ...ag GTG TGC V C	CTG CAC L H (P)	1366bp ...ag gt... (P)	61bp TAT CCT Y P	AAT CAG gt... N Q	99bp ...ag GTG TCG V S	(663bp)*

3.3.4 "Southern-Blot"-Analyse von *JuBel1* und *JuBel2*

Die Kopienzahl *JuBel1*- und *JuBel2*-ähnlicher Sequenzen im Gerstengenom wurde durch Southern-Blot-Analyse bestimmt.

Abb. 3.14. Genomische Southern-Blots von *JuBel1* und *JuBel2*



a) Autoradiographie des Southern-Blots mit *JuBel1*-23 als Sonde.

b) Autoradiographie des Southern-Blots mit *JuBel2*-III.1 als Sonde.

Jeweils 15 µg genomischer DNA der Gerstenvarietät *Ca/C15* wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, auf 0,9% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Filter wurden mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten unter stringenten Bedingungen (68°C) hybridisiert.

Das Bandenmuster zeigte, daß die verwendete Sonde 23 spezifisch für das *JuBel1*-Gen ist. Die Größen der hybridisierenden *Bam*HI-, *Eco*RI-, *Nco*I- und *Sma*I-Banden entsprachen den anhand der genomischen Sequenzen erwarteten Fragmenten (Abb. 3.13.a und 3.14.a). Das gleiche galt für *JuBel2*. Die Sonde III.1 markierte die erwarteten *Bam*HI-, *Bgl*II-, *Eco*RI- und *Nco*I-Fragmente (Abb. 3.13.b und 3.14.b). Die Hybridisierung eines Filters mit genomischer DNA der Gerstenvarietät *Bonus* mit den Sonden 23 bzw. III.1 lieferte identische Bandenmuster. Zusätzliche schwächere Signale nach Hybridisierung bei geringer Stringenz (60°C) liessen in beiden Fällen auf die Existenz weiterer verwandter Sequenzen im Gerstengenom schließen. Hybridisierungssignale mit *JuBel1*-23 als Sonde sprachen für ein weiteres, die von *JuBel2*-III.1 für ein bis zwei weitere Gene mit Homologien zu *JuBel1*-23 bzw. *JuBel2*-III.1.

3.4 Charakterisierung der für die Interaktionen zwischen BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2 verantwortlichen Domänen im Two-Hybrid System

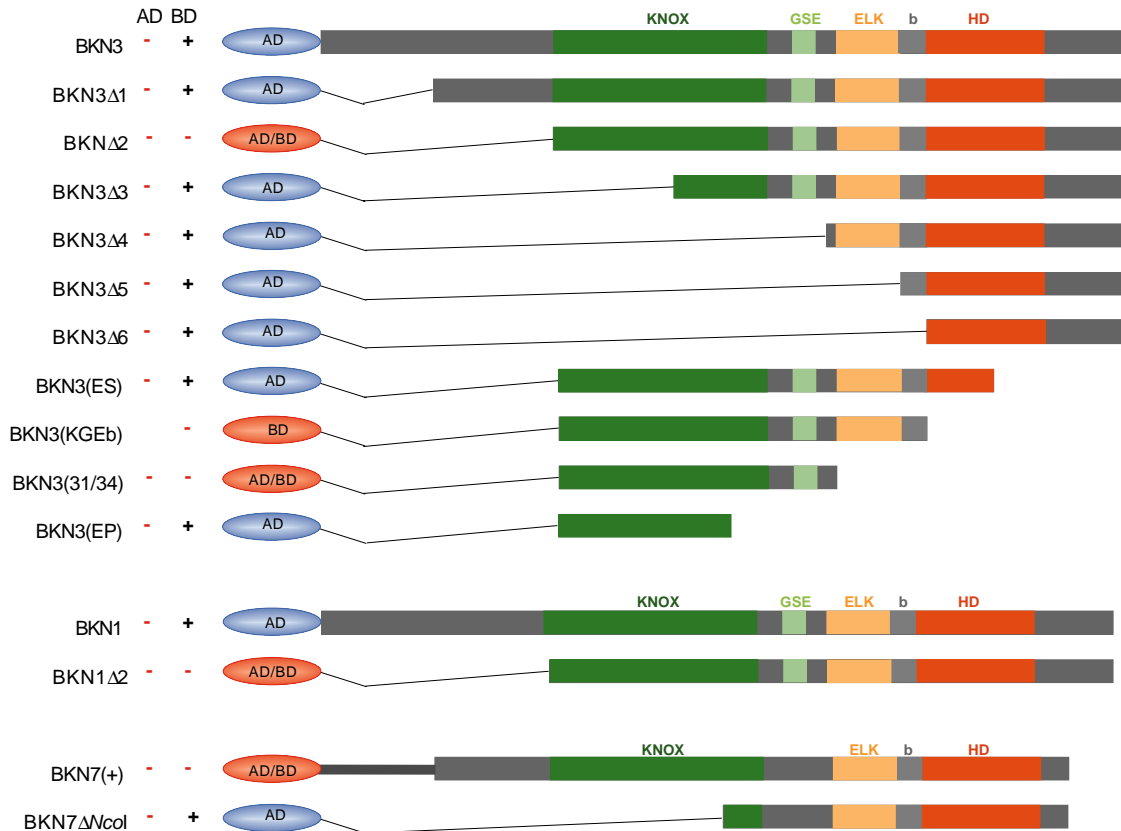
Das Hefe Two-Hybrid System kann auch zur Charakterisierung von Interaktionsdomänen eingesetzt werden, indem Deletionsderivate der untersuchten Proteine auf ihre Fähigkeit zu interagieren getestet werden. In dieser Arbeit konzentrierten sich entsprechende Experimente vor allem auf die Genprodukte von *BKn3* und *JuBel1*. Verschiedene Bereiche beider Proteine wurden auf ihre Interaktionen miteinander und mit BKN1, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2 untersucht. Dabei kamen sowohl die Vektoren pACT2 und pAS2 (Clontech), als auch die Vektoren pAD-GAL4 und pBD-GAL4Cam (Stratagene) in dem Hefestamm Y190 zum Einsatz. Interaktionen wurden anhand der Expression des *LacZ*-Reportergens qualitativ bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 50 bis 200 µl Hefekultur mittels einer "Dot Blot"-Apparatur auf Nylonmembranen transferiert und einem *LacZ*-Filtertest unterzogen (siehe 2.2.5.). Da die β -Galaktosidaseaktivität der Hefen mit zunehmendem Alter häufig abnimmt oder ganz verschwindet, wurden die Interaktionsstudien in der Regel parallel mit mehreren frisch transformierten Hefekolonien durchgeführt. Auf quantitative Analysen der Reporterexpression wurde nach anfänglichen Versuchen verzichtet, da die Ergebnisse in verschiedenen Meßreihen sehr variabel waren (vergleiche auch Estojak *et al.*, 1995). Die Kombination zweier Vektorsysteme, die zu unterschiedlich starker Expression der durch sie kodierten Fusionsproteine führen, ließ die Erfassung quantitativer Daten zusätzlich fragwürdig erscheinen. Dennoch ermöglichten die Intensitätsunterschiede der Blaufärbung in den *LacZ*-Filtertests eine grobe Einordnung in starke und schwache Interaktionen. Grundsätzlich war die β -Galaktosidaseaktivität stark färbender Hefeklonen in unabhängigen Experimenten relativ konstant, wohingegen schwach interagierende Proteinpaare eine variable Färbung bis hin zum Fehlen von Signalen bewirkten. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden durch mehrere unabhängige Hefetransformationen und *LacZ*-Tests bestätigt.

3.4.1 Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7

Zur Charakterisierung der für die Interaktionen verantwortlichen Domänen wurden verschiedene verkürzte Derivate von BKN1, BKN3 und BKN7 als Fusionen an die DNA-bindende und die transaktivierende Domäne des GAL4 Transkriptionsfaktors in die Vektoren des Two-Hybrid Systems kloniert. Abgesehen von wenigen Ausnahmen

wurden die Fragmente durch PCR-Amplifikation isoliert (siehe 7.1.). Abb. 3.15. zeigt eine schematische Darstellung der Deletionsderivate.

Abb. 3.15. Schematische Darstellung der Deletionsderivate von BKN3, BKN1 und BKN7 als Fusionen an die GAL4 DNA-bindende und aktivierende Domäne



Kästen kennzeichnen die in den Konstrukten enthaltenen Bereiche der Proteine. Domänen wurden farblich gekennzeichnet. Die Ovale repräsentieren die Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors, wobei die für Two-Hybrid Studien geeigneten BD-Fusionen durch rote Farbgebung hervorgehoben wurden. Autoaktivierungen der AD/BD-Fusionen in Hefe wurden durch +/- angegeben.

AD: GAL4 Aktivierungsdomäne; BD: GAL4 DNA-bindende Domäne; b: basische Domäne; ELK: ELK-Domäne; GSE: GSE-Box; HD: Homöodomäne; KNOX: KNOX-Domäne; (zur Herstellung der Konstrukte, siehe 7.1.).

Alle Konstrukte wurden zur Kontrolle ohne Interaktionspartner in Hefe exprimiert. Keine der AD-Fusionen induzierte alleine die Aktivierung der Reporterexpression. Die meisten der Proteinfusionen an die DNA-bindende Domäne verursachten eine deutlich nachweisbare β -Galaktosidaseaktivität in transgenen Hefen. Nur BD-BKN3 Δ 2, BD-BKN3(31/34), BD-BKN3(KGEb) und BD-BKN7(+) erwiesen sich für Two-Hybrid Studien als

geeignet. Eine schwache Aktivierung der Reporterexpression durch BD-BKN1 Δ 2 wurde als Hintergrund toleriert.

Y190 wurde mit diesen BD-Fusionskonstrukten in Kombination mit den verschiedenen AD-Fusionen transformiert und mittels β -Galaktosidase-Filtertests auf die Aktivität des *LacZ*-Reportergens getestet. Abb. 3.17. und Tab. 3.4. fassen die Ergebnisse dieser Experimente zusammen.

3.4.1.1 BKN3-Homodimerisierung

BD-BKN3 Δ 2 war im Two-Hybrid System in der Lage in Kombination mit AD-BKN3 voller Länge und AD-BKN3 Δ 1 bis AD-BKN3 Δ 3 die Expression des *LacZ*-Reportergens zu aktivieren. Die Deletion weiterer N-terminaler Sequenzen führte zum Verlust der Interaktion. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß ein für die Assoziation des Dimers notwendiger Abschnitt des Proteins in der Differenz zwischen BKN3 Δ 3 und BKN3 Δ 4, entsprechend dem C-terminalen Teil der KNOX-Domäne und der sogenannten GSE-Box, liegt. BD-BKN3(31/34), das die KNOX-Domäne und die GSE-Box enthält, bewirkte ebenfalls in Verbindung mit AD-BKN3 voller Länge und AD-BKN3 Δ 1 bis AD-BKN3 Δ 3 eine nachweisbare β -Galaktosidaseaktivität in Hefe, wenn auch in weitaus geringerem Maße als BD-BKN3 Δ 2. Obwohl BD-BKN3(KGEb) im Vergleich zu BD-BKN3(31/34) um C-terminale Sequenzen verlängert ist, konnten mit diesem Konstrukt keine eindeutigen Interaktion mit AD-BKN3-Derivaten nachgewiesen werden (Abb. 3.17.a). In einigen Experimenten beobachtete *LacZ*-Signale waren zu schwach um ausgewertet zu werden (siehe 4.3.).

3.4.1.2 Interaktionen von BKN3 mit BKN1 und BKN7

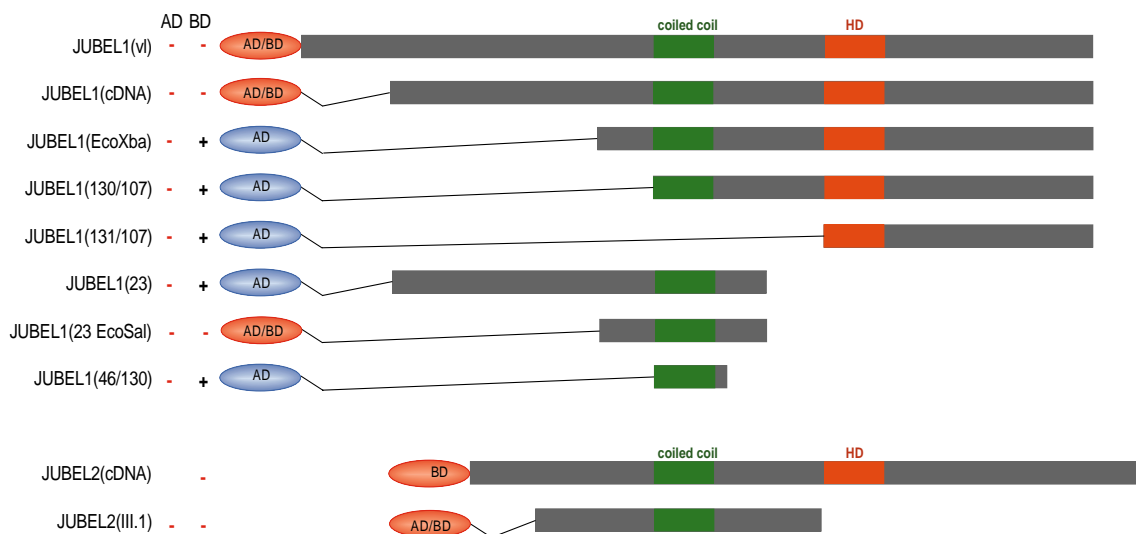
BD-BKN1 Δ 2 und BD-BKN7(+) zeigten im Two-Hybrid System ebenfalls Interaktionen mit AD-BKN3 voller Länge und AD-BKN3 Δ 1 bis AD-BKN3 Δ 3, nicht aber mit kürzeren Derivaten von BKN3. Die schwache Blaufärbung einiger kotransgener Hefen mit BD-BKN1 Δ 2 war auf die durch dieses Konstrukte verursachte Hintergrundaktivität des Reportergens zurückzuführen, konnte aber deutlich von starken Signalen unterschieden werden. Durch reziproke Experimente wurde das beobachtete Interaktionsverhalten weitgehend bestätigt: BD-BKN3 Δ 2 interagiert mit AD-BKN1, AD-BKN1 Δ 2 und AD-BKN7(+). Die schwache Blaufärbung bei Koexpression von BD-BKN3 Δ 2 und AD-BKN7 Δ NcoI konnte nicht eindeutig als Signal gewertet werden. Während BD-BKN3(KGEb) und BD-BKN3(31/34) schwache/

variable Interaktionen mit den AD-Fusionen von BKN1 zeigten, konnte in Kombination mit AD-BKN7(+) und AD-BKN7 Δ Ncol keine Reporterexpression nachgewiesen werden (Abb. 3.17.a).

BD-BKN1 Δ 2 und BD-BKN7(+) interagierten im Two-Hybrid System sowohl mit AD-BKN1 und AD-BKN1 Δ 2 als auch mit AD-BKN7(+). AD-BKN7 Δ Ncol und BD-BKN7(+) dagegen induzierten keine Reporterexpression wenn sie in Hefe koexprimiert wurden. Das schwache Signal von AD-BKN7 Δ Ncol in Kombination mit BD-BKN1 Δ 2 konnte wegen der Hintergrundaktivität dieser BD-Fusion nicht eindeutig interpretiert werden (Abb. 3.17.a).

3.4.2 Interaktionen von JUBEL1 und JUBEL2

Abb. 3.16. Schematische Darstellung der Deletionsderivate von JUBEL1 und JUBEL2 als Fusionen an die GAL4 DNA-bindende und Aktivierungsdomäne



Kästen kennzeichnen die in den Konstrukten enthaltenen Bereiche der Proteine. Domänen wurden farblich gekennzeichnet. Die Ovale repräsentieren die Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors, wobei die für Two-Hybrid Studien geeigneten BD-Fusionen durch rote Farbgebung hervorgehoben wurden. Autoaktivierungen der AD/BD-Fusionen in Hefe wurden durch +/- angegeben.

AD: GAL4 Aktivierungsdomäne; BD: GAL4 DNA-bindende Domäne; coiled-coil: putative Interaktionsdomäne; HD: Homöodomäne; (zur Herstellung der Konstrukte, siehe 7.1.).

Die zur Charakterisierung der Interaktionsdomänen von JUBEL1 und JUBEL2 eingesetzten Deletionsderivate wurden in Abb. 3.16. zusammengefaßt. Alle Fragmente wurden als Fusionen an die GAL4 DNA-bindende und -aktivierende Domäne in Hefe exprimiert und auf ihre Fähigkeit getestet, alleine die Reporterexpression zu aktivieren. Dabei erwiesen sich BD-JUBEL1(vl), BD-JUBEL1(cDNA), BD-JUBEL1(23ES), BD-JUBEL2(cDNA) und BD-JUBEL2(III.1) als geeignete BD-Fusionen für das Two-Hybrid System, da sie keine Expression der β -Galaktosidase induzierten. Auch hier bewirkte keines der AD-Fusionsproteine alleine eine nachweisbare Reporteraktivität in transgenen Hefen.

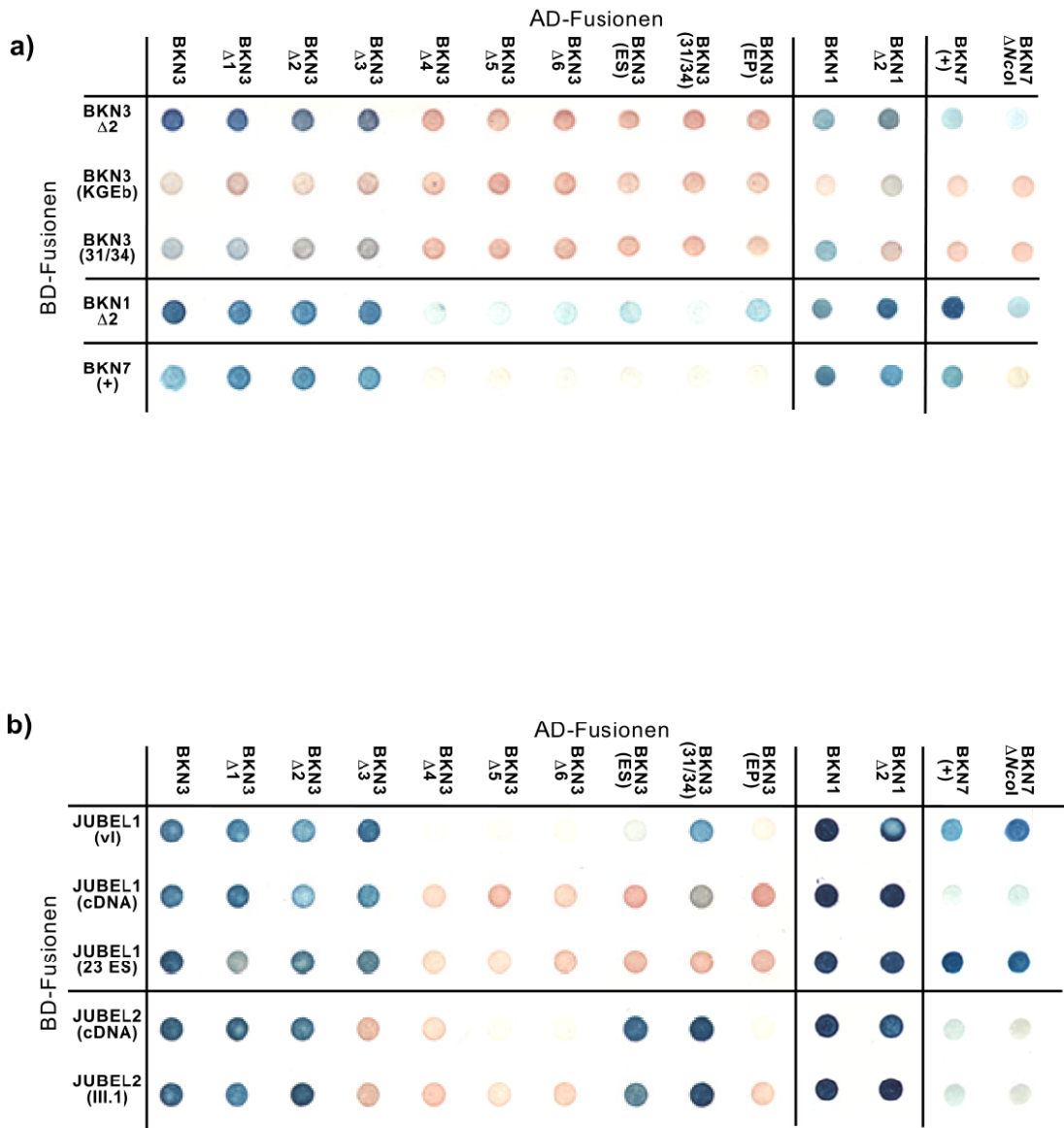
3.4.2.1 Interaktionen von JUBEL1 und JUBEL2 mit BKN3

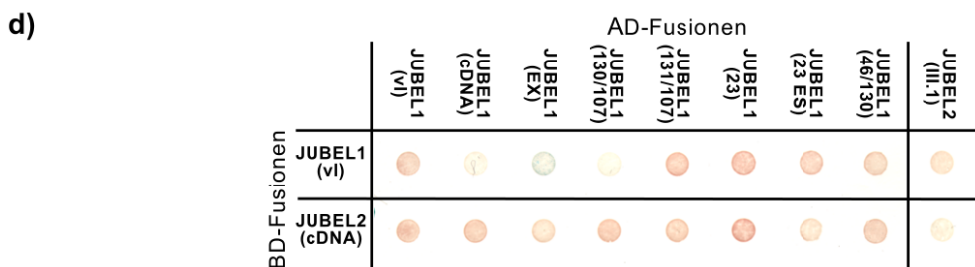
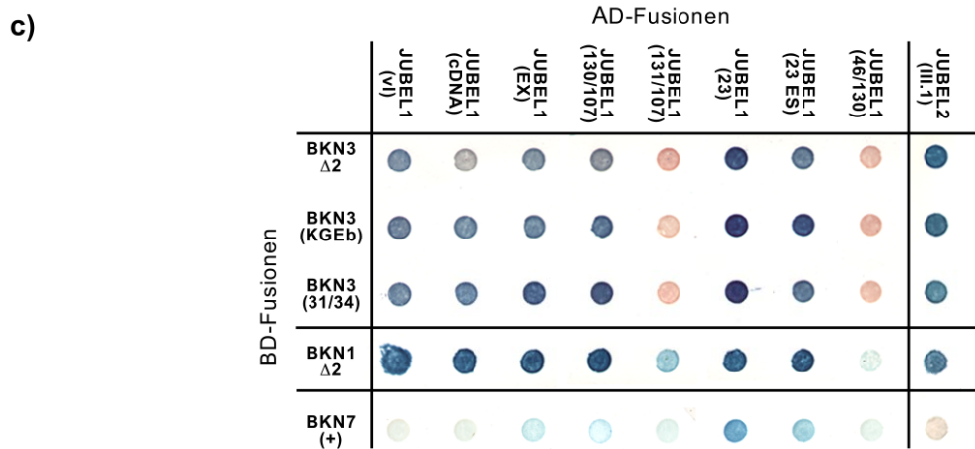
BD-JUBEL1(vl), BD-JUBEL1(cDNA) und BD-JUBEL1(23ES) interagierten, ebenso wie BD-Fusionen der untersuchten KNOX-Proteine, mit AD-BKN3 und AD-BKN3 Δ 1 bis AD-BKN3 Δ 3. Zusätzlich trat eine Aktivierung der Reporterexpression in Kombination mit AD-BKN3(31/34) auf, die mit BD-JUBEL1(vl) stark, mit BD-JUBEL1(cDNA) schwächer und mit BD-JUBEL1(23ES) nicht mehr nachweisbar war (Abb. 3.17.b).

Die beiden DNA-Bindedomänenfusionen von JUBEL2, BD-JUBEL2(cDNA) und BD-JUBEL2(III.1), dagegen, assoziierten zwar mit AD-BKN3, AD-BKN3 Δ 1 und AD-BKN3 Δ 2, nicht aber mit AD-BKN3 Δ 3. Dafür bewirkte die Koexpression beider Fusionsproteine mit AD-BKN3(ES) und AD-BKN3(31/34) eine starke β -Galaktosidaseaktivität der transformierten Hefen. Die KNOX-Domäne und Bereiche um die GSE-Box schienen, ähnlich wie im Falle der Homodimerisierung von BKN3 und seiner Interaktionen mit den KNOX-Proteinen BKN1 und BKN7, auch für die Heterodimerisierung mit JUBEL1 und JUBEL2 verantwortlich zu sein. Die divergierenden Ergebnisse der Interaktionsstudien mit den BKN3-Derivaten BKN3 Δ 4, BKN3(KGEb), BKN3(31/34) und BKN3(ES) in Kombination mit JUBEL1 und JUBEL2 liessen auf geringfügige Unterschiede in den Interaktionsmechanismen beider Genprodukte schließen (siehe 4.3.).

BD-BKN3 Δ 2, BD-BKN3(31/34) und BD-BKN3(KGEb) interagierten im Hefe Two-Hybrid System mit allen JUBEL1-AD-Fusionen außer JUBEL1(131/107) und JUBEL1(46/130) (Abb. 3.17.c). Das deutete darauf hin, daß für die Interaktion verantwortliche Abschnitte in dem Bereich lagen, der JUBEL1(130/107) und JUBEL1(131/107) unterscheidet, nämlich in der Region zwischen dem N-terminalen Ende des coiled-coils und der Homöodomäne. Da aber in Verbindung mit JUBEL1(46/130) keine Reporteraktivität nachgewiesen werden konnte, schien der putative coiled-coil nicht für die Interaktion ausreichend zu sein (siehe 4.3.). AD-JUBEL2(III.1) zeigte mit allen BD-BKN3-Fusionen deutliche Assoziationen.

Abb.3.17. Interaktionen zwischen verschiedenen Deletionsderivaten von BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2 im Two-Hybrid System.





Dargestellt sind die Ergebnisse der *LacZ*-Filtertests transgener Hefen, die verschiedene Kombinationen von AD- und BD-Fusionsproteinen exprimieren.

- Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7 als Fusionen an die AD- und BD-Domäne des GAL4 Transkriptionsfaktors.
- BD-Fusionen von JUBEL1 und JUBEL2 in Kombination mit AD-Fusionen von BKN1, BKN3 und BKN7.
- BD-Fusionen von BKN1, BKN3 und BKN7 in Kombination mit AD-Fusionen von JUBEL1 und JUBEL2.
- Test der AD- und BD-Fusionen von JUBEL1 und JUBEL2 auf Interaktionen.

Interaktionen der in Hefe koexprimierten AD- und BD-Fusionen können anhand der Blaufärbung der Hefen identifiziert werden. Hefen, die nichtinteragierende Proteinpaaere exprimieren, sind in Abhängigkeit von der Färbung der Hefekolonien als gelblich-rosa Punkte oder gar nicht zu erkennen.

Tab. 3.4. Zusammenfassung der Two-Hybrid Interaktionsstudien mit Deletionsderivaten von BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2

a) **A D - F U S I O N E N**

	BKN3	BKN3 Δ1	BKN3 Δ2	BKN3 Δ3	BKN3 Δ4	BKN3 Δ5	BKN3 Δ6	BKN3 ES	BKN3 31/3	BKN3 EP	BKN1	BKN1 Δ2	BKN7 (+)	BKN7 ΔNcoI
BKN3 Δ2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)
BKN3 KGEB	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	(+)	+	(-)	-
BKN3 31/34	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	(-)	-	-
BKN1 Δ2	+	+	+	+	-*	-*	-*	-*	-*	-*	+	+	+	-*
BKN7 (+)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
JUBEL1 vl	+	+	+	+	-	-	-	(+)	+	-	+	+	+	+
JUBEL1 cDNA	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
JUBEL1 23ES	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
JUBEL2 cDNA	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
JUBEL2 III.1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-

b) **A D - F U S I O N E N**

	JUBEL1 vl	JUBEL1 cDNA	JUBEL1 EX	JUBEL1 30/07	JUBEL1 31/07	JUBEL1 23	JUBEL1 23ES	JUBEL1 46/30	JUBEL III.1
BKN3 Δ2	+	+	+	+	-	+	+	-	+
BKN3 KGEB	+	+	+	+	-	+	+	-	+
BKN3 31/34	+	+	+	+	-	+	+	-	+
BKN1 Δ2	+	+	+	+	-*	+	+	-*	+
BKN7(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+	+	-	-
JUBEL1 vl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JUBEL2 cDNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JUBEL2 III.1	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	-

Interagierende Kombinationen von Fusionsproteinen die zu reproduzierbarer Blaufärbung der Hefen im *LacZ*-Filtertest führen sind durch graue Unterlegungen hervorgehoben. Solche mit sehr schwachen/variablen β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden durch Klammern gekennzeichnet.

*BD-BKN1Δ2 bewirkt eine leichte Selbstaktivierung der *LacZ*-Reporterexpression in Y190.

3.4.2.2 Interaktionen von JUBEL1 und JUBEL2 mit BKN1 und BKN7

Die Interaktionen von BD-BKN1 Δ 2 mit den AD-Fusionen von JUBEL1 ähneln denen von BD-BKN3 Δ 2 (Abb. 3.17.b). Wegen der Hintergrundaktivität von BD-BKN1 Δ 2 konnten allerdings keine Aussagen zu negativen Interaktionsbefunden gemacht werden. Die Interaktion zwischen BKN1 und JUBEL1 wurde durch die positiven *LacZ*-Tests der transgenen Hefen mit JUBEL1-BD-Fusionen in Kombination mit AD-BKN1 und AD-BKN1 Δ 2 bestätigt (Abb. 3.17.c).

AD-JUBEL2(III.1) zeigte eine deutliche Assoziation mit BD-BKN1 Δ 2, was ebenfalls durch die reziproken Interaktionen zwischen den BD-Fusionen von JUBEL1 und den AD-Fusionen von BKN1 bestätigt wurde (Abb. 3.17.c).

BD-BKN7(+) zeigte schwache und variable Blaufärbung in Kombination mit den AD-JUBEL1-Fusionen; nur mit AD-JUBEL1(23) und AD-JUBEL1(23ES) schien eine reproduzierbare Assoziation zu bestehen (Abb. 3.17.b). Wurden dagegen BD-JUBEL1(vI) bzw. BD-JUBEL1(23ES) zusammen mit AD-BKN7(Δ *Ncol*) oder AD-BKN7(+) in Hefe koexprimiert, wiesen diese starke β -Galaktosidaseaktivitäten auf (Abb. 3.17.c). BD-JUBEL1(cDNA) schien im Vergleich dazu nur schwach mit den AD-Fusionen von BKN7 zu interagieren.

AD-JUBEL2(III.1) zeigte im *LacZ*-Filtertest keine Interaktion mit BD-BKN7(+). Umgekehrt resultierte auch die Koexpression von BD-JUBEL2(cDNA) bzw. BD-JUBEL2(III.1) mit AD-Fusionen von BKN7 nicht in eindeutig positiven β -Galaktosidaseaktivitäten.

3.4.2.3 Interaktionen zwischen JUBEL1 und JUBEL2

Keine der getesteten Kombinationen von AD- und BD-Fusionen der JUBEL1- oder JUBEL2-Derivate zeigte nachweisbare β -Galaktosidaseaktivität. Beide Proteine scheinen also im Two-Hybrid System weder Homodimere noch Heterodimere bilden zu können.

3.5 Expression von JUBEL1 und JUBEL2 als Fusionen an Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli*

JuBel1(cDNA), *JuBel1*(23), *JuBel2*(cDNA) und *JuBel2*(III.1) wurden in den Vektor pGEX1 ligiert, der zur Expression klonierter Sequenzen als translationale Fusionen an die Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* konzipiert ist.

Die cDNA-Abschnitte *JuBel1*(cDNA) und *JuBel1*(23) wurden zur Klonierung mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden Primer mit internen *MunI*-Schnittstellen verwendet, über die die amplifizierten cDNA-Fragmente in demselben Leseraster wie GST in die kompatible *EcoRI*-Schnittstelle des pGEX1-Vektors integriert werden konnten (siehe 7.1.). Die Orientierung der Inserts innerhalb des Vektors wurde durch Restriktionsanalyse bestimmt. Vektor-Insert-Übergänge und Fehlerfreiheit der PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung überprüft.

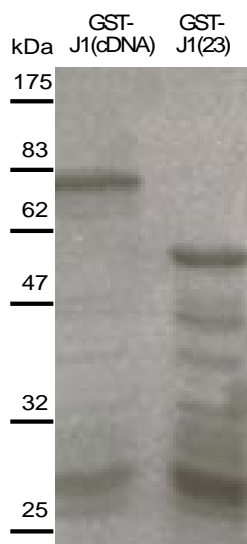


Abb. 3.18. Coomassiefärbung eines Gels mit aufgereinigten Fusionsproteinen GST-JUBEL1(cDNA) und GST-JUBEL1(23)

Nach SDS-PAGE und Coomasiefärbung sind beide Fusionsproteine als Banden der erwarteten Größen zu sehen. JUBEL1(cDNA) bzw. JUBEL1(23) umfassen 585 AS bzw. 325 AS, wobei beide durch die GST-Fusion um zusätzliche 221 AS verlängert werden.

Für die Expression beider Fusionsproteine erwies sich eine Induktion der Tageskulturen (durch Zugabe von IPTG, siehe 2.2.2.5.) nach einer Stunde und anschließendes vierstündiges Wachstum als geeignet. Durch Aufreinigung an Glutathion-Sepharose, SDS-PAGE und Elektroelution wurden jeweils etwa 1,5 mg Fusionsprotein isoliert (Abb. 3.18.), und zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma BioGenes GmbH in Berlin geschickt. Die polyklonalen Antiseren liegen inzwischen für weitere Experimente vor.

JuBel2(cDNA) konnte über die flankierenden *EcoI*-Schnittstellen in pGEX1 integriert werden, da das Leseraster der Schnittstelle am 5'-Ende der cDNA mit dem der Glutathion-S-Transferase übereinstimmte. *JuBel2*(III.1) wurde mit Hilfe eines Primerpaares mit

integrierten *Bam*HI-, bzw. *Eco*RI-Schnittstellen amplifiziert, die eine gerichtete "in frame"-Klonierung des Amplifikationsproduktes ermöglichten (siehe 7.1.). Die Konstrukte wurden durch Restriktions- und Sequenzanalyse getestet und in *E.coli* transformiert.

In mehreren unabhängigen Versuchen unter Verwendung unterschiedlicher Induktionsbedingungen konnte keine Expression der GST-JUBEL2-Fusionen in *E.coli* nachgewiesen werden. Auch Integration der *JuBel2*-Fragmente in pGEX-5X-1 (eine neuere Version des pGEX1-Vektors), oder in pTYB1 (vermittelt die Expression als Fusion an eine Chitin-bindende Domäne) ermöglichte keine sichtbare Expression von *JuBel2*-Fusionsproteinen in *E. coli*.

3.6 Bestätigung der im Two-Hybrid System beobachteten Interaktionen durch *in vitro* Bindungsstudien

Grundsätzlich wird empfohlen, im Two-Hybrid System beobachtete Protein-Protein Interaktionen durch unabhängige Methoden zu bestätigen (siehe 4.1.). In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurde ein Protein als Fusion an Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* überexprimiert und mittels Glutathion-Sepharose (GS) aufgereinigt. Der potentielle Interaktionspartner wurde als radioaktiv markiertes *in vitro* Translationsprodukt zugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C in Interaktionspuffer inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Im Falle einer Interaktion wurde das radioaktiv markierte Protein durch Bindung an das GST-Fusionsprotein mit der Glutathion-Sepharose pelletiert. Nach SDS-PAGE der Proteinpellets konnte es durch Autoradiographie der getrockneten Gele nachgewiesen werden (siehe 2.2.3.).

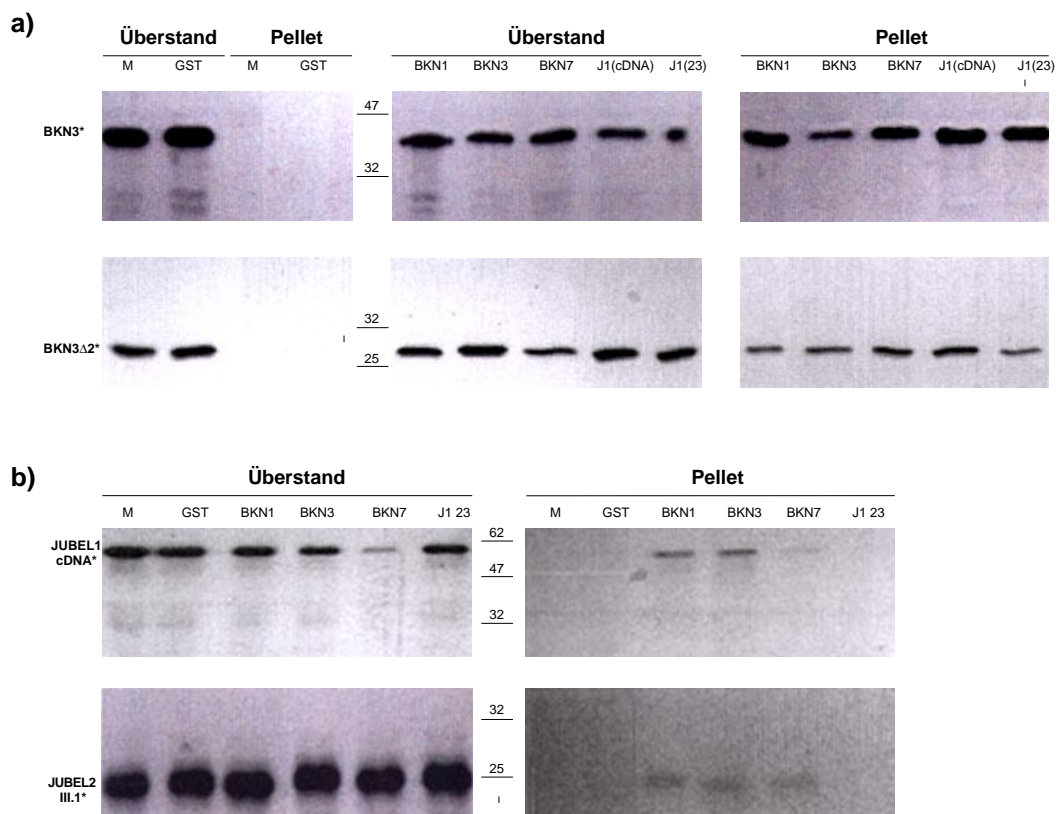
Für die *in vitro* Bindungsstudien wurden BKN1, BKN3 und BKN7 (von Tamara Turbanski zur Verfügung gestellt), JUBEL1(23) und JUBEL1(cDNA) als Fusionen an GST verwendet (siehe 3.5). Glutathion-Sepharose alleine und aufgereinigtes GS-gebundenes GST-Protein dienten als Negativkontrollen. Als radioaktiv markierte Interaktionspartner wurden die *in vitro* translatierten Proteine BKN3, BKN3 Δ 2, JUBEL1(cDNA) und JUBEL2(III.1) eingesetzt. In Kontrollexperimenten mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen erwies sich ein Interaktionspuffer mit 75 mM NaCl als geeignet.

Sowohl radioaktiv markiertes BKN3 voller Länge als auch das N-terminal deletierte Derivat BKN3 Δ 2 banden Glutathion-Sepharose gekoppelte GST-Fusionen von BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1(cDNA) und JUBEL1(23) (Abb. 3.19.a). *In vitro* translatierte JUBEL1(cDNA)- und JUBEL2(III.1)-Peptide banden die GST-Fusionen von BKN1 und BKN3, und in geringerem Maße auch GST-BKN7. Eine Interaktion mit JUBEL1(23) konnte nicht nachgewiesen

werden (Abb. 3.19.b). Keines der *in vitro* translatierten Proteine zeigte Interaktionen mit Glutathion-Sepharose oder Sepharose-gekoppeltem GST.

Diese Ergebnisse bestätigten die im Two-Hybrid System erzielten Daten. BKN3 interagierte auch *in vitro* mit sich selbst, mit BKN1, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2. JUBEL1 und JUBEL2 banden neben BKN3 auch BKN1. Mögliche Interaktionen beider JUBEL-Proteine mit BKN7 konnten auch *in vitro* nicht eindeutig geklärt werden. Eine Homodimerisierung von JUBEL1 bzw. Heterodimerisierung von JUBEL2 mit JUBEL1 konnte weder im Hefe Two-Hybrid System noch durch *in vitro* Bindungsstudien nachgewiesen werden.

Abb. 3.19. Autoradiographie der *in vitro* Interaktionsstudien



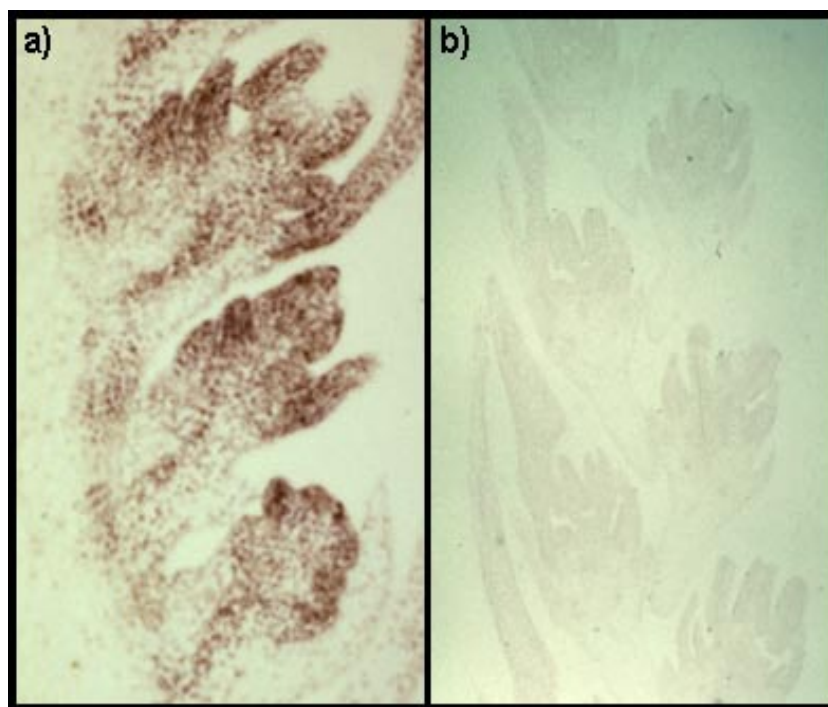
- a) Interaktionen der radioaktiv markierten *in vitro* Translationsprodukte BKN3 (364 AS) und BKN3 Δ 2 (256 AS) mit verschiedenen an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteinen.
- b) Interaktionen der radioaktiv markierten *in vitro* Translationsprodukte JUBEL1-cDNA (585 AS) und JUBEL2-III.1 (224 AS) mit verschiedenen an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteinen.

Die an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteine sind über den Spuren angegeben. M bezeichnet die Ansätze, in denen Glutathion-Sepharose ohne gebundenes Protein eingesetzt wurde. GST kennzeichnet Spuren mit Matrix-gekoppelter Glutathion-S-Transferase. Die Banden eines Proteingrößenmarkers wurden in kDa angegeben.

3.7 Nachweis der *JuBel1*- und *JuBel2*-Transkripte durch *in situ* Hybridisierung

Zur Ermittlung des Expressionsmusters von *JuBel1* und *JuBel2* wurden nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Als Sonden wurden Abschnitte der cDNAs beider Gene verwendet, die Teile des 3'-nicht-translatierten Bereiches und die wenig konservierte translatierte Sequenz 3'-der Homöobox enthielten. Entsprechende Fragmente wurden durch Southern-Hybridisierungen genomischer Gersten-DNA auf ihre Spezifität getestet, in pBluescript kloniert (siehe 7.1.) und von den T7/T3-Promotorelementen des Vektors transkribiert (siehe 2.2.7.) Als Negativkontrollen wurden *in situ* Hybridisierungen mit λ -Transkripten durchgeführt (Abb. 3.20.b). Auf die Verwendung von *sense* Sonden wurde verzichtet, da während der *in vitro* Transkription wiederholt Kontaminationen mit *antisense* Produkten aufgetreten waren (Jürgen Schmitz, persönliche Mitteilung).

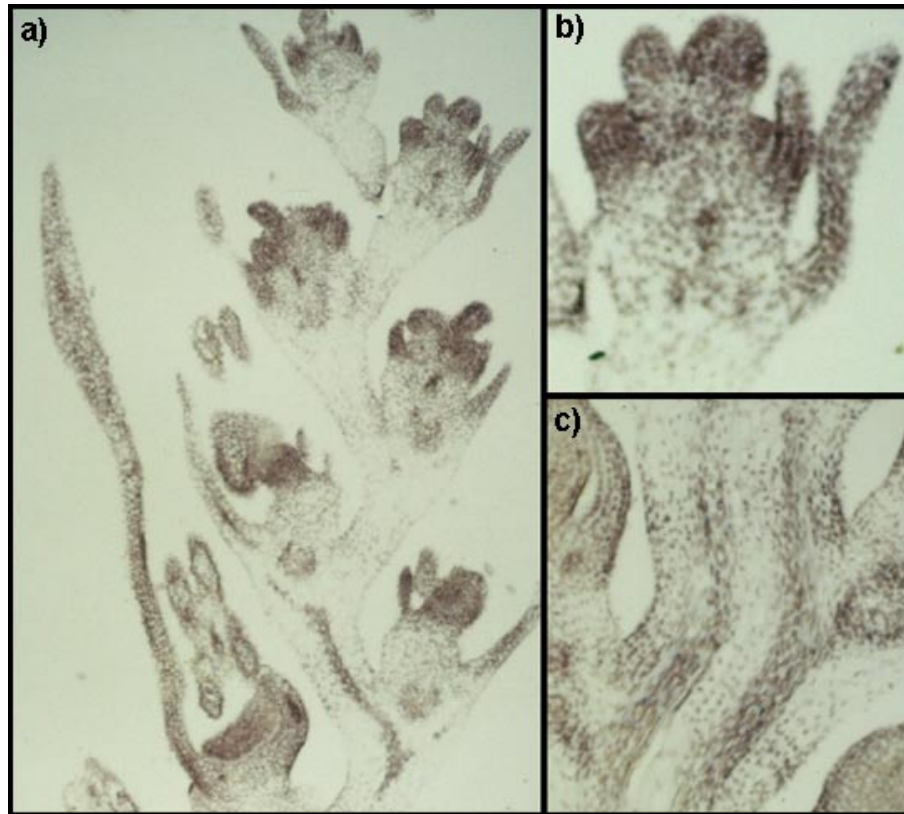
Abb. 3.20. Expressionsmuster von *JuBel1*



- a) *In situ* Hybridisierung des Längsschnittes durch eine Gersteninfloreszenz der Varietät *k*-Atlas mit einer *JuBel1*-spezifischen Sonde.
- b) *In situ* Hybridisierung eines Längsschnittes durch eine Gersteninfloreszenz der Varietät *k*-Atlas mit einer λ -Sonde.

Die Expression beider Gene konnte in jungen Blütenorganen und im vaskulären Gewebe der Infloreszenz nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.20. und Abb. 3.21.). Ähnliche Expressionsmuster wurden für *BKn1* und *BKn3* beschrieben (Rainer Franzen und Yamei Wang, unveröffentlicht).

Abb. 3.21. Expressionsmuster von *JuBel2*



- a) *In situ* Hybridisierung des Längsschnittes durch eine Gersteninfloreszenz der Varietät *k-Atlas* mit einer *JuBel2*-spezifischen Sonde.
- b) Detailansicht einer jungen Blüte.
- c) Detailansicht einer Infloreszenzachse.

Bisher wurden nur Infloreszenzen unterschiedlichen Alters auf *JuBel1*- und *JuBel2*-Expression untersucht. In Zukunft sollen diese ersten Ergebnisse durch Wiederholungen bestätigt und optimiert werden. Außerdem ist die Analyse weiterer Gewebe geplant.

3.8 Überexpression der *JuBel*-Gene in Tabak

Vermutlich translatierte cDNA-Abschnitte von *JuBel1* und *JuBel2* wurden mittels PCR amplifiziert und über interne Restriktionsschnittstellen der Primer in *sense*-Orientierung in die entsprechenden Schnittstellen des Polylinkers zwischen 35S-Promotor und Terminator der pRT-Vektoren integriert. Die gesamte Kasette, bestehend aus CaMV 35S-Promotor, cDNA und Terminator, wurde dann als *HindIII*-Fragment in den T-DNA-Bereich von pBIN19 integriert (siehe 7.1.). Die Konstrukte wurden über *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)-vermittelten Gentransfer in Tabak der Varietät *Nicotiana tabacum* Petit Havana (Linie SR1) transformiert. Die Transformationen wurden wie unter 2.2.6. beschrieben durchgeführt.

3.8.1 Expression von *JuBel1* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors

Da zum Zeitpunkt der Herstellung der Konstrukte der Translationsstartpunkt von *JuBel1* nicht bekannt war, wurde das erste ATG des offenen Leserasters der Pseudogensequenz als Beginn des Konstruktes gewählt. Es entspricht dem in 3.2.1.2. beschriebenen ATG 3.

Tab. 3.5. Zusammenfassung der Phänotypen 35S-*JuBel1*-transgener Tabakpflanzen

Anzahl	Morphologie	Fertilität
23	unauffällig	normal
11	unauffällig	steril
7	viele kleine Samenkapseln manchmal Blattphänotypen in Gewebekultur	z.T. reduzierte Fertilität
3	kleine Samenkapseln mit sehr wenig Samen	reduzierte Fertilität
2	“verkrüppelte” Infloreszenzen (siehe Abb. 3.22)	steril

Insgesamt wurden sechsundvierzig kanamycinresistente Pflanzen in Sterilkultur regeneriert und ins Gewächshaus überführt. Die Beschreibung der Pflanzen bezieht sich auf die T0-Generation, die, soweit möglich, bereits abgeerntet wurde. Die Anwesenheit

des Transgens bzw. seine Expression in diesen Pflanzen wurde bisher nicht untersucht. Dennoch können die beobachteten Phänotypen mit großer Wahrscheinlichkeit auf die transformierten Konstrukte zurückgeführt werden (siehe 4.5.). Parallele Tabaktransformationen mit anderen Transgenen verursachten keine der hier beschriebenen morphologischen Merkmale.



Abb. 3.22. Infloreszenz der transgenen Tabakpflanze 1-9, die *JuBel1* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimiert

Dargestellt ist die Infloreszenz einer Primärtransformante. Die Pflanze hat bisher keine Samen produziert: Blüten fielen früh ab. Die Infloreszenzachsen zeigten eine spiralartige Verdrehung, die mit einer Verkürzung der Internodien zwischen den Blütenknospen einhergingen (Pfeile). Dieser Phänotyp trat in zwei unabhängigen Transformanten auf.

Die Hälfte der regenerierten Pflanzen zeigte keine auffälligen Abweichungen vom Wildtyp. Die Fertilität der anderen Hälfte war in unterschiedlichem Maße beeinträchtigt: dreizehn Pflanzen, von denen zwei die in Abb. 3.22. dargestellten Phänotypen zeigten, produzierten in 3-9 Monaten im Gewächshaus keine Samen. Andere trugen nach anfänglicher Sterilität wenige fertile Blüten. Teilweise ähnelte die Anzahl entstehender Samenkapseln der des Wildtyps, wobei aber deren Größe oft reduziert war. In Gewebekultur auftretende Blattphänotypen waren an älteren Pflanzen im Gewächshaus meist nicht mehr erkennbar.

Die verminderte Fertilität schien durch Defekte des Pollen bedingt zu sein, da Wildtyp-Stempel nicht mit 35S-*JuBel1*-Pollen befruchtet werden konnten. Genauere Analysen der transgenen Linien sollen in der nächsten Generation durchgeführt werden.

3.8.2 Expression von *JuBel2* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors

Auch im Falle von *JuBel2* war das 5'-Ende der cDNA zum Zeitpunkt der Klonierung noch nicht identifiziert. Der Beginn der bekannten cDNA-Sequenz wurde durch entsprechende Konstruktion des Amplifikationsprimers mit einem ATG-Startkodon versehen, was die Expression eines in Relation zum angenommenen ATG 1 N-terminal um 78 AS verkürzten Peptides zur Folge hatte (siehe 3.2.2.2. und 7.1.). Die beschriebenen Phänotypen wurden an den Primärtransformanten beobachtet, deren genetische Charakterisierung noch aussteht.

Tab. 3.6. Zusammenfassung der Phänotypen 35S-*JuBel2*-transgener Tabakpflanzen

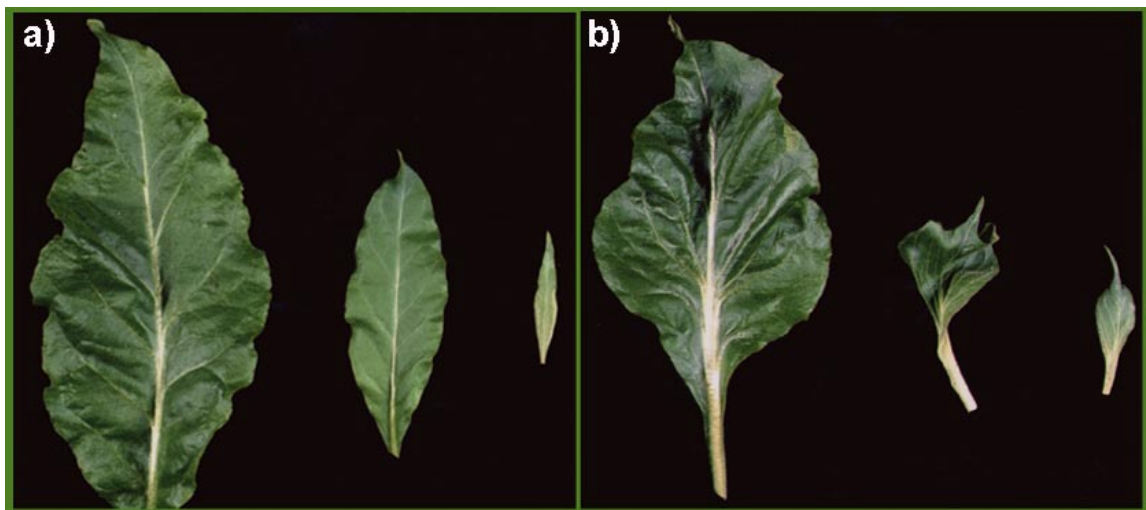
Anzahl	Morphologie	Fertilität
10	unauffällig	normal
3	Blütenphänotyp	2 steril, 1 fertil
2	Blütenphänotyp und Blattphänotyp	1 steril, 1 fertil
3	unauffällig	steril

Insgesamt wurden achtzehn kanamycinresistente Pflanzen ins Gewächshaus überführt, wobei die potentiell transgenen Explantate bereits während der Regeneration in Sterilkultur auffällige Abweichungen vom Habitus anderer transgener Tabakpflanzen zeigten. Zu Beginn der Organogenese bildeten nur wenige der entstehenden *JuBel2*-transgenen Explantate elongierte vegetative Sproßachsen aus. Stattdessen wuchsen Blätter und zum Teil auch Infloreszenzen rosettenähnlich aus dem wuchernden Kallusgewebe. Solche Sprosse konnten teilweise nur schwer oder gar nicht bewurzelt werden, da sie nach Transfer auf hormonfreies Wurzelmedium sofort mit der Blütenbildung begannen. Ihr reduziertes Regenerationspotential führte dazu, daß nur achtzehn 35S-*JuBel2*-transgene Pflanzen in demselben Zeitraum und unter identischen Bedingungen wie die sechsundvierzig 35S-*JuBel1*-Transformanten regeneriert werden konnten.

Zwei der Pflanzen zeigten Veränderungen der Blattmorphologie, die an die milden Phänotypen erinnerten, die durch die Überexpression von Klasse 1 KNOX-Genen verursacht werden (siehe 1.5.2.). Die Blattvenatur verzweigte sich im Vergleich zum Wildtyp in mehr basal gelegenen Bereichen der Spreite. Die Koordination des Wachstums von Leitgewebe und interfazikulären Bereichen schien gestört zu sein, was zu

Aufwölbungen in basalen Blättern und einer Verdrehung der Spreiten in höher an der Pflanze wachsenden Blättern führte (Abb. 3.23.).

Abb. 3.23. Blattphänotyp der 35S-*JuBel2*-transgenen Pflanze 2-11 im Vergleich zum Wildtyp



a) Wildtyp-Tabakblätter aus unterschiedlichen Positionen an der Sproßachse.
b) 35S-*JuBel2*-transgene Blätter aus unterschiedlichen Positionen an der Sproßachse. Charakteristisch ist das fächerartige Auseinanderlaufen der Blattvenen und die Aufwölbung des interfaszikulären Gewebes, bzw. die Verdrehung der Blattspreiten.

Sechs der achtzehn regenerierten Pflanzen zeigten außerdem auffällige Blütenphänotypen. An der Außenseite morphologisch normaler Petalen entstanden Auswüchse, die in frühen Blütenstadien umgebogen im Kelch steckten und die Blüte später als Kranz schmaler Fortsätze umgaben. Die ektopischen Auswüchse waren an ihrer Basis als geschlossener Ring mit den Petalen verwachsen, wobei ihre Färbung der der Petalen entsprach (Abb. 3.24.a und c). In einigen Pflanzen traten Blüten auf, deren Kronen nur auf einer Seite Anhänge trugen. Ob es sich bei den beschriebenen ektopischen Strukturen um einen zusätzlichen Kreis von Petalen oder um eine frühe Abspaltung von Petalenprimordien handelte, muß durch genauere morphologische Untersuchungen der Blütenentwicklung geklärt werden.

Zusätzlich traten auch an der Außenseite der Sepalen ektopische Auswüchse auf, die teilweise lokalisiert an einer Seite des Kelches entstanden, in anderen Fällen aber flächig einen Großteil des Kelches umschlossen. Sie entsprangen nahe der Blütenbasis und bewirkten keine Beeinträchtigung der Sepalenentwicklung (Abb. 3.24.b). In manchen Seitensprossen stark betroffener Pflanzen trugen bereits junge Blütenknospen einen von

der Basis des Kelches ausgehenden Kreis proliferierenden blattähnlichen Gewebes. Solche Knospen fielen in der Regel sehr früh ab. Über ihren Petalen-Phänotyp konnten daher keine Aussagen gemacht werden.

Abb. 3.24. Blütenphänotyp der CaMV 35S-*JuBel2*-transgenen Pflanze 2-18



- a) Abbildung eines Blütenstands. Die Anhänge der Petalen (rosa Pfeile) und Sepalen (weißer Pfeil) sind deutlich zu sehen.
 b) Kelchanhänge einer Blüte derselben Pflanze (schwarzer Pfeil).
 c) Nach Entfernen des Kelches wird die basale Fusion der petaloiden Anhänge deutlich (rosa Pfeil).

Die Sterilität der Pflanzen korrelierte nicht mit der Stärke der morphologischen Phänotypen. Drei Pflanzen, deren Aussehen von dem des Wildtyps nicht zu unterscheiden war, produzierten während fünf Monaten im Gewächshaus keine Samen, während einige der phänotypisch auffälligen Pflanzen fertile Blüten trugen. Reziproke Kreuzungen zwischen

35S-*JuBel2*-transgenen Pflanzen und SR1 zeigten wie für die 35S-*JuBel1*-transgenen Pflanzen, daß die Sterilität auf Defekte des Pollen zurückzuführen war.

Die Ausprägung der beschriebenen Blütenphänotypen war nicht konstant. Pflanzen mit ursprünglich starken phänotypischen Veränderungen produzierten Seitentriebe mit Blüten, die vom Wildtyp nicht zu unterscheiden waren. Selbst innerhalb einzelner Blütenstände wurde eine starke phänotypische Divergenz beobachtet. Da das Auftreten/Verschwinden der Phänotypen oft in mehreren der im Gewächshaus gezogenen Pflanzen parallel beobachtet wurde, könnten Umwelbedingungen wie Temperatur- oder Helligkeitsschwankungen Einfluß auf die Penetranz der Transgenwirkung haben.

4. DISKUSSION

4.1 BKN3 im Two-Hybrid System

Der Phänotyp der homöotischen Gerstenmutante *Hooded*, resultierend aus der ektopischen Expression des Klasse 1 KNOX-Gens *BKn3*, kann als Hinweis auf besondere Eigenschaften der Deckspelze der Gerstenblüte gewertet werden. Was verleiht dieser Region die Kompetenz, auf die Überexpression von *BKn3* mit der Bildung einer Kapuze zu reagieren? Durch die Identifizierung und Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen unter Beteiligung von BKN3 sollten in dieser Arbeit mögliche Antworten auf diese Frage gefunden werden.

Wie unter 1.7. beschrieben, ist das Hefe Two-Hybrid System eine potente Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen, da es auch zum Studium schwacher Interaktionen geeignet ist und mit vergleichsweise geringem Aufwand die Identifizierung interagierender Proteine aus cDNA-Expressionsbibliotheken ermöglicht (Fields und Song, 1989). Andererseits birgt es die Gefahr der Isolierung "falsch positiver" Klone in sich (Hengen, 1997; Colas und Brent, 1998). Daher sollten Protein-Protein Interaktionen, die unter Verwendung des Two-Hybrid Systems identifiziert wurden, durch unabhängige Methoden bestätigt werden. Außerdem bedeutet die Fähigkeit zweier Proteine zu physikalischer Assoziation nicht notwendigerweise, daß diese Interaktion auch *in vivo* von Bedeutung ist. Beispielsweise können HD-Proteine aus verschiedenen Organismen *in vitro* oder in Hefe miteinander interagieren, obwohl sie *in vivo* nie in Kontakt kommen. In dem etwas realistischeren Kontext eines Two-Hybrid Experimentes mit Proteinen aus demselben Organismus bedeutet das, daß die vermutlichen Interaktionspartner unter Umständen nicht in denselben Zelltypen oder intrazellulären Kompartimenten vorkommen. Detaillierte Expressionsanalysen und nach Möglichkeit *in vivo* ausgeführte funktionale Tests zur Bestätigung der angenommenen Interaktionen sind daher erstrebenswert.

Die Interaktionen zwischen den KNOX-Proteinen BKN1, BKN3 und BKN7 wurden durch Two-Hybrid Experimente mit deletierten Derivaten unter Austausch der DNA-bindenden und der Aktivierungsdomäne innerhalb des Systems mehrfach nachgewiesen (siehe 3.1.3.2. und 3.4.1.). Außerdem konnten sie durch *in vitro* Bindungsstudien bestätigt werden (siehe 3.6.). *In situ* Hybridisierungen mit *BKn1*- und *BKn3*-spezifischen Sonden zeigen, daß beide Gene in meristematischen Geweben des Sprosses (SAM und Infloreszenzmeristem) und in jungen Blättern und Blütenorganen der Gerste exprimiert werden (Rainer Franzen und Yamei Wang, unveröffentlicht). Die Expressionsdomänen von *BKn7*, untersucht durch Northern-Analyse und RT-PCR, überlappen mit denen von

BKn1 und *BKn3* (Yamei Wang, unveröffentlicht), so daß eine Interaktion der Proteine auch *in vivo* prinzipiell möglich ist. Die subzelluläre Lokalisierung von BKN1, BKN3 und BKN7 wurde nicht untersucht. Für KN1 konnte allerdings gezeigt werden, daß im Bereich der ELK- und der Homöodomäne zwei funktionale Kernlokalisierungssignale liegen (Meisel und Lam, 1996). Die Gerstenproteine weisen in diesen Abschnitten große Ähnlichkeit mit KN1 auf (100% Identität zwischen BKN3 und KN1 in der N-terminal gelegenen NLS), was zu der Annahme berechtigt, daß auch BKN1, BKN3 und BKN7 in den Kern transportiert werden.

Ein *in vivo* Testsystem zur Bestätigung der Interaktionen in Gerste steht nicht zur Verfügung. Dafür liefern die Phänotypen kotransgener Tabaklinien, die sowohl *BKn1* als auch *BKn3* unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren, einen Hinweis auf eine mögliche funktionale Interaktion zwischen beiden Proteinen. Durch die Kombination beider Transgene entwickeln einige Blüten Sepalen mit petaloiden Merkmalen; ein Phänotyp, der in den Einzeltransformanten nie beobachtet wurde (Müller, 1997). Eine physikalische Interaktion der Proteine kann damit allerdings nicht bewiesen werden.

Durch einen Two-Hybrid Screen mit BKN3 als Köder wurden zwei weitere mögliche Interaktionspartner von BKN3 isoliert, die der HD-BEL1-Familie der Homöoboxgene angehören (siehe 3.1.4.). Die Interaktionen beider Genprodukte mit BKN1 und BKN3 wurden durch umfangreiche Two-Hybrid Experimente innerhalb des Systems (siehe 3.4.2.) und durch GST-Bindungsstudien *in vitro* bestätigt (siehe 3.6.). BKN7 dagegen scheint nur schwach mit JUBEL1 zu assoziieren und nicht an JUBEL2 zu binden.

In mehreren Versuchen gelang es bisher nicht, die Transkripte der *JuBel*-Gene durch Northern-Hybridisierung von Gersten-RNA nachzuweisen. Vorläufige Ergebnisse aus RT-PCR Amplifikationen zeigen die Anwesenheit der Transkripte in Blättern und Infloreszenzen. Einen weiteren Hinweis auf überlappende Expressionsdomänen von *BKn3*, *JuBel1* und *JuBel2* liefert die Tatsache, daß RNA-Präparationen zur Herstellung der im Two-Hybrid System und cDNA-Screen verwendeten cDNA-Banken und der cDNA, die für die 5'-RACE Amplifikationen genutzt wurde, aus *BKn3*-exprimierenden Geweben stammten. Erste Ergebnisse aus *in situ* Hybridisierungen mit *JuBel1*- und *JuBel2*-spezifischen Sonden bestätigen die Kolo-kalisierung beider Transkripte mit *BKn1* und *BKn3* (siehe 3.7.). Die Expression beider Gene konnte in jungen Blütenorganen und im vaskulären Gewebe der Infloreszenz nachgewiesen werden. *In situ* Hybridisierungen an weiteren Gerstengeweben sind geplant.

Mit den beiden *JuBel*-Genen wurden wahrscheinlich nicht alle potentiellen Interaktionspartner von BKN3 identifiziert. Im Falle einer Sättigung des Two-Hybrid Screenings wäre auch die Isolierung der interagierenden Proteine BKN1, BKN3 und BKN7 erwartet worden. Limitierender Faktor scheint die verwendete cDNA-Bank gewesen zu

sein. Probleme lagen in der Klonierung einer ausreichenden Zahl an Primärklonen und in der Effizienz der *in vivo* Exzision zur Isolierung der Plasmid-DNA für die Hefetransformationen (siehe 3.1.4.1.). Die Identifizierung weiterer Interaktionspartner könnte durch eine Wiederholung der Two-Hybrid Screens unter Verwendung neu klonierter Bank-Plasmide versucht werden. Durch direkte Ligation der cDNA in den pAD-Shuttle-Vektor könnte eventuell eine cDNA-Bank besserer Qualität hergestellt werden (Kai J. Müller, persönliche Mitteilung).

4.2 *JuBel1* und *JuBel2*

Sequenzvergleiche zeigen, daß es sich bei den im Two-Hybrid Screen isolierten Genen um Mitglieder einer in Gerste bisher noch nicht beschriebenen Familie von Homöoboxgenen handelt. *BEL1* und *ATH1* aus *Arabidopsis* und eine schnell wachsende Anzahl möglicher homologer Gene, die im Rahmen der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms identifiziert werden (Stand September 1999: *BEL1*, *ATH1*, und sieben weitere *BEL1*-homologe Gene), sind Vertreter dieser Gruppe der HD-BEL1-Gene (Reiser *et al.*, 1995, Quaedvlieg *et al.*, 1995; Altschul *et al.*, 1997). Homologien der Homöoboxsequenzen zeigen ihre Verwandtschaft zu den KNOX-Genen (siehe 1.4.).

4.2.1 Charakterisierung der cDNA-Sequenzen

Die tatsächlichen Transkriptions- und Translationsstartpunkte von *JuBel1* konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht zweifelsfrei identifiziert werden (siehe 3.2.1.). Im Two-Hybrid System und durch den cDNA-Screen isolierte cDNA-Klone vervollständigen lediglich das 3'-Ende des Transkriptes, und die Ergebnisse der 5'-RACE Amplifikationen sind widersprüchlich (siehe 3.2.1.2.). Drei der 5'-RACE Produkte tragen im Vergleich zur genomischen Sequenz eine Deletion von 278 bp, deren flankierende Basen mit dem Konsensus typischer Exon/Intron-Übergänge übereinstimmen (Brown, 1996). Unmittelbar 5' der Deletion befindet sich ein Stop-Kodon in demselben Leseraster wie das angenommene Protein. Es scheint also ein Intron im nicht-translatierten 5'-Bereich des Transkriptes (5'-UTR) vorzuliegen. Sequenzvergleiche des anhand dieser RACE Produkte angenommenen längsten offenen Leserasters mit homologen Proteinen aus *Arabidopsis* zeigen, daß in den weit N-terminal gelegenen Bereichen kurze homologe Abschnitte vorkommen. Allerdings stützt sich die Identifizierung der kodierenden Regionen der *BEL1*-homologen genomischen Sequenzen auf Computervorhersagen, ohne daß experimentelle Beweise für ihre Richtigkeit erbracht wurden.

Andere RACE Produkte können zum jetzigen Zeitpunkt kaum interpretiert werden. In zweien der sequenzierten Fragmente wurden am 5'-Ende Abschnitte ohne Homologien zur bekannten genomischen *JuBel1*-Sequenz gefunden. Falls es sich dabei nicht um Amplifikationsartefakte handelt, müßte das 5'-Ende der mRNA weitere Introns von mindestens 2,5 kb Länge enthalten. Das *BEL1*-homologe Gen *ATH1* kodiert für Transkripte, deren 5'-UTRs divergieren. Bisher ist nicht bekannt, ob diese Unterschiede durch differenzielles Spleißen der zwei Introns in diesem Bereich oder durch alternative Transkriptionsinitiation entstehen. Im Leader der cDNA liegende kurze ORFs üben *in vitro* einen negativen Einfluß auf die Translation aus (Quaedvlieg *et al.*, 1995). Auch in einigen KNOX-Genen wurde alternative Transkriptionsinitiation (Matsuoka *et al.*, 1993; Tamaoki *et al.*, 1995) und eine mögliche Translationskontrolle durch kurze ORFs im 5'-UTR der Transkripte beschrieben (Ruberti *et al.*, 1991; Carabelli *et al.*, 1993; Schindler *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1994; Muehlbauer *et al.*, 1999). In den 5'-RACE Produkten von *JuBel1* können ebenfalls kurze ORFs identifiziert werden (siehe 3.2.1.2.). Ob die durch RACE Amplifikationen erhaltenen Banden das Vorkommen unterschiedlicher *JuBel1*-Transkripte *in vivo* widerspiegeln oder ob es sich dabei um experimentelle Artefakte handelt, soll in Zukunft durch RT- und genomische PCR-Amplifikationen und eine Wiederholung der 5'-RACE überprüft werden.

4.2.2 Genomische Organisation von *JuBel1* und *JuBel2*

Sowohl für *JuBel1* als auch für *JuBel2* konnten genomische Klone identifiziert werden, die sowohl die kodierende Region als auch mögliche 5'-gelegene regulatorische Sequenzen umfassen (siehe 3.3.). Ein Vergleich der cDNA- und genomischen Sequenzen zeigt, daß innerhalb der translatierten Bereiche drei Introns liegen. Die Positionen der Introns sind zwischen allen bisher beschriebenen Mitgliedern der HD-BEL1-Familie der Homöoboxgene konserviert und werden von den Sequenzen GT...AG flankiert, die als konservierte Intron/Exon-Grenzen gelten (Brown, 1996). Eine Ausnahme stellt das erste Intron des translatierten Bereichs von *JuBel1* dar, das an seinem 5'-Ende GC anstelle von GT trägt. Diese Spleißstelle kommt in etwa 0,4 - 1% der bekannten Pflanzenintrons vor (Simpson und Filipowicz, 1996). Die Introns liegen innerhalb der konservierten Sequenzabschnitte. Intron I befindet sich in der vermuteten coiled-coil Domäne, und Intron II und Intron III liegen zwischen Helix 1 und Helix 2 bzw. innerhalb der Helix 3 der Homöodomäne. Diese Intronpositionen unterscheiden die HD-BEL1-Gene von den KNOX-Genen und anderen Mitgliedern der TALE-Superklasse der Homöoboxgene (Bürglin, 1997). Das durch RACE Amplifikationen isolierte mögliche 5'-Ende der *JuBel1*-cDNA trägt

vermutlich zusätzlich ein weiteres Intron im nicht-translatierten Bereich, das ebenfalls von den typischen flankierenden Sequenzen eingerahmt wird (siehe 3.2.1.2. und 4.2.1.).

4.3 Interaktionen zwischen JUBEL- und BKN-Proteinen

Zur Identifizierung der strukturellen Grundlagen für die Interaktionen von BKN3 mit den Genprodukten anderer Mitglieder der KNOX-Genfamilie und den BEL1-ähnlichen Proteinen JUBEL1 und JUBEL2 aus Gerste wurden deletierte Derivate der Proteine im Hefe Two-Hybrid System auf Interaktionen getestet.

BKN1, BKN3 und BKN7 bilden im Two-Hybrid System sowohl Homodimere als auch Heterodimere (siehe 3.4.1.). Interaktionsstudien mit sukzessiven N-terminalen Deletionsderivaten von BKN3 zeigen, daß das Fehlen der C-terminalen vierzig Aminosäuren der KNOX-Domäne und der GSE-Box zum Verlust dieser Interaktionen führt. Bereiche N-terminal davon scheinen nicht notwendig zu sein. Das kürzeste interagierende Derivat von BKN3, BKN3(31/34), reicht vom Beginn der KNOX-Domäne bis zum Beginn der ELK-Domäne ohne diese einzuschließen. Dieses Fragment interagiert nur als Fusion an die DNA-Bindedomäne schwach mit längeren BKN3-Derivaten. Mit BKN3(31/34) als Fusion an die GAL4-Aktivierungsdomäne konnten keine Interaktionen mit BKN3 nachgewiesen werden. Eine weitere erstaunliche Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, daß die im Vergleich zu BKN3(31/34) C-terminal verlängerten Derivate BKN3(ES) und BKN3(KGEb), die zusätzlich die ELK- bzw. Teile der Homöodomäne einschließen, keine Interaktionen mit BKN3-Derivaten zeigen. Dimerisierungen von BKN3(31/34) mit BKN3(ES) und BKN3(KGEb) könnten durch inkorrekte Faltung der Fusionsproteine oder durch eine sterische Maskierung möglicher Interaktionsdomänen aufgrund der C-terminalen Verlängerungen verhindert werden. Es ist denkbar, daß noch weiter C-terminal gelegene Bereiche, wie z.B. die Homöodomäne, essentiell sind, um die für die Interaktionen benötigte Konformation sicherzustellen und damit die Assoziation zu stabilisieren. Obwohl die Expression der beteiligten Fusionsproteine in Hefe nicht durch Western-Analyse überprüft wurde, kann sie aus den in Kombination mit den JUBEL-Proteinen beobachteten Interaktionen abgeleitet werden (siehe unten).

BKN7 Δ Ncol, das die siebzehn C-terminalen Aminosäuren der KNOX-Domäne und den gesamten C-Terminus des Proteins umfaßt, interagiert im Two-Hybrid System nicht mit BKN3. Auch hier scheinen N-terminale Bereiche des Proteins für Interaktionen notwendig zu sein.

Die JUBEL-Fusionsproteine zeigen in Hefe keine Homodimerisierungen und keine Interaktionen untereinander. Da die im Two-Hybrid Screen isolierten Abschnitte beider

Proteine N-terminale Sequenzen einschließlich der vermuteten coiled-coil Domäne, nicht aber die Homöodomäne umfassen, wurde eine Beteiligung dieser Bereiche an der Interaktion mit BKN3 als gegeben vorausgesetzt. Für die Interaktionen von JUBEL1 mit BKN1 und BKN3 konnte die Interaktionsoberfläche auf die coiled-coil Domäne und flankierende Sequenzen, repräsentiert durch JUBEL1(23ES), eingegrenzt werden (siehe 3.4.2.). Die isolierte coiled-coil Domäne in Form von JUBEL1(46/130) vermittelt im Two-Hybrid System keine Assoziation. Da JUBEL1(130/107), das N-terminal mit dem coiled-coil beginnt und sich bis zum C-Terminus des Proteins erstreckt, interagiert, ist neben dem coiled-coil vermutlich vor allem der C-terminale Bereich von JUBEL1(23ES) für die Interaktionen verantwortlich.

Die Interaktionen von JUBEL1 mit BKN3 scheinen von ähnlichen BKN3-Abschnitten abzuhängen wie die Interaktionen zwischen den untersuchten KNOX-Proteinen (siehe 3.4.2.1.). Auch hier liegen notwendige Bereiche in der Differenz zwischen BKN3 Δ 3 und BKN3 Δ 4. Im Gegensatz zu den KNOX-KNOX-Interaktionen wird die Assoziation mit JUBEL1 nicht durch Bereiche C-terminal der GSE-Box verstärkt: auch in Kombination mit BKN3(31/34) und BKN3(KGEb), nicht aber mit BKN3(ES), wird eine starke Reporterexpression induziert. Das kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, daß die Anwesenheit der N-terminalen Hälfte der Homöodomäne einen negativen Einfluß auf BKN3-Interaktionen ausübt. JUBEL2 dagegen bewirkt in Kombination mit BKN3(ES) eine starke Aktivierung der β -Galaktosidaseaktivität, bindet aber, im Gegensatz zu allen anderen interagierenden Fusionsproteinen, nicht an BKN3 Δ 3. Die Interaktion von JUBEL2 mit BKN3 scheint also von dem postulierten inhibitorischen Effekt des C-terminalen Endes von BKN3(ES) unabhängig zu sein oder diesen kompensieren zu können. Die Unterschiede im Interaktionsverhalten von BD-JUBEL1(vl), BD-JUBEL1(cDNA) und BD-JUBEL1(23ES) mit AD-BKN3(31/34) sind schwer zu interpretieren. Sie können als weiterer Hinweis auf eine inkorrekte Faltung dieses BKN3-Derivates in der Fusion an die Transaktivierungsdomäne gedeutet werden.

JUBEL1 und JUBEL2 zeigen starke Interaktionen mit BKN1. Während für JUBEL2 im Two-Hybrid System keine Assoziation mit BKN7 beobachtet wurde, sind die Ergebnisse aus Koexpressionen verschiedener JUBEL1- und BKN7-Derivate überraschend. Die BD-Fusion von JUBEL1(cDNA) zeigt im Gegensatz zu BD-JUBEL1(vl) und BD-JUBEL1(23ES) keine Interaktion mit AD-Fusionen von BKN7. Die reziproken Interaktionsstudien mit BD-BKN7(+) in Kombination mit den AD-JUBEL1-Derivaten resultieren nur mit den C-terminal deletierten Fragmenten JUBEL1(23) und JUBEL1(23ES) in einer deutlichen Aktivierung der β -Galaktosidaseaktivität. Dadurch wird einerseits wieder der Unterschied im Interaktionsverhalten der beiden JUBEL-Proteine deutlich, andererseits scheinen auch in

der BKN7-JUBEL1-Interaktion inhibitorische Effekte durch Proteinabschnitte außerhalb der Interaktionsdomänen eine Rolle zu spielen (siehe 3.4.2.2.).

Grundsätzlich wird durch diese Experimente deutlich, daß negative Ergebnisse in Two-Hybrid Studien mit Mißtrauen zu beurteilen sind. Fusionsproteine können aufgrund der Fusionen oder Deletionen artifizielle Konformationen annehmen, die mögliche Interaktionsdomänen zerstören oder maskieren. So ist es auch zu erklären, daß die Ergebnisse reziproker Kombinationen zweier Fusionsproteine, d.h. des Austausches der DNA-bindenden und der Aktivierungsdomäne, nicht immer vergleichbar sind (Estojak *et al.*, 1995). Trotz dieser Einschränkungen können zusammenfassend einige Aussagen über die an den Interaktionen der untersuchten HD-Proteine beteiligten Sequenzabschnitte gemacht werden:

1. Die Interaktionen zwischen BKN1, BKN3 und BKN7 sind von Sequenzen N-terminal der C-terminalen Hälfte der KNOX-Domäne von BKN3 unabhängig. Für eine schwache BKN3-Homodimerisierung und die Assoziation mit BKN1 ist der Abschnitt, der die C-terminalen vierzig Aminosäuren der KNOX-Domäne und die Bereiche bis zum Beginn der ELK-Domäne umfaßt, ausreichend. Weiter C-terminal gelegene Sequenzen scheinen verstärkende bzw. stabilisierende Funktionen zu erfüllen.
2. Für die Interaktionen mit JUBEL1 und JUBEL2 ist die unter 1.) genannte Domäne von BKN3 ausreichend. Weiter C-terminal gelegene Abschnitte haben keinen Einfluß auf die Stärke der Interaktion.
3. Bereiche um die vermutete coiled-coil Domäne der JUBEL-Proteine sind für die Interaktionen mit BKN1 und BKN3 notwendig und ausreichend.

Darüber hinausgehende Interpretationen sind problematisch, da es sich, beispielsweise bei den angenommenen inhibitorischen Effekten, um Artefakte des Two-Hybrid Systems handeln könnte. Dennoch bieten die beobachteten Unterschiede im Interaktionsverhalten der untersuchten Proteine einen Einblick in mögliche Mechanismen der Genregulation durch Multiproteinaggregate (siehe 4.4.).

4.4 Interaktionsdomänen der TALE-Superklasse der HD-Proteine

Von den hier als Domänen bezeichneten Sequenzabschnitten der untersuchten HD-Proteine wird nur der durch die Homöobox kodierte Bereich durch seine Funktion als sequenzspezifische DNA-Bindedomäne definiert. Die postulierte coiled-coil Domäne der JUBEL-Proteine und die KNOX-, GSE- und ELK-Domänen der KNOX-Proteine wurden als Strukturelemente mit signifikanten Homologien zu entsprechenden Abschnitten verwandter

Gene identifiziert. Der ELK-Domäne wird eine mögliche Rolle als α -helikale Dimerisierungsdomäne zugeschrieben (Vollbrecht *et al.*, 1993). Die KNOX-Domäne zeigt signifikante Homologien zu Bereichen der MEIS und PBC-Proteine aus tierischen Organismen (Bürglin, 1998).

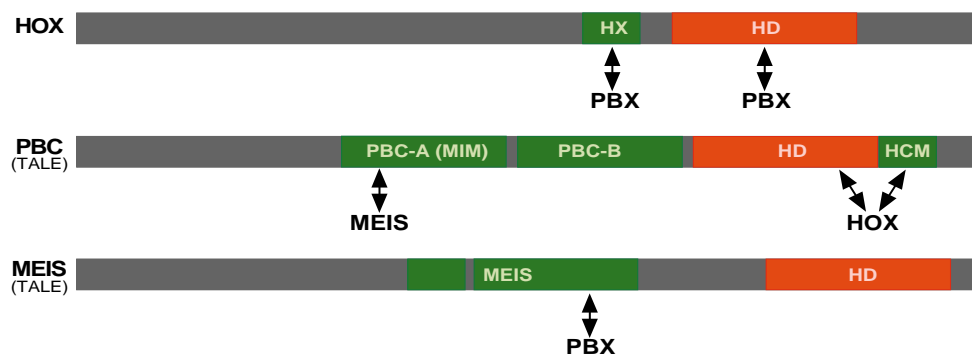
Die Interaktionsmechanismen der HD-Proteine sind allgemein sehr vielfältig. Oft dient die Homöodomäne als Interaktionsoberfläche (Li *et al.*, 1995; Mead *et al.*, 1996; Peltenburg und Murre, 1996; Zappavigna *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Meist sind aber Domänen außerhalb davon für Protein-Protein Kontakte verantwortlich (z.B.: Zeng *et al.*, 1993; Suh *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995; Pomerantz *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 1995; Lichtsteiner *et al.*, 1995; Chen und Schwartz, 1996; Copeland *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996; Kawabe *et al.*, 1997). Unter Verwendung multipler Interaktionsdomänen kann ein Protein gleichzeitig mit mehreren Partnern interagieren. Ein gut untersuchtes Beispiel liefern die Produkte der Paarungstypgene aus Hefe. Das HD-Protein MATa1 bildet mit MAT α 2, das zur TALE-Superklasse der HD-Proteine gehört, Heterodimere. Für diese Interaktion sind die Homöodomäne von MATa1 und ein C-terminaler unstrukturierter Anhang der MAT α 2-Homöodomäne ausreichend (Stark und Johnson, 1994; Li *et al.*, 1995). MAT α 2 kann außerdem mit MCM1, einem MADS-Box-Protein, interagieren, wobei eine N-terminal der Homöodomäne gelegene Region für den Kontakt verantwortlich ist (Vershon und Johnson, 1993). Beide Interaktionsdomänen von MAT α 2 sind in Abwesenheit des Interaktionspartners unstrukturiert und nehmen erst durch die Interaktion eine geordnete Konformation an. Über eine weiter N-terminal gelegene Domäne kann MAT α 2 außerdem Homodimere ausbilden (Smith und Johnson, 1992).

Die DNA-Bindenspezifitäten und Funktionen der HOX-Proteine aus Vertebraten und *Drosophila*, die klassische Homöodomänen ohne die 3 AS-Schleife besitzen, werden durch Interaktionen mit Protein-Kofaktoren moduliert. Zu diesen gehören PBC-Proteine (wie *extradenticle* (*exd*) aus *Drosophila*, und *pre-B cell homeobox1* (*pbx*)-Verwandte aus Vertebraten), die, ebenso wie MAT α 2 und die KNOX- und HD-BEL1-Gene, durch Mitglieder der TALE-Superklasse von Homöoboxgenen kodiert werden (Mann und Chan, 1996). Beispielsweise bewirkt die Interaktion von EXD mit bestimmten HOX-Proteinen eine Umkehr deren regulatorischen Potentials von einer Repression in eine Aktivierung (Biggin und McGinnis, 1997; Pinsonneault *et al.*, 1997; Viganò *et al.*, 1998). Die Interaktion erfolgt über die Homöodomäne und das N-terminal davon gelegene Hexapeptid der HOX-Proteine und über die Homöodomäne und das sogenannte "HOX Cooperativity Motif" (HCM) der PBC-Proteine (Mann und Chan, 1996; Chang *et al.*, 1997a).

MEIS-Proteine und PREP1, die ebenfalls zur TALE-Superklasse gezählt werden, sind wiederum in der Lage, mit den PBC-Proteinen zu interagieren. Diese Interaktion erfolgt über das sogenannte "MEIS Interaction Motif" (MIM) der PBC-Proteine und über die C-terminale

Hälfte der MEIS-Domäne der MEIS-Proteine (Chang *et al.* 1997b; Di Rocco *et al.*, 1997; Knoepfler *et al.*, 1997, Rieckhof *et al.*, 1997; Mann und Affolter, 1998; Berthelsen *et al.*, 1998). Auch zwischen MEIS- und HOX-Proteinen konnten Interaktionen festgestellt werden (Shen *et al.*, 1997). Das vielfältige Interaktionspotential der beschriebenen Proteine ermöglicht die Ausbildung von trimeren Proteinkomplexen oder von Multiproteinaggregaten höherer Komplexität, die in Abhängigkeit von den beteiligten Interaktionspartnern unterschiedliche DNA-Erkennungssequenzen binden (siehe Abb. 4.1.; Mann und Affolter, 1998).

Abb. 4.1. Schematische Darstellung der Interaktionsdomänen der HOX-, PBC- und MEIS-Proteine



Zwischen HOX-, PBC- und MEIS-Proteinen wurden verschiedene Interaktionen unter Beteiligung spezifischer Domänen nachgewiesen. Grüne Kästen bezeichnen konservierte Domänen innerhalb der Proteinfamilien, rote Kästen markieren die Homöodomänen. HCM: HOX-Cooperativity Motif; HD: Homöodomäne; HX: Hexapeptid; MIM: MEIS-Interaction Motif. (verändert nach Mann und Affolter, 1998)

Zwischen den MEIS-, PBC- und KNOX-Domänen der beschriebenen TALE-HD-Proteine bestehen strukturelle Gemeinsamkeiten, die auf die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferdomäne, der sogenannten MEINOX-Domäne, schließen lassen (Bürglin, 1998). Die extrem archetype TALE-Superklasse der Homöoboxgene, deren Vertreter sowohl in Tieren als auch in Pflanzen und Hefen identifiziert wurden, unterlagen während der Evolution bedeutend weniger Diversifizierung als die typischen Homöoboxgene. Die Konserviertheit der beschriebenen Domänen könnte ein Hinweis auf funktionale Parallelen sein.

Die in dieser Arbeit identifizierten Protein-Protein Interaktionen spielen sich, entsprechend den Interaktionen von PBC-, MEIS- und PREP-Proteinen, zwischen Mitgliedern der TALE-Superklasse ab. Wie in den MEIS- und PBC-Proteinen sind auch im Falle der KNOX-Proteine

Bereiche der MEINOX-Domänen an diesen Interaktionen beteiligt. Interaktionen zwischen den Produkten klassischer HB-Gene und TALE-Proteinen wurden in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen, was aber angesichts des vergleichsweise lückenhaften Wissens auf diesem Sektor ein Vorkommen derartiger Interaktionen nicht ausschließt.

Dafür konnten in Pflanzen indirekte Hinweise auf die Bedeutung von Proteinabschnitten außerhalb der Homöodomäne für ihre funktionale Spezifität gefunden werden. Die ektopische Expression verschiedener KNOX-Gene in transgenen Pflanzen verursacht geringfügig unterschiedliche Phänotypen. Durch die Überexpression hybrider Proteine aus Abschnitten von Klasse 1- und Klasse 2- KNOX-Proteinen in *Arabidopsis* wurde deutlich, daß Bereiche außerhalb der Homöodomäne an der Ausprägung genspezifischer Merkmale beteiligt sind (Serikawa und Zambryski, 1997). Sakamoto *et al.* (1999) konnten in ähnlichen Experimenten zeigen, daß der N-Terminus der Proteine nicht nur transaktivierende Funktionen ausübt. Die Expression hybrider KNOX-Gene in Tabak ermöglichte die Eingrenzung der für die Entstehung genspezifischer Phänotypen verantwortlichen Proteinabschnitte. Neben der ELK-Domäne determiniert vor allem die C-terminale Hälfte der KNOX-Domäne die charakteristischen Effekte.

Zusammenfassend kann der Schluß gezogen werden, daß sich die Vorstellungen vom Mechanismus der Genregulation unter Beteiligung von HD-Proteinen mit der Identifizierung einer schnell wachsenden Anzahl beteiligter Gene und dem Nachweis vielfältiger Interaktionen zwischen deren Translationsprodukten wandeln. Man geht inzwischen von der Bildung komplexer Multiproteinaggregate aus, deren Funktionen in Abhängigkeit von ihrer Gewebe- und entwicklungspezifischen Zusammensetzung variieren. Die Bildung dieser Komplexe wird dabei nicht nur von Protein-Protein Interaktionen bestimmt, sondern es besteht zusätzlich eine Abhängigkeit von der Anordnung der Bindestellen ihrer Komponenten auf der DNA. In Einklang mit dem "widespread binding"-Modell können Bindungspartner die Funktionen bereits DNA-gebundener Proteine durch Interaktionen mit generellen Transkriptionsfaktoren, die Maskierung von inhibitorischen oder aktivierenden Domänen oder die Modulierung der Chromatinstruktur beeinflussen (Zhang *et al.*, 1996; Biggin und McGinnis, 1997).

In diesem Zusammenhang könnten auch die geringfügigen Variationen im Interaktionsverhalten der in dieser Arbeit studierten HD-Proteine eine signifikante Rolle spielen. Unterschiedliche Affinitäten der einzelnen Proteine zueinander und sterische Maskierungen von Interaktionsdomänen in Abhängigkeit von der Anwesenheit weiterer interagierender Partner könnten die Zusammensetzung eines Multiproteinkomplexes maßgeblich beeinflussen.

4.5 *JuBel*-Überexpression in transgenem Tabak

Die ektopische Expression von *JuBel1* und *JuBel2* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in Tabak verursacht charakteristische Phänotypen der regenerierten transgenen Pflanzen. Allerdings ist die Interpretation dieser morphologischen Abweichungen vom Wildtyp aus verschiedenen Gründen mit Zweifeln behaftet.

1. Wie unter 3.8. bereits angemerkt sind die Pflanzen bisher nicht genetisch charakterisiert: Nachweise der Anwesenheit und der Expression der Transgene und ihrer Kopienzahl im Genom wurden nicht erbracht.

2. Da bisher nur die Primärtransformanten untersucht werden konnten, sind Auswirkungen der Regeneration in Gewebekultur nicht mit Sicherheit auszuschließen. Aussagen über den Einfluß der *JuBel*-Überexpression auf die Größe und den Verzweigungsgrad der Pflanzen, beides Eigenschaften, die durch die ektopische Expression von Klasse 1 KNOX-Genen verändert werden, sind nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde eine detaillierte Charakterisierung der transgenen Pflanzen bis zur Verfügbarkeit der T1-Generation zurückgestellt.

Andererseits waren Pflanzen, die parallel zu den hier beschriebenen Tabaklinien mit *JuBel1* und *JuBel2* in *antisense*-Orientierung transformiert worden waren, nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Sie zeigten weder veränderte Blatt- noch Blütenphänotypen und waren ohne Ausnahme fertil. Bei den unter 3.8. beschriebenen morphologischen Auffälligkeiten der *JuBel1*- und *JuBel2*-überexprimierenden Pflanzen handelt es sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um Effekte der Transgene.

3. Die JUBEL-Proteine wurden als N-terminal deletierte Derivate exprimiert, da die 5'-Enden beider Transkripte zum Zeitpunkt der Klonierung nicht bekannt waren (siehe 3.2. und 3.8.). In wieweit diese Deletionen die Funktionen der Proteine beeinflussen ist nicht bekannt. Der modulare Aufbau eukaryontischer Transkriptionsfaktoren spricht dafür, daß die exprimierten Bereiche der Proteine trotz der Deletionen ihre Funktionalität behalten (Ma und Ptashne, 1987; Doolittle, 1995; Chen *et al.*, 1997). Die DNA-bindende Aktivität der Homöodomäne sollte also nicht beeinträchtigt sein. Außerdem beweisen die Ergebnisse der Two-Hybrid Experimente, daß die Fähigkeit zu Protein-Protein Interaktionen, zumindest mit Klasse 1 KNOX-Proteinen, vorhanden ist. Über die funktionale Bedeutung der weiter N-terminal gelegenen Bereiche kann nur spekuliert werden. Es gibt Beispiele von Proteinen, deren Funktionen durch divergente N-Termini aufgrund alternativer Transkriptionsinitiation reguliert werden (siehe beispielsweise Tamaoki *et al.*, 1995; Tamaoki *et al.*, 1996). Das Auftreten von Phänotypen in *JuBel*-überexprimierenden Pflanzen kann als Hinweise auf eine zumindest teilweise Funktionalität der deletierten Proteine gewertet werden. Unter

Aufrechterhaltung ihrer Fähigkeit, mit anderen Proteinen und/oder DNA-Bindungsstellen zu interagieren, könnten mögliche transaktivierende Funktionen durch die N-terminalen Deletionen beeinträchtigt sein. Kompetitionen der ektopisch exprimierten, nur eingeschränkt funktionsfähigen Peptide mit verwandten Tabakproteinen könnten dominant negative Effekte verursachen (Unger *et al.*, 1993). Wahrscheinlicher ist aber, daß die Phänotypen durch funktionale JUBEL-Proteine entstehen, ebenso wie die Überexpression deletierter oder chimärer KNOX-Proteine typische Phänotypen in transgenen Pflanzen verursacht (Müller, 1997; Serikawa und Zambryski, 1998; Sakamoto *et al.*, 1999).

Bisher wurden keine Berichte zur Überexpression *BEL1*-homologer Gene in heterologen oder homologen Systemen veröffentlicht. Der in zwei 35S-*JuBel2*-transgenen Primärtransformanten beschriebene Blattphänotyp (siehe 3.8.) ähnelt dem KNOX1-transgener Pflanzen (siehe 1.5.2). Auch die ektopische Expression von *JuBel1* in Tabak verursachte in einigen Explantaten in Gewebekultur ähnliche Blattphänotypen, wobei allerdings die Blätter älterer Pflanzen im Gewächshaus nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden waren. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen KNOX- und JUBEL-überexprimierenden Pflanzen ist das Auftreten männlicher Sterilität (Müller, 1997; Tamaoki *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998). Die phänotypischen Ähnlichkeiten könnten ein Hinweis auf funktionale Interaktionen beider Genfamilien sein. Genauere Analysen der T1-Generation werden zeigen, ob in den 35S-*JuBel1*-transgenen Pflanzen morphologische Abweichungen zusätzlich zur verbreiteten Sterilität vorkommen.

Der interessanteste Aspekt der *JuBel2*-transgenen Pflanzen ist die Veränderung ihrer Blütenmorphologie (siehe 3.8.). Abnormalitäten der Infloreszenzen KNOX-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen beschränken sich meist auf eine Verkürzung von Blütenorganen (Matsuoka *et al.*, 1993, Long *et al.*, 1994), die frühe Abszision der Blüten und die Verzögerung bzw. Störung der Pollenreifung (Chuck *et al.* 1996). In Tabak treten gewellte Petalen, verkürzte Stamen, männliche Sterilität und Abszision der Knospen auf (Tamaoki *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998). Die Überexpression von *BKn3* in Tabak verursacht außerdem Petalen, die apikal nicht fusionieren und an den Rändern Anhänge tragen (Müller, 1997). Kotransgene Pflanzen, die sowohl *BKn1* als auch *BKn3* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren, tragen Blüten, deren Sepalen petaloide Charakteristika annehmen. Ektopische Organe und Sprosse, verursacht durch KNOX1-Überexpression, werden häufig auf Blättern gebildet (siehe 1.5.2.). Seltener, wie im Falle der *Hooded*-Mutation in Gerste (Müller *et al.*, 1995: Extrablüte auf Lemma) und der Überexpression von *TKn2* in Tomate (Parnis *et al.*, 1997: ektopische Sprosse auf Sepalen), entstehen epiphyllie Organe auf Blütenorganen. Die diesen Bildungen zugrundeliegende meristematische Aktivität tritt ausnahmslos auf der adaxialen (dorsalen) Seite blattähnlicher Organe auf. Auch die vermehrte Produktion von Cytokininen induziert die Entstehung von Sprossen auf der

dorsalen Blattfläche (Matsuoka *et al.*; 1993). Dies bestätigt die aus dem Studium von *Arabidopsis*- und *Antirrhinum*-Mutanten abgeleitete besondere Kompetenz der adaxialen Blattseite zur *de novo* Induktion meristematischer Identität (McConnel und Barton, 1998; Waites *et al.*, 1998; Lynn *et al.*, 1999). Im Kontrast dazu befinden sich die zusätzlichen Strukturen der *JuBel2*-überexprimierenden Pflanzen auf der dem Sproß abgewandten ventralen Seite der betroffenen Blütenorgane, wobei die ansonsten normale Ausbildung der Sepalen und Petalen unbeeinträchtigt bleibt.

Während die basale Fusion der Petalenanhänge die Idee eines zusätzlichen Blütenkreises als mögliche Interpretation attraktiv macht, erinnert das lokalisierte Auftreten ektopischen Gewebes nahe des Blütenbodens auf den Sepalen mehr an Auswüchse dieser Blütenorgane. Andererseits bilden auch die Sepalenanhänge in manchen Knospen flächige Strukturen, die Großteile der Blütenbasis umgeben können und damit einem partiellen zusätzlichen Wirtel ähneln. Eine Adaxialisierung der Petalen und Sepalen als Voraussetzung der Meristembildung auf der ventralen Seite der Organe, wie für die Mutante *Phabulosa* beschrieben (McConnel und Barton, 1998), scheint nicht vorzuliegen. Die Parallelen zum Phänotyp KNOX1-überexprimierender Pflanzen bestehen also lediglich im Auftreten zusätzlicher Strukturen, deren Zustandekommen aber einem anderen Mechanismus zu unterliegen scheint. Aufgrund ihrer Position und ihrer Morphologie entstehen die Petalen- und Sepalen-Anhänge wahrscheinlich nicht aus *de novo* gebildetem meristematischem Gewebe, sondern entsprechen möglicherweise frühen Abspaltungen der Sepalen bzw. Petalen-Primordien oder zusätzlichen Blütenwirteln. Durch genauere morphologische Charakterisierung und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen früher Entwicklungsstadien soll die Frage nach dem Ursprungs der Auswüchse auf Blüten *JuBel2*-überexprimierender Tabakpflanzen anhand der T1-Generation geklärt werden.

Es wurde in einigen Fällen beschrieben, daß durch Überexpression von KNOX-Genen verursachte Effekte in Seitentrieben bzw. ektopischen Sprossen der transgenen Pflanzen durch "Silencing" abgeschwächt werden (Müller, 1997; Sato *et al.*, 1998). Die variierende Ausprägung der Phänotypen transgener *JuBel2*-überexprimierender Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Seitentrieben derselben Pflanze scheint dagegen nicht durch Silencing verursacht zu werden. Das parallele Verschwinden und Auftauchen extremer Phänotypen in mehreren Pflanzen wird als ein Hinweis darauf gewertet, daß Umweltbedingungen einen Einfluß auf die Penetranz der Transgenwirkung ausüben könnten. Da während der Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus eine extreme Hitzeperiode durchlaufen wurde, handelt es sich eventuell um Effekte der Temperatur bzw. der Lichtintensität. Zur Bestätigung dieser Vermutung ist

die Kultivierung der T1-Generation in Klimakammern unter kontrollierten Wachstumsbedingungen geplant.

4.6 Welche Rolle spielen *JuBel1* und *JuBel2*?

Aussagen zu den Funktionen von *JuBel1* und *JuBel2* sind bisher nicht möglich. Der namensgebende Vertreter der Familie der HD-BEL1-Gene, *BEL-1*, ist an der Initiation des inneren und der Determinierung der Identität des äußeren Integuments während der Ovulenentwicklung beteiligt. Von *ATH1* ist lediglich bekannt, daß seine Expression durch Licht induziert wird. Obwohl Mitglieder einer Genfamilie oft an der Regulation ähnlicher Entwicklungsprozesse beteiligt sind, können aus den Homologien der *JuBel*-Klone zu den verwandten *Arabidopsis*-Genen keine Rückschlüsse auf ihre Funktionen gezogen werden.

Möglichkeiten der Funktionsanalyse auch in Abwesenheit von Mutanten wurden bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.5.). Eine genaue Expressionsanalyse der *JuBel*-Gene, v.a. in Form von *in situ* Hybridisierungen, wurde begonnen (siehe 3.7.). Die Verfügbarkeit polyklonaler Antiseren für JUBEL1 (siehe 3.5.) bietet außerdem die Voraussetzung zur Durchführung von Immunolokalisierungen. Des weiteren sind GUS-Expressionsstudien mit Promotorelementen beider Gene geplant.

Durch genauere Untersuchung der Phänotypen der *JuBel*-überexprimierenden Tabakpflanzen können vielleicht Hinweise darauf gefunden werden, ob die Gene, ebenso wie die KNOX-Gene, eine Rolle in der Initiation oder Aufrechterhaltung meristematischer Identität spielen. Andererseits könnten sie an der Etablierung von Grenzen zwischen entstehenden Organen beteiligt sein, was mit der Entstehung oder Abspaltung zusätzlicher Blütenwirtel vereinbar wäre. Mögliche funktionale Interaktionen mit KNOX-Proteinen sollen anhand von kotransgenen Pflanzen aus Kreuzungen zwischen *BKn1*- bzw. *BKn3*-überexprimierenden Tabaklinien mit den *JuBel*-Transgenen untersucht werden.

Die Methode der Wahl zum Studium der biologischen Bedeutung von *JuBel1* und *JuBel2* wäre die Analyse des Phänotyps einer Gerstenmutante, der auf den Funktionsverlust eines der Gene zurückzuführen ist. Mit der Mutantenkollektion (Bossinger *et al.*, 1992; Bossinger *et al.*, 1993), den genetischen Karten (Castiglioni *et al.*, 1998) und den Gensequenzen sind prinzipiell alle Voraussetzungen zur Assoziation von Mutanten mit *JuBel1* oder *JuBel2* gegeben. Zu diesem Zweck werden zur Zeit die Kartenpositionen beider Gene bestimmt. Im Falle von *JuBel1* konnte durch BLAST-Suche ein RFLP-Marker

identifiziert werden, der innerhalb der kodierenden Region des Gens liegt und zentromernah auf Chromosom 4 kartiert (Locus MWG2299, Kennnummern HVU234883 und HVU234884; Altschul *et al.*, 1997). Die Kartenposition von *JuBel2* soll durch SSCP-Analyse ermittelt werden. Es bleibt abzuwarten, ob Mutanten in einem der *JuBel*-Gene in der Kollektion vorhanden sind. Die wachsende Anzahl *BEL-1*-homologer genomischer Sequenzen, die im Rahmen der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms identifiziert werden, spricht dafür, daß es sich bei den HD-BEL1-Genen um eine umfangreiche Genfamilie handelt. Dies könnte bedeuten, daß eine teilweise funktionale Redundanz zwischen den Familienmitgliedern besteht. Damit sind, wie im Falle der KNOX-Gene, die Chancen zur Identifizierung rezessiver Mutationen mit prägnanten phänotypischen Effekten gering. Wahrscheinlicher ist die Existenz auffälliger dominanter Mutanten, deren Phänotypen durch eine Misexpressionen der Gene hervorgerufen werden.

Könnte also durch die Identifizierung möglicher Protein-Protein Interaktionspartner von BKN3 mehr Licht in die Frage nach der anscheinend einzigartigen Kompetenz der Deckspelzen/Grannen-Region der Gerstenblüte gebracht werden? Eher nicht. Anstelle eines lemmaspezifischen Faktors wurden fünf vermutliche Interaktionspartner von BKN3 identifiziert, die relativ unspezifische Expressionsdomänen zu besitzen scheinen. Sollte ein derartiger lemmaspezifischer Faktor existieren, so wurde er in den bisher durchgeführten Two-Hybrid Screens noch nicht isoliert (Stichwort: Sättigung des Two-Hybrid Systems; siehe 4.1.). Vielleicht konnte dieser hypothetische Faktor mit dem BKN3-Köder nicht identifiziert werden, da er nicht direkt mit BKN3 interagiert oder da weitere Protein-Kofaktoren für die Assoziation benötigt werden. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß es diesen Faktor nicht gibt. In Einklang mit den unter 4.4. beschriebenen komplexen multiplen Interaktionsmöglichkeiten zwischen HD-Proteinen, Proteinen anderer Klassen und ihren DNA-Bindstellen könnte die Besonderheit der Deckspelzen/Grannen-Region auch unabhängig von einem solchen Faktor definiert werden. Möglicherweise besteht sie in einer lokalen einzigartigen Kombination regulatorischer Proteine, die der Schnittmenge der Expressionsdomänen verschiedener Transkriptionsfaktoren entspricht. In Kombination mit ektopisch exprimiertem *BKn3* könnte durch einen komplexen kombinatorischen Mechanismus die Expression bestimmter Zielgene induziert werden, was dann zur Ausprägung des charakteristischen *Hooded*-Phänotyps führt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung des Hefe Two-Hybrid Systems Protein-Protein Interaktionen zwischen Gerstenproteinen untersucht. Ausgangspunkt war *BKn3*, ein KNOX-Gen der Klasse 1, dessen Mutation für den dominanten homöotischen Phänotyp der Kapuzengerste verantwortlich ist.

Mit den Translationsprodukten von *BM8*, einem MADS-Box-Gen aus Gerste und *tumba*, einem möglichen Zielgen von BKN3, konnten im Two-Hybrid System keine Interaktionen nachgewiesen werden.

Zwischen BKN3 und den Klasse 1 bzw. Klasse 2 KNOX-Proteinen BKN1 und BKN7 konnten Assoziationen identifiziert werden. Die drei Proteine bilden im Two-Hybrid System Homodimere aus und heterodimerisierten in allen möglichen Kombinationen.

Durch einen Two-Hybrid Screen mit einem N-terminal deletierten BKN3-Derivat als Köder konnten Klone aus einer cDNA-Expressionsbank isoliert werden, die zwei bisher unbekannte Homöoboxgene repräsentieren. Sie gehören der HD-BEL1-Familie der Homöoboxgene an, die ursprünglich in *A. thaliana* beschrieben wurde.

Die Interaktionen zwischen BKN1, BKN3, BKN7, JUBEL1 und JUBEL2 konnten durch *in vitro* Bindungsstudien bestätigt werden.

Two-Hybrid Experimente mit deletierten Derivaten von BKN3 und JUBEL1 ermöglichten die Eingrenzung für die Interaktionen notwendiger Bereiche der Proteine.

Durch cDNA-Screens und 5'-RACE wurde vermutlich die gesamte kodierende Region von *JuBel2* identifiziert. Bezüglich des Transkriptionsstartpunktes von *JuBel1* besteht noch Unklarheit. Die Isolierung genomischer Klone lieferte Informationen über die Intron/Exon-Struktur beider Gene.

Erste Ergebnisse aus *in situ* Hybridisierungen von Gerstenpräparaten mit *JuBel1*- und *JuBel2*-spezifischen Sonden weisen auf die Expression beider Gene in jungen Blütenorganen und im vaskulären Gewebe der Infloreszenzachse hin.

JuBel1 und *JuBel2* wurden in transgenen Tabakpflanzen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors überexprimiert. Blüten- und Blattphänotypen der Primärtransformanten wurden analysiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abu-Shaar, M., Don Ryoo, H. and Mann, R. S. (1999): Control of the nuclear localization of *Extradenticle* by competing nuclear import and export signals. *Genes and Development* **13**, 935-945.

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. and Tasaka, M. (1997): Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *The Plant Cell* **9**, 841-857.

Aida, M., Ishida, T. and Tasaka, M. (1999): Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**, 1563-1570.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Altschul, S. F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller and David J. Lipman (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

Aoyama, T., Dong, C., Wu, Y., Carabell, M., Sessa, G., Ruberti, I., Morelli, G. and Chua, N. (1995): Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator *Athb-1* alters leaf cell fate in tobacco. *The Plant Cell* **7**, 1773-1785.

Azpiazu, N. and Morata, G. (1998): Functional and regulatory interactions between *Hox* and *extradenticle* genes. *Genes and Development* **12**, 261-273.

Barton et al. (1993): *Development* **119**, 823-831.

Bateson, W. (1894): Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species. (MacMillan & Co; London; New York)

Becraft, P. W., Freeling, M. (1989). Use of the scanning electron microscope to ascribe leaf regional identities even when normal anatomy is disrupted. *Maize Genet. Coop. Newsl.* **63**, 37-39

Becraft, P. W.; Freeling, M. (1994): Genetic analysis of *Rough sheath1* developmental mutants of maize. *Genetics* **136**, 295-311

Bellmann, R. and Werr, W. (1992): ZmHox1a, the product of a novel maize homeobox gene, interacts with the *Shrunken 26 feedback* control element. *EMBO* **11**, 3367-3374.

Benton, W. D. and Davis, R. W. (1977): Screening lambda gt recombinant clones by hybridisation to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.

Berg, J.M. (1990): Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **19**, 405-421.

Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavillo, F. and Blasi, F. (1998): The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO* **17**, 1434-1445.

Bertolino, E., Reimund, B., Wildt-Perinic, D., Clerc, R. G. (1995): A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J. Biol. Chem.* **52**, 31178-31188

Bevan, M. (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* **12**, 8711-8721.

Biggin, M. D. and McGinnis, W. (1997): Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development* **124**, 4425-4433.

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

Bossinger, G. (1990): Klassifizierung von Entwicklungsmutanten der Gerste anhand einer Interpretation des Pflanzenaufbaus der Poaceae aus Phytomeren. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Bossinger, G., Lundqvist, U., Rohde, W., and Salamini, F. (1992): Genetics of plant development in barley. In Barley Genetics VI. Proc. 6th. Int. Barley Genet. Symp. (ed L. Munck). pp. 989-1022. Denmark: Munksgaard Int. Publ.

Bossinger, G., Rohde, W., Lundqvist, U., Salamini, F. (1993). Genetics of barley development: Mutant phenotypes and molecular aspects. In Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology (Hrsg. Shewry, P. R.) 231-263 (CAB International, Wallingford)

Briggs, D. E. (1978). Barley (Chapman and Hall, London)

Brown, J. W. S. (1996): *Arabidopsis* intron mutations and pre-mRNA splicing. *The Plant Journal* **10**, 771-780.

Bürglin, T.R. (1997): Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* **25**, 4173-4180.

Bürglin, T.R. (1998): The PBC domain contains a MEINOX domain: Coevolution of Hox and TALE homeobox genes? *Dev. Genes. Evol.* **208**, 113-116.

Carabelli, M.; Sessa, G.; Baima, S.; Morelli, G.; Ruberti, I. (1993): The *Arabidopsis Athb-1* and *-4* genes are strongly induced by far-red-rich light. *Plant J.* **4**, 469-479.

Carr, A. and Biggin, M. D. (1999): A comparison of *in vivo* and *in vitro* DNA-binding specificities suggests a new model for homeoprotein DNA binding in *Drosophila* embryos. *EMBO* **18**, 1598-1608.

Castiglioni, P., Pozzi, C., Heun, M., Terzi, V., Müller, K. J., Rohde, W. and Salamini, F. (1998): An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA-probes in barley. *Genetics* **149**, 2039-2056.

Chalepakis, G., Goulding, M., Read, A. Strachan, T. and Gruss, P. (1994): Molecular basis of splotch and Wardenburg Pax-3 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1685- 3689

Chan, S.-K., and Struhl, G. (1997): Sequence specific RNA-binding by Bicoid. *Nature* **388**, 634.

Chan, R. L., Gago, G. M., Palena, C. M. and Gonzalez, D. H. (1998): Homeoboxes in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta* **1442**, 1-19.

Chang, C.-P., De Vivo, I. and Cleary, M. L. (1997a): The Hox Cooperativity Motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 Is necessary and sufficient for oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 81-88.

Chang, C.-P., Jacobs, J., Nakamura, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Cleary, M.L. (1997b): Meis proteins are major *in vivo* DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5679-5687.

Chen, C.Y., and Schwartz, R.J. (1996): Recruitment of the Tinman homolog Nkx-2.5 by Serum Response Factor activates cardiac α -actin gene transcription. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 6372-6384.

Chen, J., Janssen, B., Williams, A. and Sinha, N. (1997): A gene fusion at a homeobox locus: Alterations in leaf shape and implications for morphological evolution. *The Plant Cell* **9**, 1289-1304.

Chien, C.-T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991): The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9578- 9582.

Chuck, G., Lincoln, C. and Hake, S. (1996): *KNAT1* Induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**, 1277-1289.

Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. and Meyerowitz, E. M. (1996): The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-1575.

Colas, P. and Brent, R. (1998): The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *TIBTECH* **16**, 355-363.

Copeland, J. W. R., Nasiadka, A., Dietrich, B. H. and Krause, H. M. (1996): Patterning of the *Drosophila* embryo by a homeodomain-deleted Ftz polypeptide. *Nature* **379**, 162-165.

Dahlgren, R., Clifford, H. T. and Yeo, P. F. (1985): *The Families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy.* (Springer-Verlag, New York).

Damante, G., Pellizzari, L., Esposito, G., Fogolari, F., Viglino, P., Fabbro, D., Tell, G., Formisano, S. and Di Lauro, R. (1996): A molecular code dictates sequence-specific DNA recognition by homeodomain. *EMBO* **15**, 4992-5000.

DeBlock, M. and Debrouwer, D. (1996): RNA-RNA- in situ hybridization using DIG-labeled probes: the effect of high molecular weight polyvinyl alcohol on the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Nonradioactive In Situ Hybridization. Application Manual, Second Edition.* Boehringer Mannheim GmbH, 141-145.

- Devereux, J., Haeblerli, P. and Smithies, O. (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395
- Di Cristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I. and Morelli, G. (1996): The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *The Plant Journal* **10**, 493-402.
- Di Rocco, G., Mavilio, F. and Zappavigna, V. (1997): Functional dissection of a transcriptionally active, target-specific Hox-Pbx complex. *EMBO* **16**, 3644-3654.
- Dickinson, T. A. and Sattler, R. (1974): Development of the epiphyllous inflorescence of *Phyllomona integerrima* (Turcz.) Loes.: implications for comparative morphology. *Bot. J. Linnean Soc.* **69**; 1-13.
- Dickinson, T. A. (1978): Epiphyllly in angiosperms. *Bot. Rev.* **44**, 181-232
- Doolittle, R. F. (1995): The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem* **64**, 287-314.
- Dubnau, J. and Struhl, G. (1996): RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* **379**, 694-699.
- Duboule, D. and Morata, G. (1994): Colinearity and functional hierarchy among genes of of the homeotic complexes. *TIG* **10**, 358-364.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J. (1993): The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**, 555-569.
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kesseler, D.P., Sun, B. I., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1994): The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO* **6**, 749-759.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and Laux, T. (1996): The *ShHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant Journal* **10**, 967-979.
- Essers, L. and Kunze, R. (1996): A sensitive. quick and semi-quantitative LacZ-assay for the two-hybrid system. *TIG* **12**, 449-450.
- Estojak, J., Brent, R. and Golemis, E.A. (1995): Correlation of Two-Hybrid Affinity Data with In Vitro Measurements. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 5820-5829.
- Fedoroff, N. V. (1983). Comparison of host strains for cloning maize DNA into bacteriophage lambda. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**; 27-29.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983): Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**; 6-13.

- Fields, S. and Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *NATURE* **340**, 245-246.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. and Meyerowitz, E.M. (1999): Signaling in Cell Fate Decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* Shoot Meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Florence, B., Guichet, A., Ephrussi, A. and Laughon, A. (1997): Ftz-F1 is a cofactor in Ftz activation of the *Drosophila* engrailed gene. *Development* **124**, 839-847.
- Fowler, J. E.; Muehlbauer, G. J.; Freeling, M. (1996). Mosaic analysis of the *liguleless3* mutant phenotype in maize by coordinate suppression of *mutator*-insertion alleles. *Genetics* **143**, 489-503
- Fowler, J. E., and Freeling, M. (1996): Genetic Analysis of mutations that alter cell fates in maize leaves: dominant *Liguleless* mutations. *Dev. Gen.* **8**, 189-222.
- Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase pGEX fusion proteins. *Analytical Biochemistry* **210**, 179-187.
- Frank, W., Phillipps, W., Salamini, F., and Bartels, D. (1998): Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant Journal* **15**, 413-421.
- Frank, W. (1997): Dissertation, Universität zu Köln..
- Frankel, A.D. and Kim, P.S. (1991) Modular Structure of Transcription Factors: Implications for Gene Regulations. *Cell* **65**, 717-719.
- Freeling, M. (1992): A conceptual framework for for maize leaf development. *Developmental Biology* **153**, 44-58.
- Freeling; M.; Hake, S. (1985). Developmental genetics of mutants that specify knotted leaves in maize. *Genetics* **111**; 617-634
- Gasser, C.S. (1996): Homeodomains ring a *BELL* in plant development. *Trends in Plant Science* **1**, 134-135.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M. et al.(1994): Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211-223.
- Gelinas, D., Postlethwait, S. N. and Nelson, O. E. (1969): Characterization of development in maize through the use of mutants. II. The abnormal growth conditioned by the *Knotted* mutant. *Amer. J. Bot.* **56**, 671-678
- Gerber, H.-P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M., Hug, M., Rusconi, S. and Schaffner, W. (1994) Transcriptional activation Modulated by Homopolymeric Glutamine and Proline Stretches. *Science* **263**, 808-811.
- Gonzalez, D. H., Valle. E. M., and Chan, G.G. (1997): Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower. *Biochimica et Biophysica Acta* **1351(1-2)**, 137-149.

- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M. and Coupland, G. (1997): A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**, 44-51
- Granger, C. L., Callos, J. D. and Medford, J. I. (1996): Isolation of an *Arabidopsis* homologue of the maize homeobox *Knotted-1* gene. *Plant Molecular Biology* **31**, 373-378.
- Greene, B. A. and Hake, S (1993). The *Knotted-1* mutants of maize: investigating the circuitry of leaf development. *Seminars Dev. Biol.* **4**, 41-49.
- Hengen, P. N. (1997): False Positives in the yeast two-hybrid system. *TIBS* **22**, 33-34.
- Horsch, R. B., Klee, H. J., Stachel, S., Winans, S. C., Nester, E. W., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1986): Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**; 2571-2575
- Hake, S. (1992): Unraveling the knots in plant development. *TIG* **8**, 109-114.
- Hake, S. and Char, B. R. (1997): Cell-cell interactions during plant development. *Genes and Development*. **11**(9), 1087-1097.
- Hake and Freeling (1986): Analysis of genetic mosaics shows that the extra epidermal cell divisions in *Knotted* mutant maize plants are induced by adjacent mesophyll cells. *Nature* **320**, 621-623.
- Hareven, D., Gutfinger, T., Parnis, A., Eshed, Y. and Lifschitz, E. (1996): The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* **84**, 735-744.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Helm, J. (1952): Zur Ontogenese der Kapuze bei Kapuzengersten und der inflaten Spelzen beim Weizen. *Flora* **139**, 96-147
- Hertzberg, M. and Olsson, O. (1998): Molecular characterization of a novel plant homeobox gene expressed in the maturing xylem zone of *Populus tremula x tremuloides*. *Plant Journal* **16**, 285-295.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant transformation vector strategy based upon separation of vir- and T-region of *A.tumefaciens*. *Nature* **303**, 179-180.
- Jackson, D. and Hake, S. (1994): Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405-413.
- Jackson, D. and Hake, S (1999): Control of phyllotaxy in maize by the *abphy1* gene. *Development* **126**, 315-323.
- Jaffe, L., Ryoo, H.-D. and Mann, R.S. (1997): A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in *Drosophila*. *Genes and Development* **11**, 1327-1340.

Janssen, B.-J., Williams, A., Chen, J.-J., Matern, J., Hake, S. and Sinha, N. (1998): Isolation and Characterization of two knotted-like homeobox genes from tomato. *Plant Molecular Biology* **36**, 417-425.

Johnson, F.B., Parker, E. and Krasnow, M.A. (1995): extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: Role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 739-743.

Joshi, C. P., Zhou, H., Huang, X. and Chiang, V. L. (1997): Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology* **35**, 993-1001.

Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995): Multiallelic recognition: Nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.

Kano-Murakami, Y., Yanai, T., Tagiri, A., Matsuoka, M. (1993). A rice homeotic gene, *OSH1*, causes unusual phenotypes in transgenic tobacco. *FEBS-Letters* **334**, 365-368

Kawabe, T., Muslin, A. J and Korsmeyer, S. J. (1997): HOX11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. *Nature* **385**, 454-458.

Kawahara, R., Komamine, A. and Fukuda, H. (1995): Isolation and characterization of homeobox-containing genes of carrot. *Plant Molecular Biology* **27**, 155-164.

Kenyon, C. (1994): If birds can fly, why can't we? homeotic genes and development. *Cell* **78**, 175-180.

Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J. and Hake, S. (1994): Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two Classes. *The Plant Cell* **6**, 1877-1887.

Kerstetter, R. A., Laudencia-Chingcuanco, D., Smith, L. G. and Hake, S. (1997): Loss-of-function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Development* **124**, 3045-3054.

Klinge, B., Überlacker, B., Korfhage, C. and Werr, W. (1996): *ZmHox*: a novel class of maize homeobox genes. *Plant Molecular Biology* **30**, 439-435.

Knoepfler, P.S., Calvo, K.R., Chen, H., Antonarakis, S.E. and Kamps, M.P. (1997): Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14553-14558.

Korfhage, U., Trezzini, G.F., Meier, I., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1994): A plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *The Plant Cell* **6**, 695-708.

Kowenz-Leutz, E., Herr, P., Niss, K. and Leutz, A. (1997): The homeobox gene *GBX2*, a target of the *myb* oncogene, mediates autocrine growth and monocyte differentiation. *Cell* **91**, 185-195.

Krumlauf, R. (1994): *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.

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

Lamoreaux, R. J.; Chaney, W. R.; Brown, K. M. (1978). The plastochon index: a review after two decades of use. *Am. J. Bot.* **65**, 586-593

Laughon, A. (1991): DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* **30**, 11357-11367.

Laux, T., Mayer, K.F.X., Berger, J. and Jürgens, G. (1996): The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.

Lawrence, P.A. (1992): *The Making of a Fly*. Blackwell Scientific Publications Ltd.

Lawrence, P. A. and Morata, G. (1994): Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* **78**, 181-189.

Leanna, C. A. and Hannink, M. (1996): The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Research* **24**, 3341-3347.

Leavitt, R. G. (1909). A vegetative mutant and the principle of homoeosis in plants. *Botanical Gazette* **47**; 30-68

Lee, Y., Shioi, T., Kasahara, H., Jobe, S. M., Wiese, R. J., Markham, B.E. and Izumo, S. (1998): The cardiac tissue-restricted homeobox protein *Csx/Nkx2.5* physically associates with the zinc finger protein *GATA4* and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3120-3129.

Legrain, P, Dokhelar, M. C. and Transy, C: (1994): Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Research* **22**, 3241-3242.

Li, T., Stark, M.R., Johnson, A.D. and Wolberger, C. (1995): Crystal structure of the *MATa1/MAT α 2* homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* **270**, 262-269.

Li, X., Murre, C. and McGinnis, W. (1999): Activity regulation of a Hox protein and a role for the homeodomain in inhibiting transcriptional activation. *EMBO* **18**, 198-211.

Li, Y., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (1992): Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Developmental Biology* **153**, 386-395.

Lichtsteiner, S. and Tjian, R. (1995): Synergistic activation of transcription by *UNC-86* and *MEC-3* in *Caenorhabditis elegans* embryo extracts. *EMBO* **14**, 3937-3945.

Licitra, E.J. and Liu, J.O. (1996): A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12817-12821.

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. and Hake, S. (1994): A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**, 1859-1876.

Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1987): Improved Method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* **163**, 16-20.

- Long, J. A., Moan, E.I., Medford, J.I. and Barton, M.K. (1996): A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69
- Lu, P., Porat, R., Nadeau, J. A. and O'Neill, S. (1996): Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *The Plant Cell* **8**, 2155-2168.
- Lucas, W. J.; Bouché-Pillon, S.; Jackson, D. P.; Nguyen, L.; Baker, L.; Ding, B.; Hake, S. (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**; 1980-1983
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Patrick, M. and Barton, M.K. (1999): The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**, 469-481.
- Ma, J. and Ptashne, M. (1987): Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**, 847- 853.
- Ma, H., McMullen, M. D. and Finer, J. J. (1994): Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* **24**, 465-473.
- Ma, X., Yuan, D., Diepold, K., Scarborough, T. and Ma, J. (1996): The *Drosophila* morphogenetic protein Bicoid binds DNA cooperatively. *Development* **122**, 1195-1206.
- Mann, R.S., and Chan, S.-K. (1996): Extra specificity from *extradenticle*: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *TIG* **12**, 258-262.
- Mann, R. S. and Affolter, M. (1998): Hox proteins meet more partners. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**, 423-429.
- Martin, C. and Paz-Ares, J.(1997): MYB transcription factors in plants. *TIG* **13**, 67-73.
- Matsuoka, M., Ichikawa, H., Saito, A., Tada, Y., Fujimura, T. and Kano-Murakami, Y. (1993): Expression of a rice homeobox gene causes altered morphology of transgenic plants. *The Plant Cell* **5**, 1039-1048.
- Mattson, J., Söderman, E., Svenson, M., Borkid, C. and Engström, P. (1992): A new homeobox-leucine-zipper gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **46**, 71-93.
- McConnell, J. R. and Barton, M. K. (1998): Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 2935-2942.
- McGinnis, W.; Garber, R. L.; Wirtz J.; Kuroiwa, A.; Gehring W. J. (1984b). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* **37**, 403-408.
- Mead, P. E., Brivanlou, I. H., Kelley, C. M. and Zon, L. I. (1996): BMP-4-responsive regulation of dorsal-ventral patterning by the homeoboxprotein Mix.1. *Nature* **382**, 357- 360.

- Meijer, A. H., van Dijk, E. L. and Hoge, H. C. (1996): Novel members of a family of AT hook-containing DNA-binding proteins from rice are identified through their in vitro interaction with consensus target sites of plant and animal homeodomain proteins. *Plant Molecular Biology* **31**, 607-618.
- Meijer, A.H., Scarpella, E., van Dijk, E.L., Qin, L., Taal, A.J.C., Rueb, S., Harrington, S.E., McCouch, S.R., Schilperoort, R.A. and Hoge, J.H.C. (1997): Transcriptional repression by Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *The Plant Journal* **11**, 263-276.
- Meisel, L. and Lam, E. (1996): The conserved ELK-homeodomain of KNOTTED-1 contains two Regions that signal nuclear localization. *Plant Molecular Biology* **30**, 1-14.
- Meissner, R. and Theres, K. (1995): Isolation and characterization of the tomato homeobox gene *THOM1*. *Planta* **195**, 541-547.
- Mitchell, P.J. and Tijan, R. (1989): Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-378.
- Moon, Y. H., Choi, J. I., Kim, J. C., Han, J. C., Han, T. J., Cho, S. H., and Lee, K. W. (1996): *Mol. Cells* **6**, 697-703.,
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jürgens, G. and Laux, T. (1998): Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO* **17**, 1799-1809.
- Modrusan, Z., Reiser, L., Feldmann, K.A., Fischer, R.L. and Haughn, G.W. (1994): Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**, 333-349.
- Muehlbauer, G. J., Fowler, J. E., Girard, L., Tyers, R. and Freeling, M. (1999): Ectopic expression of the maize homeobox gene *Liguleless3* alters cell fates in the leaf. *Plant Physiology* **119**, 651-662.
- Müller, K. J. (1993): Untersuchungen zu homöotischen Gerstengenen der *knotted*-Familie. Diplomarbeit; Philipps-Universität, Marburg.
- Müller, K. J., Romano, N., Gerstner, O.; Garcia-Maroto, F., Pozzi, C., Salamini, F., Rohde, W. (1995): The barley *Hooded* mutation is caused by a duplication in a homeobox gene intron. *Nature* **374**, 727-730
- Müller, K. J. (1997): Die Homöoboxgene der Knox-Familie in Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Molekulare Charakterisierung, transgene Expression und Assoziationsversuche mit Homöotischen Mutationen. Dissertation; Universität zu Köln.
- Mulligan, R. M., Chory, J. and Ecker, J. R. (1997): Signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2793-2795.
- Mullinaux, R.L. and Sorge, J.A. (199??): HybriZAP(TM) Two-Hybrid Vector System for Detecting Protein-Protein Interactions. STRATEGIES in molecular biology **8**, 3-5.
- Murray, N. E. (1983). In Lambda II: Phage Lambda and molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, USA, 395-432.
- Mushegian, A. R. and Koonin, E. V. (1996): Sequence analysis of eucaryotic developmental proteins: Ancient and novel Domains. *Genetics* **144**, 817-828.

Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1992): Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.

Palena, C. M., Chan, R. L., and Gonzalez, D. H. (1997): A novel type of dimerization motif, related to leucine zippers, is present in plant homeodomain proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1352**, 203-212.

Parnis, A., Cohen, O., Gutfinger, T., Zamir, D. and Lifschitz, E. (1997): The dominant developmental mutants of tomato, *Mouse-ear* and *Curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a *Knotted* gene. *Plant Cell* **9**, 2143-2158.

Peltenburg, L. T. C. and Murre, C. (1996): Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *EMBO* **15**, 3385-3393.

Pengzhe, L., Porat, R., Nadeau, J.A. and O'Neill, S.D. (1996): Identification of a meristem L1 layer-specific gene in Arabidopsis that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *The Plant Cell* **8**, 2155-2168.

Pharis, R. P. (1985): Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 517-568.

Pinsonneault, J., Florence, B., Vaessin, H. and McGinnis, W. (1997): A model for *extradenticle* function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators. *EMBO* **16**, 2032-2042.

Plesch, G., Störmann, K., Torres, J. T., Walden, R. and Somssich, I. E. (1997): Developmental and auxin-induced expression of the Arabidopsis *prha* homeobox gene. *Plant Journal* **2(3)**, 635-47.

Poethig, R. S.; Sussex, I. M.; (1985). The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. *Planta* **165**; 158-169

Pomerantz, J.L., Pabo, C.O. and Sharp, P.A. (1995): Analysis of homeodomain function by structure-based design of a transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9752-9756

Pozzi, C. (1998): Morphological, genetic and molecular approaches to map-based cloning of berley developmental genes. Dissertation, Universität zu Köln.

Quaedvlieg, N., Dockx, J., Rook, F., Weisbeck, P. and Smeekens, S. (1995): The homeobox gene *ATH1* of *Arabidopsis* is derepressed in the photomorphogenic mutants *cop1* and *det1*. *The Plant Cell* **7**, 117-129.

QIAGEN (1995). Handbooks QIAquick™, QIAEX® und QIAGEN®Plasmid. Firmeneigene Publikationen.

Ray, A., Robinson-Beers, K., Ray, S., Baker, S.C., Lang, J.D., Preuss, D., Milligan, S.B. and Gasser, C.S. (1994): Arabidopsis floral homeotic gene BELL (BEL1) controls ovule development through negative regulation of AGAMOUS gene (AG). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5761-5765.

Reiser, L., Modrusan, Z., Margossian, L., Samach, A., Ohad, N., Haughn, G. W. and Fischer, R.L. (1995): The *BELL1* gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. *Cell* **83**, 735-742.

- Rerie, W. G., Feldmann, K. A. and Marks, M. D. (1994): The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes and development*. **8**, 1388-1399.
- Rieckhof, G.E., Casares, F., Ryoo, H.D., Abu-Shaar, M. and Mann, R. (1997): Nuclear translocation of extradenticle requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171-183.
- Rivera-Pomar, R., Niessing, D., Schmidt-Ott, U., Gehring, W.J. and Jäckle, H. (1996): RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* **379**, 746-749.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986): Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: The Pest Hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S., and Morelli, G. (1991): A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* **10**; 1787-1791
- Sakamoto, T., Nishimura, A., Tamaoki, M., Kuba, M., Tanaka, H., Iwahori, S. and Matsuoka, M. (1999): The conserved KNOX domain mediates specificity of tobacco KNOTTED1-type homeodomain proteins. *The Plant Cell* **11**, 1419-1431.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sato, Y., Hong, S.-K., Tagiri, A., Kitano, H., Yamamoto, N., Nagato, Y. and Matsuoka, M. (1996a): A rice homeobox gene, *OSH1*, is expressed before organ differentiation in a specific region during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8117-8122.
- Sato, Y., Tamaoki, M., Murakami, T., Yamamoto, N., Kano-Murakami, Y. and Matsuoka, M. (1996b): Abnormal cell divisions in leaf primordia caused by the expression of the rice homeobox gene *OSH1* lead to altered morphology of leaves in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **251** 13-22.
- Sato, Y., Sentuko, N., Nagato, Y. and Matsuoka, M. (1998): Isolation and characterization of a rice homeobox gene, *OSH15*. *Plant Molecular Biology* **38**, 983-998.
- Sato, Y., Sentoku, N., Miura, Y., Hirochika, H., Kitano, H. and Matsuoka, M. (1999): Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants. *EMBO* **18**, 992-1002.
- Schena, M. and Davis, R.W. (1992): HD-Zip proteins: members of an *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8393-8397.
- Schena, M. and Davis, R. W. (1994): Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8393-8397.
- Schindler, U., Beckmann, H. and Cashmore, A.R. (1993): HAT3.1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *The Plant Journal* **4**, 137-150.
- Schneeberger, R. G., Becraft, P. W., Hake, S. and Freeling, M. (1995): Ectopic expression of the *knox* homeo box gene *rough sheath1* alters cell fate in the maize leaf. *Genes and Development* **9**, 2292-2304.

- Schneitz, K., Hülskamp, M. and Pruitt, R.E. (1995): Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscopic study of cleared whole-mount tissue. *The Plant Journal* **7**, 731-749.
- Schneitz, K., Balasubramanian, S. and Schiefthaler, U. (1998): Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. *Trends in Plant Science* **3**, 468-472.
- Schwechheimer, C. and Bevan, M. (1998): The regulation of transcription factor activity in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 378-383.
- Scott, M. P. and Weiner, A. J. (1984): Structural relationship among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax* and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4115-4119.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochard, P., Fields, S. and Wickens, M. (1996): A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8496-8501.
- Serikawa, K. A., Martinez-Laboda, A. and Zambryski, P. C. (1996): Three *knotted1*-like homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **32**, 673-683.
- Serikawa, K. A., Martinez-Laboda, A., Kim, H.-S. and Zambryski, P. C. (1997): Localization of expression of *KNAT3*, a class 2 *knotted1*-like gene. *Plant Journal* **11**, 853-861.
- Serikawa, K. A. and Zambryski, P. C. (1997): Domain exchanges between *KNAT3* and *KNAT1* suggest specificity of the kn1-like homeodomains requires sequences outside of the third helix and N-terminal arm of the homeodomain. *Plant Journal* **11**, 863-869.
- Sessa, G., Morelli, G. and Ruberti, I. (1993): The *Athb-1* and *-2* HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO* **12**, 3507-3517.
- Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G. and Ruberti, I. (1998): The *Arabidopsis Athb-8*, *-9* and *-14* genes are members of a small family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Molecular Biology* **38**, 609-622.
- Sinha, N. and Hake, S. (1990): Mutant characters of *Knotted* maize leaves are determined in the innermost tissue layers. *Developmental Biology* **141**, 203-210.
- Singh, K. B. (1998): Transcriptional regulation in plants: The importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**, 1111-1120.
- Sinha, N. R., Williams, R. E. and Hake, S. (1993): Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes and Development* **7**, 787-795.
- Sharkey, M., Graba, Y. and Scott, M. P. (1997): *Hox* genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *TIG* **13**, 145-151.
- Shen, W.-F., Montgomery, J., Rozenfeld, S., Moskow, J., Lawrence, H., Buchberg, A. and C. (1997): *AbdB*-like *Hox* proteins stabilize DNA binding by the *Meis1* homeodomain proteins. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6448-6458.

- Simpson, G. G. and Filipowicz, W. (1996): Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* **32**, 1-41.
- Smith, L. G.; Greene, B.; Veit, B.; Hake, S. (1992). A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* **116**, 21-30
- Smith, L. G., Jackson, D. and Hake, S. (1995): Expression of *knotted-1* marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. *Developmental Genetics* **16**, 344-348.
- Smith, D. L. and Johnson, A. D. (1992): A molecular mechanism for combinatorial control in yeast: MCM1 protein sets the spacing and orientation of the homeodomains of an $\alpha 2$ dimer. *Cell* **68**, 133-142.
- Southern, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**; 503-517.
- Stark, M. R. and Johnson, A. D. (1994): Interaction between two homeodomain proteins is specified by a short C-terminal tail. *Nature* **371**, 429-432.
- Steeves, T. A. and Sussex, I. M. eds (1989): Patterns in plant development. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Stebbins, G. L.; Yagil, E. (1966): The morphogenetic effects of the hooded gene in barley. I. The course of development in hooded and awned genotypes. *Genetics* **54**, 727-741
- Stebbins, G. L.; Gupta, V. K. (1969). The relation between peroxidase activity and the morphological expression of the hooded gene in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**, 50-56.
- Suh, E., Chen, L., Taylor, J. and Traber, P. G. (1994): A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 7340-7351.
- Takatsuji, H. (1998): Zinc-finger transcription factors in plants. *CMLS* **54**, 582-596.
- Tamaoki, M., Tsugawa, H., Minami, E., Kayano, T., Yamamoto, N., Kao-Murakami, Y. and Matsuoka, M. (1995): Alternative RNA products from a rice homeobox gene. *The Plant Journal* **7**, 927-938.
- Tamaoki, M., Ichikawa, H., Kayano, T., Kano-Murakami, Y., Yamamoto, N. and Matsuoka, M. (1996): Two transcripts with different sizes derived from a rice homeobox gene, *OSH1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221**, 408-413.
- Tamaoki, M., Kusaba, S., Kano-Murakami and Matsuoka, M. (1997): Ectopic expression of a tobacco homeobox gene, *NTH15*, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* **38**, 917-927.
- Taylor, C- B. (1997): *knox*-on effects on leaf development. *The Plant Cell* **9**, 2101-2104.
- Theißen, G. and Saedler, H. (1995): MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's "biogenetic law" revisited. *Current opinion in Genetics and Development* **5**, 628-639.

- Timmermans, M. C. P., Hudson, A., Becraft, P. W. and Nelson, T. (1999): ROUGH SHEATH2: A Myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* **284**, 151-153
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborm, B., Schell, J., Steinbiss, H. H. (1987): A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5890.
- Töpfer, R., Pröls, M., Schell, J., Steinbiss, H. H. (1988). Transient expression in tobacco protoplasts: II. Comparison of the reporter gene systems CAT, NPT II and GUS. *Plant Cell Rep.* **7**, 225-228.
- Tornero, P., Conejero, V. and Vera, P. (1996): Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. *The Plant Journal* **9**, 639-648.
- Tsiantis, M., Schneeberger, R. Golz, J. F., Freeling, M., and Langdale, J.A. (1999): The maize *rough sheath2* gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science* **284**, 154-156.
- Überlacker, B., Klinge, B. and Werr, W. (1996): Ectopic expression of the maize homeobox genes *ZmHox1a* and *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *The plant cell* **8**, 349-363.
- Unger, E., Parsons, R. L., Schmidt, R. J., Bowen, B. and Roth, B. A. (1993): Dominant negative mutants of *Opaque2* suppress transactivation of a 22-kD zein promoter by *Opaque2* in Maize Endosperm Cells. *The Plant Cell* **5**, 831-841.
- Valle, E. M., Gonzalez, G., Gago, G., and Chan, R. L. (1997): *Gene* **196**, 61-68.
- Veit, B., Greene, B., Lowe, B., Mathern, J., Sinha, N., Vollbrecht, E., Walko, R., Hake, S. (1991): Genetic approaches to inflorescence and leaf development in maize. *Development Suppl.* **1** 105-111
- Vershon, A. K. and Johnson, A. D. (1993): A short, disordered protein region mediates interactions between the homeodomain of the yeast $\alpha 2$ protein and the MCM1 protein. *Cell* **72**, 105-112.
- Viganò, M. A., Di Rocco, G., Zappavigna, V. and Mavilio, F. (1998): Definition of the transcriptional activation domains of three human HOX proteins depends on the DNA-binding context. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 6201-6212.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. and Hake, S. (1991): The developmental gene *knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* **350**, 241-243.
- Vollbrecht, E.; Kerstetter, R.; Lowe, B.; Veit, B. and Hake, S. (1993). Homeobox genes in plant development: Mutational and molecular analysis. Evolutionary Conservation of Developmental Mechanisms. (Hrsg. Spading, A. C.); 111-123 (New York: Wiley-Liss).
- Waites, R., Selvadurai, H. R. N., Oliver, I. R. and Hudson, A. (1998): The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor Involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**, 779-789.
- Wang, Z., Whitfield, M.L., Ingledue III, T.C., Dominski, Z. and Marzluff, W.F. (1996): *Genes and Development* **10**, 3028-3040.

Williams-Carrier, R. E., Lie, Y. S., Hake, S. and Lemaux, P. G. (1997): Ectopic expression of the maize *kn1* gene phenocopies the *Hooded* mutant of barley. *Development* **124**, 3737-3745.

Weng, G., Bhalla, U. S., and Iyengar, R. (1999): Complexity in biological signaling systems. *Science* **284**, 92-96.

Yagil, E.; Stebbins, G. L. (1969). The morphogenetic effects of the hooded gene in barley. II. Cytological and environmental factors affecting gene expression. *Genetics* **62**; 307-319

Yu, Y., Li, W., Su, K., Yussa, M., Han, W., Perrimon, N. and Pick, L. (1997): The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the Drosophila homeodomain protein Ftz. *Nature* **385**, 552-555.

Zappavigna, V., Falciola, L., Citterich, M. H., Mavilio, F. and Bianchi, M. E. (1996): HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO* **15**, 4981-4991.

Zeng, W.; Andrew, D. J.; Mathies, L. D.; Horner, M. A.; Scott, M. P. (1993). Ectopic expression and function of the Antp and Scr homeotic genes: the N-terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development* **118**; 339-352

Zhang, M., Catron, K.M., and Abate-Shen, C. (1996): A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: Residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1764-1769.

7. Anhang

7.1 Klonierungen

BKn3-KONSTRUKTE

cBK_n3 diene als Matrize für alle PCR-Amplifikationen.

<i>BKn3</i>	pKS	<i>BKn3</i> wurde als <i>Bam</i> HI-Fragment aus pACT2- <i>BKn3</i> isoliert und in den entsprechend geschnittenen pKS umkloniert.
	pACT2*	JM5 (5', <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
	pAS2*	JM5 (5', <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
<i>BKn3Δ1</i>	pACT2*	JM3 (5', <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
	pAS2*	JM3 (5', <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
<i>BKn3Δ2</i>	pKS	<i>BKn3Δ2</i> wurde als <i>Bam</i> HI-Fragment aus pACT2- <i>BKn3Δ2</i> isoliert und in den entsprechend geschnittenen pKS umkloniert.
	pACT2*	JM16 (5', <i>Bam</i> HI) JM 8 (3', <i>Bam</i> HI)
	pBD-GAL4 Cam*	JM34 (5', <i>Eco</i> RI) JM4 (3', <i>Xba</i> I)
<i>BKn3Δ3</i>	pACT2*	JM15 (5' <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
	pAS2*	JM15 (5' <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
<i>BKn3Δ4</i>	pAD-GAL4*	JM125 (5', <i>Eco</i> RI) JM128 (3', <i>Xba</i> I)
	pACT2*	JM14 (5', <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
	pBD-GAL4 Cam*	JM125 (5', <i>Eco</i> RI) JM128 (3', <i>Xba</i> I) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>Eco</i> RI-Verdau in <i>Eco</i> RI/ <i>Sma</i> I-linearisierten pBD-GAL4 Cam ligiert.
	pAS2*	JM14 (5', <i>Bam</i> HI) JM8 (3', <i>Bam</i> HI)
<i>BKn3Δ5</i>	pAD-GAL4*	JM126 (5', <i>Eco</i> RI) JM128 (3', <i>Xba</i> I)
	pBD-GAL4 Cam*	JM126 (5', <i>Eco</i> RI) JM128 (3', <i>Xba</i> I) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>Eco</i> RI-Verdau in <i>Eco</i> RI/ <i>Sma</i> I-linearisierten pBD-GAL4 Cam ligiert.
<i>BKn3Δ6</i>	pAD-GAL4*	JM127 (5', <i>Eco</i> RI) JM128 (3', <i>Xba</i> I)
	pBD-GAL4 Cam*	JM127 (5', <i>Eco</i> RI) JM128 (3', <i>Xba</i> I) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>Eco</i> RI-Verdau in <i>Eco</i> RI/ <i>Sma</i> I-linearisierten pBD-GAL4 Cam ligiert.
<i>BKn3</i> (31/34)	pAD-GAL4*	JM34 (5', <i>Eco</i> RI) JM31 (3', <i>Bam</i> HI, kompatibel zu <i>Bgl</i> II-Schnittstelle des Vektors)
	pBD-GAL4 Cam*	JM34 (5', <i>Eco</i> RI) JM31 (3', blunt)
<i>BKn3</i> (KGEb)	pBD-GAL4 Cam*	JM34 (5', <i>Eco</i> RI) JM129 (3', blunt)
<i>BKn3Δ2</i> (ES)	pAD-GAL4*	Das <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I-Fragment aus pBD- <i>BKn3Δ2</i> wurde in die entsprechenden Schnittstellen von pAD-GAL4 umkloniert.
	pBD-GAL4 Cam*	pBD- <i>BKn3Δ2</i> wurde mit <i>Sal</i> I geschnitten und religiert.
<i>BKn3Δ2</i> (EP)	pAD-GAL4*	Das <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I-Fragment aus pBD- <i>BKn3Δ2</i> wurde in die entsprechenden Schnittstellen von pAD-GAL4 umkloniert.
	pBD-GAL4 Cam*	pBD- <i>BKn3Δ2</i> wurde mit <i>Pst</i> I geschnitten und religiert.

BKn1-KONSTRUKTE

cBKn1 diene als Matrize für alle PCR-Amplifikationen.

<i>BKn1</i>	pACT2*	JM18 (5', <i>Bam</i> HI) JM20 (3', <i>Bam</i> HI)
	pAS2*	JM18 (5', <i>Bam</i> HI) JM20 (3', <i>Bam</i> HI)
<i>BKn1Δ2</i>	pACT2*	JM32 (5', <i>Bam</i> HI) JM20 (3', <i>Bam</i> HI)
	pAS2*	JM19 (5', <i>Bam</i> HI) JM20 (3', <i>Bam</i> HI)

BKn7-KONSTRUKTE

cBKn7/GA3-55 diene als Matrize für alle PCR-Amplifikationen.

<i>BKn7(+)</i>	pACT2*	JM23 (5', <i>Bam</i> HI) JM24 (3', <i>Bam</i> HI)
	pAS2*	JM23 (5', <i>Bam</i> HI) JM24 (3', <i>Bam</i> HI)
<i>BKn7ΔNcoI</i>	pACT2*	pACT2- <i>BKn7(+)</i> wurde mit <i>NcoI</i> geschnitten und religiert.
	pAS2*	pAS2- <i>BKn7(+)</i> wurde mit <i>NcoI</i> geschnitten und religiert.

BM8-KONSTRUKTE

BM8/M33 diene als Matrize für alle PCR-Amplifikationen.

<i>BM8</i>	pACT2*	JM6 (5', <i>Bam</i> HI) JM 7 (3' <i>Sall</i>)
	pAS2*	JM6 (5', <i>Bam</i> HI) JM 7 (3' <i>Sall</i>)

tumba-KONSTRUKTE

cTumba diene als Matrize für alle PCR-Amplifikationen.

<i>tumba</i>	pACT2*	4285 (5', <i>Bam</i> HI) JM1 (3', <i>Sall</i>)
	pAS2*	4285 (5', <i>Bam</i> HI) JM1 (3', <i>Sall</i>)

JuBel1-KONSTRUKTE

<i>JuBel1</i> (v1)	pAD-GAL4*	<i>JuBel1</i> (v1) wurde durch Verdau mit <i>XbaI</i> und partiellen Verdau mit <i>XhoI</i> aus pRT- <i>JuBel1</i> (v1) isoliert und in mit <i>Sall</i> und <i>XbaI</i> -geschnittenen pAD ligiert (<i>Sall</i> und <i>XhoI</i> haben kompatible Enden).
	pBD-GAL4 Cam*	JM132 (<i>Eco</i> RI) JM96 (3') Das PCR-Produkt wurde nach Verdau mit <i>Eco</i> RI in entsprechend geschnittenen pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) ligiert.
	pRT104***	<i>JuBel1</i> (pseudo) und <i>JuBel1</i> (cDNA) wurden aus 2 PCR-Fragmenten zu <i>JuBel1</i> (v1) zusammengesetzt. 1. PCR: Matrize: <i>JuBel1</i> (cDNA) JM114 (bindet 5' im Überlapp von <i>JuBel1</i> (23) und <i>cJuBel1</i> . Durch stummen Basenaustausch wurde eine <i>NheI</i> -Schnittstelle generiert. Außerhalb davon liegt zusätzlich eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle). JM107 (3', <i>XbaI</i>) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden <i>NcoI</i> - und <i>XbaI</i> -Schnittstellen in entsprechend verdauten pRT104 integriert. Das entstandene Plasmid wurde durch Verdau mit <i>NcoI</i> und <i>NheI</i> linearisiert. 2. PCR: Matrize: <i>JuBel1</i> (pseudo) JM106 (5', <i>NcoI</i>) JM46 (3' im Überlapp von <i>JuBel1</i> (23) und <i>JuBel1</i> (pseudo), <i>NheI</i> , siehe oben) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden <i>NcoI</i> und <i>NheI</i> -Schnittstellen in den linearisierten pRT-PCR ligiert.

<i>JuBel1</i> (v1)	pBIN19	Die <i>HindIII</i> -Kassette bestehend aus Promotor, cDNA, und Poly-A-Signal wurde in mit <i>HindIII</i> linearisierten pBIN19 integriert.
<i>JuBel1</i> (cDNA)	pKS	JM42 (5', <i>MunI</i>) JM66 (3', <i>MunI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden, <i>EcoRI</i> -kompatiblen <i>MunI</i> -Schnittstellen in mit <i>EcoRI</i> linearisierten pKS integriert
	pAD-GAL4*	<i>JuBel1</i> (23) und <i>cJuBel1</i> wurden durch die Kombination zweier PCR-Produkte zu <i>JuBel1</i> (cDNA) zusammengesetzt. 1. PCR: Matrize <i>cJuBel1</i> JM50 (Bindet 5' im Überlapp von <i>JuBel1</i> (23) und <i>cJuBel1</i> . Durch stummen Basenaustausch wurde eine <i>NheI</i> -Schnittstelle generiert. Außerhalb davon liegt zusätzlich eine <i>SalI</i> -Schnittstelle). JM47 (3' am TGA-STOP-Kodon, <i>BglII</i>) Das 1. PCR-Produkt wurde über die flankierenden <i>SalI</i> - und <i>BglII</i> -Schnittstellen in entsprechend verdauten pAD-GAL4 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde durch Restriktionsverdau mit <i>SrfI</i> (schneidet im 5'-Polylinker, kompatible Enden mit <i>SmaI</i>) und <i>NheI</i> geöffnet. 2. PCR: Matrize <i>JuBel1</i> (23) JM48 (5', <i>SrfI/SmaI</i>) JM46 (3' im Überlapp von <i>JuBel1</i> (23) und <i>cJuBel1</i> , <i>NheI</i> , siehe oben) Das 2. PCR-Produkt wurde über die flankierenden <i>SmaI</i> und <i>NheI</i> -Schnittstellen in den mit <i>SrfI</i> und <i>NheI</i> geschnittenen pAD-PCR1 ligiert.
	pBD-GAL4 Cam*	JM42 (5', <i>MunI</i>) JM66 (3', <i>MunI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden, <i>EcoRI</i> -kompatiblen <i>MunI</i> -Schnittstellen in mit <i>EcoRI</i> linearisierten pBD-GAL4 Cam integriert
	pGEX1**	JM42 (5', <i>MunI</i>) JM66 (3', <i>MunI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden, <i>EcoRI</i> -kompatiblen <i>MunI</i> -Schnittstellen in mit <i>EcoRI</i> linearisierten pGEX1 integriert
<i>cJuBel1</i>	pUC	Das cDNA-Insert wurde mittels <i>EcoRI</i> -Verdau aus dem λ -Klon isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen von pUC inseriert.
<i>JuBel</i> (EX)	pAD-GAL4*	Das <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment wurde durch Restriktionsverdau aus pRT- <i>JuBel1</i> (v1) isoliert und in entsprechend geschnittenen pAD ligiert.
	pBD-GAL4 Cam*	Das <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment wurde durch Restriktionsverdau aus pRT- <i>JuBel1</i> (v1) isoliert und in entsprechend geschnittenen pBD ligiert.
<i>JuBel1</i> (130/107)	pAD-GAL4*	JM130 (5', <i>EcoRI</i>) JM107 (3', <i>XbaI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA)
	pBD-GAL4 Cam*	JM130 (5', <i>EcoRI</i>) JM107 (3', <i>XbaI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>EcoRI</i> -Verdau in <i>EcoRI/SmaI</i> -linearisierten pBD-GAL4 Cam ligiert.
<i>JuBel1</i> (131/107)	pAD-GAL4*	JM131 (5', <i>EcoRI</i>) JM107 (3', <i>XbaI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA)
	pBD-GAL4 Cam*	JM131 (5', <i>EcoRI</i>) JM107 (3', <i>XbaI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>EcoRI</i> -Verdau in <i>EcoRI/SmaI</i> -linearisierten pBD-GAL4 Cam ligiert.
<i>JuBel1</i> (23)	pAD-GAL4*	Im Zwei-Hybrid-System aus der HybriZap(cDNA)-Bank isolierter Klon. (cDNA-Fragmente wurden über flankierende <i>EcoRI/XhoI</i> -Schnittstellen in pAD-GAL4 kloniert.)
	pBD-GAL4 Cam*	Das Insert aus pAD- <i>JuBel1</i> (23) wurde über <i>SalI</i> - und partiellen <i>EcoRI</i> - Verdau isoliert und in pBD kloniert.
	pKS	Das Insert aus pAD- <i>JuBel1</i> (23) wurde über <i>XhoI</i> - und partiellen <i>EcoRI</i> - Verdau isoliert und in pKS kloniert
	pGEX1**	JM42 (5', <i>MunI</i>) JM43 (3', <i>MunI</i>) Matrize: pAD- <i>JuBel1</i> (23) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden, <i>EcoRI</i> -kompatiblen <i>MunI</i> -Schnittstellen in mit <i>EcoRI</i> linearisierten pGEX1 integriert.
<i>JuBel1</i> (23ES)	pAD-GAL4*	pAD- <i>JuBel1</i> (23) wurde mit <i>EcoRI</i> verdaut und religiert.
	pBD-GAL4 Cam*	Das <i>EcoRI/SalI</i> -Fragment aus pBD- <i>JuBel1</i> (23) wurde in entsprechend geschnittenen pBD-GAL4 Cam ligiert.

<i>JuBel1</i> (46/130)	pAD-GAL4*	JM130 (5', <i>EcoRI</i>) JM46 (3', <i>NheI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>EcoRI</i> -Verdau in <i>EcoRI/SmaI</i> -linearisierten pAD-GAL4 ligiert.
	pBD-GAL4 Cam*	JM130 (5', <i>EcoRI</i>) JM46 (3', <i>NheI</i>) Matrize pAD- <i>JuBel1</i> (cDNA) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung und <i>EcoRI</i> -Verdau in <i>EcoRI/SmaI</i> -linearisierten pAD-GAL4 ligiert.
<i>JuBel1</i> (in situ)	pKS	JM89 (5', <i>BamHI</i>) JM90 (3', <i>SalI</i>) Matrize: <i>JuBel1</i> (cDNA)
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-1	pKS	AP2 (5' Adapter-Primer des Marathon™ Kits von Clontech) JM91 (3' genspezifischer Primer) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung über die in der PCR mit <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase generierten stumpfen Enden in mit <i>SmaI</i> linearisierten pKS ligiert.
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-5	pCR®2.1	NUP (5'-Primer des SMART™ Kits von Clontech) JM92 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-10	pCR®2.1	NUP (5'-Primer des SMART™ Kits von Clontech) JM92 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-13	pCR®2.1	NUP (5'-Primer des SMART™ Kits von Clontech) JM92 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-17	pCR®2.1	NUP (5'-Primer des SMART™ Kits von Clontech) JM92 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-21	pCR®2.1	NUP (5'-Primer des SMART™ Kits von Clontech) JM92 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.
<i>JuBel1</i> 5'- RACE-23	pCR®2.1	NUP (5'-Primer des SMART™ Kits von Clontech) JM92 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.
<i>gJuBel1</i> 87/88	pKS	JM87 (5', <i>BamHI</i>) JM88 (3', <i>SalI</i>) Matrize: <i>K</i> -Atlas genomische DNA Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung über die in der PCR mit <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase generierten stumpfen Enden in mit <i>SmaI</i> linearisierten pKS ligiert.
<i>gJuBel1</i> 95/96	pKS	JM95 (5', <i>BamHI</i>) JM96 (3', <i>SalI</i>) Matrize: <i>K</i> -Atlas genomische DNA
<i>gJuBel1</i> 34-0	pKS	Das <i>EcoRI/SalI</i> -Fragment von etwa 8kbp aus dem λ -Klon 34 wurde in entsprechend geschnittenen pKS ligiert****.
<i>gJuBel1</i> 34-1	pKS	Das 2,7kbp- <i>EcoRI</i> -Fragment aus dem λ -Klon 34 wurde in entsprechend geschnittenen pKS ligiert****.
<i>gJuBel1</i> 38-3	pKS	Das 3,8kbp- <i>EcoRI/SalI</i> -Fragment aus dem λ -Klon 38 wurde in entsprechend geschnittenen pKS ligiert****.
<i>JuBel1</i> (pseudo)	pKS	Das <i>BamHI</i> -Subfragment eines genomischen λ -Klons wurde in entsprechend linearisierten pKS ligiert

***JuBel2*-KONSTRUKTE**

<i>JuBel2</i> (cDNA)	pKS	FP1149 (λ -Primer) BP1149 (λ -Primer) Matrize: λ -cDNA-Klon Das amplifizierte λ -Insert wurde mit <i>EcoRI</i> verdaut und in entsprechend geschnittenen pKS ligiert.
	pAD-GAL4*	Das <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKS- <i>JuBel2</i> (cDNA) wurde in den entsprechend geschnittenen pAD-GAL4 ligiert.
	pBD-GAL4 Cam*	Das <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKS- <i>JuBel2</i> (cDNA) wurde in den entsprechend geschnittenen pBD-GAL4 Cam ligiert.
	pGEX1**	Das <i>EcoRI</i> -Fragment aus pKS- <i>JuBel2</i> (cDNA) wurde in den entsprechend geschnittenen pGEX1 ligiert.

<i>JuBel2</i> (cDNA)	pRT101***	JM108 (5', <i>Xho</i> I) JM109 (3', <i>Xba</i> I) Matrize: pKS- <i>JuBel2</i> (cDNA)
	pBIN	Die Kasette bestehend aus Promotor, cDNA, und Poly-A-Signal wurde in mit <i>Hind</i> III linearisierten pBIN19 integriert.
<i>JuBel2</i> (III.1)	pKS	Das Insert aus pAD- <i>JuBel2</i> III.1 wurde über <i>Sal</i> I- und <i>Eco</i> RI- Verdau isoliert und in pKS kloniert.
	pAD-GAL4*	Im Zwei-Hybrid-System aus der HybriZap-cDNA-Bank isolierter Klon. (cDNA-Fragmente wurden über flankierende <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Schnittstellen in pAD-GAL4 kloniert.)
	pBD-GAL4 Cam*	Das Insert aus pAD- <i>JuBel2</i> (III.1) wurde über <i>Sal</i> I- und <i>Eco</i> RI- Verdau isoliert und in pBD kloniert.
	pGEX1**	JM64 (5', <i>Bam</i> HI) JM65 (3', <i>Eco</i> RI) Matrize: pAD- <i>JuBel2</i> (III.1) Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden, <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RI- Schnittstellen in entsprechend geschnittenen pGEX1 integriert
<i>gJuBel2</i> 84/85	pKS	JM84 (5', <i>Bam</i> HI) JM85 (3', <i>Sal</i> I) Matrize: K-Atlas genomische DNA Das PCR-Produkt wurde über seine flankierenden <i>Bam</i> HI- und <i>Sal</i> I-Schnittstellen in entsprechend geschnittenen pKS ligiert.
<i>gJuBel2</i> 1-2	pKS	Das <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I-Fragment von etwa 4,5kbp aus dem λ -Klon 1 wurde in entsprechend geschnittenen pKS ligiert****.
<i>gJuBel2</i> 13-1	pKS	Das 5,4 kbp <i>Eco</i> RI-Fragment aus dem λ -Klon 13 wurde in entsprechend geschnittenen pKS ligiert****.
<i>gJuBel2</i> 48-0	pKS	Das <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I-Fragment von etwa 7kbp aus dem λ -Klon 48 wurde in entsprechend geschnittenen pKS ligiert****.
<i>JuBel2</i> (in situ)	pKS	JM86 (5', <i>Bam</i> HI) JM85 (3', <i>Sal</i> I) Matrize: <i>JuBel1</i> (cDNA)
<i>JuBel2</i> 5'- RACE-32	pKS	AP2 (5' Adapter-Primer des Marathon TM Kits von Clontech) JM93 (3' genspezifischer Primer) Das PCR-Produkt wurde nach Phosphorylierung über die in der PCR mit <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase generierten stumpfen Enden in mit <i>Sma</i> I linearisierten pKS ligiert.
<i>JuBel2</i> 5'- RACE-37	pCR [®] 2.1	NUP (5'-Primer des SMART TM Kits von Clontech) JM93 (3' genspezifischer Primer) Banden wurden mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen kloniert.

Soweit nicht anders angegeben wurden PCR-Amplifikation mit den genannten Primern und DNA-Matrizen durchgeführt. Die Klonierung erfolgte über im Primer enthaltene Restriktionsschnittstellen (in Klammern) in den entsprechend geschnittenen Vektor. PCR-Reaktionen, deren Produkte zur Klonierung bestimmt waren, wurden grundsätzlich mit *Pfu*-DNA-Polymerase durchgeführt, da diese sich im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase durch eine geringere Fehlerfrequenz auszeichnet und glatte DNA-Enden erzeugt. Alle Konstrukte wurden durch Restriktionsanalyse getestet. Die Fehlerlosigkeit klonierter PCR-Produkte wurde außerdem durch Sequenzanalyse kontrolliert.

- * Alle Konstrukte wurden als Fusionen der cDNA-Fragmente an die DNA-bindende bzw. an die Transaktivierungsdomäne von GAL4 im entsprechenden Leseraster hergestellt.
- ** Alle Konstrukte wurden als GST-Fusionen der cDNA-Fragmente im entsprechenden Leseraster hergestellt.
- *** Die cDNA-Sequenzen wurden in *sense*-Orientierung zwischen 35S-Promotor und Poly-A-Signal der pRT-Vektoren integriert. Die gesamte Kasette, bestehend aus Promotor, cDNA, und Poly-A-Signal, wurden dann in die *Hind*III-Schnittstelle im T-DNA-Bereich von pBIN19 integriert.
- **** Die Klone stammen aus dem genomischen Screen der *CalC15* genomischen Bank in λ EMBL3.

7.2 Sequenzen

Hier werden die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen mit Ausnahme der cDNA-Sequenzen von *JuBel1* und *JuBel2* (siehe 3.2.1. und 3.2.2.) aufgeführt. Die vermutete Proteinsequenz von *cBKn7* wurde angegeben, wobei vermutliche Start- bzw. Stop-Kodons durch Fettdruck hervorgehoben sind. In den genomischen Sequenzen von *JuBel1* und *JuBel2* wurden angenommene Exonsequenzen durch Fettdruck kenntlich gemacht.

7.2.1 *cBKn7* (GA3-55)

TTGGTAGCAGCGCAACCGCGTGCCCTCTCGTTCCCAATAATTCCATTTACAATTGATTGATCAATATGATCA
 TCATCATCATCATAGTCCCGCTGCAGGATACATATCCATCCTGCCAGTAGTTACACTGGAAGGCAGTGATCATC
 CTGCCAACAAATCATCTACCTAATTCATCTCGCCAAGAACCCAAAAATCCAAAAAGAAAAAGAAAAACAACAA
 CAAACAAACAAACAGACAGGAAGATGACTAGAGTAGCTAGTACTCCATCTCCATCCATCCATGAGGGAGGAAGCT
 TCCGATCAATCAATGTGATCGATCGAATCATAACATGTTGTATAGGTGAATATGCATTACCTGGCCAAGAGCTTG
 ATTAATTCAGCTACAAGGCGGCTGAGGCGTCTTCGGCCGTGAAGATCTGGTTGTAGGAGTCGCCATCTCATGC
 ACCATGAGCTTCTCGACGGTGACGGCGGCGTGGTGGCGTTGTTGAAAAGGTACACGCCTGCGGGCGGTAG**ATG**
 M

GCCTCCGTGCGGTACACCCTCGACGTTGCCGTGGACCTGCCACCC**ATG**GCGAAGCTCTCCACGATCGAGTGGTCC
 A S V G Y T L D V A V D L P P M A K L S T I E W S

ACCAACACCCAAGGCAGCAGCAGCGGATACATACGAAGCGGGAGCTATAGCCCGCGCGCAGGCCTGTTGCGCC
 T N T Q G S S S G Y I R S G S Y S P R A Q A C S A

ATGGCGTACCAGTACCACCACCAGGACCACGCGCTGGGGATGGACGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGGGG
 M A Y Q Y H H H Q D H A L G M D A A A A A A A G G

AACCTGGCGGGCGGGCTTCGCGCGGGCTTAAGCGCGGGCGCGTGGGAGGGGAGAAGGGCGGCTCGAG
 N P G G G G F A P G L S A G G A W E G E K A A V E

GCGACCCGCTGTACGAGCGGCTGCTGGAGGCGCACGTCGCCTGCCTCCGCGTCCACACCCCGTCCGACAGCTC
 A H P L Y E R L L E A H V A C L R V A T P V D Q L

CCCCGATCGACGCGCAGATCGCCGCGCGCCCCGCTCCCATGCCCCCGCCAGCGGCTCTCCGGCGGGCAG
 P R I D A Q I A A R A P P P M P P A S A L S G G E

GAGCTCGACCTTTCATGACACACTACGTGCTCCTCCTGTTCCTTCAAGGAACAGCTCCAGCAGCATGTGCGC
 E L D L F M T H Y V L L L C S F K E Q L Q Q H V R

GTCCACGCCATGGAAGCGGTGATGGCTTGCTGGGAGCTCGAGCAGACTTTACAGAGTCTTACAGGGGCATCTCCT
 V H A M E A V M A C W E L E Q T L Q S L T G A S P

GGCGAAGGCACCGGGCAACTATGTCTGATGATGAAGACAACCCGGTCCGACAGCGAGAGCAACATGTTCCGACGGA
 G E G T G A T M S D D E D N P V D S E S N M F D G

AACGACGTGTCCGATGGCATGGCTTCGGGATGCTAACCGAGGGTGAGAGATCCTTGGTCCGAGCGGTCAGGCAA
 N D V S D G M G F G M L T E G E R S L V E R V R Q

GAGCTGAAGCAGGACTTAAACAGGGGTACAGAGAAAAGCTTGTGGACATCAGGGAAGAGATACTCCGGAAGCGA
 E L K H E L K Q G Y R E K L V D I R E E I L R K R

AGGGCCGGGAAGCTCCCGGAGACACGGCGTCCACCTTGAAGGCTTGGTGGCAAGCCACGCGAAATGGCCGTAC
 R A G K L P G D T A S T L K A W W Q A H A K W P Y

CCAAGTGAAGGAGACAAGGCGGGCTGGTGCAGGAGACGGGGCTGCAGCTGAAGCAGATCAACAAGTGGTTCATC
 P T E E D K A R L V Q E T G L Q L K Q I N N W F I

AACCAGCGCAAGCGGAAGTGGCACAGCAACCCGACCTCGTCTCGTCCGACAAGAGCAAGAGAAAAAG**GTG**ACGG
 N Q R K R N W H S N P T S S S S D K S K R K R

CAACGCGGAGCAGTCTGGTAGGGCGGGGAGACGAAGAACGATCGAACCCGTTGTATGTACATAGCGCTTCCA
 CTTGGAGAAGGCTTGATATATTTATGGTCCGGGGAGACACGACACGACGCGACGGCGGTCATTTGCGCCGGAGT
 TCGTCTCCAGACCTCAACACCGTCTGTACTGTACCCAAAAAGAAAAAGAAAAACATGTAGTGGTAATGTA

7.2.2 Genomische Sequenz von *JuBel1*

```

1   TCGAAATTAA  CCCTCACTAA  AGGGAACAAA  AGCTGGTACC  GGGCCCCCCC
51  TCGAGGTCEGA  CCCATCCGGG  CGAGAGGAAT  CAAGGAAAAG  CAACGTGAGA
101 AATAAAGAAA  GAAAGAAAGA  AAGGGAAGAA  AGTAACAGGA  GTGAGGTCCC
151 CGTGTGAAGG  CCGGGGAGAA  AGAGGAATAA  CCAGAAAGCG  CTCTCCGTTT
201 CAAGATTACC  AGCGAGATTA  CGGTTCGAGCC  TCTCTCTCCC  TCTCTCTCTA
251 ATCGGGCCGA  GGGAGGCCTA  CGCTTCCTAA  TCCGGTCGTT  GGGTCAGCCA
301 TCGGGTCGAG  CTAGCCTAGC  CTAGCCATGG  CGATGGTGGC  CACTGCCCAG
351 GCCATGGCCG  GCGCGCGGGA  GAGAGAGAGA  GAGGGAGAGA  GGGACATCTT
401 TTCGACGGGG  GGCCACGGG  GGAGGGAGAT  GGCTGCACTG  CATGATCATC
451 ACTGTGCGAG  ACTAGGATCG  AGTTTGGTGC  GGGTCCAAAT  CACAGCGGCC
501 CAATAATTGA  TCGGGACGCC  ACCGGGGAAG  AAGGAAGAAG  CGAGGCAAGG
551 AGAGGAAGAA  GAAGAAACGG  GCGCCCCTCA  CCCGCTCCCA  GCGGCCGACA
601 AGGCCCGCCC  GTGGCCGCTA  TCGCGCGGCT  GGACCACCGC  GCGGCCGCGC
651 CACGATCCCC  ATCCGACGGC  CCGACAAAGA  CGCGCCAGCA  AAGGCACGCA
701 CGCACGCACG  CGAGCTAGCT  AGCTAGCACA  CCAAGCCTCC  AACCCAACCA
751 GGCCCAGGCA  GGCTCCACGG  CCCAGCCACC  TCATCTTCTC  TTCCCTTATA
801 ACCTCCCTTA  ATTAAGAAAA  ATGACTAACC  TGCCCTCTC  TGCTTTGCGA
851 TGGAGAAAAG  TCAGAGACGG  CCGGGACAAA  TGTGGCCTCC  TCCTCCTCCG
901 TTAGTGCCTT  TGTTCTCCGT  CTCTCTTTCT  CAACCGCCTC  TTAATTGCCC
951 CACTGTAAAC  GCTACAAAAA  TCAAGCTCTT  TCTCAACCCA  AAGAAAGAGA
1001 AGAAAATATC  AAGCTCGAGT  TAATCAAGTA  AGTACATCGG  GTCAACACGG
1051 ACACAAGCAA  TAAAAAAGG  GTACCCCTAC  CGGTTTAGCT  GATTATTTCAT
1101 CCGTACGGGC  TGTTAGGGGG  ATGGATTAAT  TAGGCCGGCA  TGCGACGCAC
1151 ATGAGGCATT  GCGAGAACCG  AAACAACATA  TCGAGGGTGT  AGGTCGGTCC
1201 ACGTCGATCA  GCCGGAGAAA  ATGAAAAAAT  AAAGAAAAAC  AGAGAGAGGG
1251 ACGGGAGGGT  TGCACCCACC  AGAAACTCAG  ATGTGGCTAG  CTAGGCTTAC
1301 ACTCCTTTTC  CTGTCTTTTA  AAGTATAAAA  TTTATATCTC  CTCCAAAAAT
1351 AAAGGAGGAA  CGGAGCGTGA  CGGACATGGG  GCGGGCGCCC  GTTTAAGGCA
1401 CATGAAAAAA  GGCTCGAAAT  FTGCTCAGTT  TCGAGGCATG  GTTCAATTG
1451 CTTGCCGGCC  CGGGCCCTTT  CAAGTGCTGG  TCAATTTTGA  AATGAAAAAG
1501 AAAAGGCTGG  AAAGACGCAG  AGAGGGACTC  CTCCAGCCTC  CTCGCTTTCC
1551 TTCCTTCTTT  TCCCTCCCAA  TCCCTCCTCC  TCCCTCCATC  TCTGCTTTAC
1601 GGCCAATTTA  TTTCTTCTGC  CGGACAATGC  AAGACACATC  TCCATGAACA
1651 TATCTGCCTG  TCATCTAGAC  ACTGATGTTA  TGTACTAGTA  ACATGACGGT
1701 TATTCTACTT  GCATATCACA  TGCCCTGCATT  AGTATATACT  TCTCCTTCG
1751 TCTTATAATG  TATAAAAAAA  CATTTTTTAC  AGACGGAGGA  AGTAATTAAC
1801 TATTGATTGT  AGGAGTGGTA  GTAACACTG  ATAATAGAGA  TCAGTGTGGA
1851 AAAAAAGGGT  GAGGGGGGGA  GAAAGCAAGG  GGAGGGAGAC  AATAAAAAAC
1901 AAGGGTACGA  CATCAGCAGC  ACCAGCAAT  AATAACTTAA  CCACAGCACA
1951 ACAACGACGC  AGATTATTAC  TTATTAATG  CGCAAAGCAG  AAAAAAGAA
2001 TGAAAAGGGG  AGGGGGGATA  CCAAAGGAGG  AGAGAGGGTG  ACAACAGCGA
2051 CGTTTTCCCTA  AGACCCAGCG  CTCCTTAA  CCTCGGGCTC  TGTTCAATTC
2101 CGATACATAT  CATCAGCAGC  GCGCCCGCG  GCAGGAGGGA  TCAGCAGCAG
2151 AGCCCGCAGCA  CGCAGCAGC  CACAAACACT  GAGAGTTTTT  TTTTATAAAG
2201 CGAGCTGCAC  CGGGGTGTAT  ATTAGCTCC  TCCCTCCTCC  CCTTTGCGTC
2251 GCTCTTCCCT  TTCAGAAAGG  GATTGCACAA  GGCGACCAAG  AACTGTGTCT
2301 TCGCCCGACC  GGACAAGGGG  AAAAAATACA  GAGATAGCCA  CCCACCCAG
2351 AGAGAGGGAG  AGATAAAGAG  ATTTGAGAG  GGAGGGAGAC  AAGCCGAGAC
2401 AGAGATGGTG  GCGAGGAGGT  CTCCCGGAGG  CAAGCCTTTC  ACTCCCTCCA
2451 CGAGATAACG  ATGTGCTCCT  CCTCCTCCTC  ATCTTCTCTC  TAGGTAAGTG
2501 AAACGCAAAA  AAGCTAAGCT  ATATCTGCTG  GCTATAGCCA  GCCAGCCAGC
2551 CAGCGCGTTC  GATTCGATCG  ATCGATCGAG  CTGTTTCATG  GTAATTCGAT
2601 CGACTGGGTG  TTGAGGAGTT  AATTTGGGAG  GGAGATTGAC  ATCTTTTTTT
2651 TTTTATTTTG  TTTCAAGTTC  TTTTCTATGG  TTTTGGATTA  TTCTTGATTG
2701 TTTTTTGATG  CATGGGTTCT  TCTTCTTCTT  TTTTTTCTCT  TTCTGATGGT
2751 TGTGCCGAC  GAACCTGTCA  GTTTGTGCTG  TGCGCGCGCG  TCGCGCGGAG
2801 AGGGGATTTT  TTTTCTTTGC  GCCGACGACC  AGACGACGAT  GATGACAGTG
2851 GCGCCGCCAG  TATGGGGATA  GCGGCGCCAC  CGTGTCAAGG  GACCAGGCAG
2901 CACGTGAGCA  CGCCCAAGAG  CAGTGCAGCG  ATCCAGGACG  ACGCCCGGCC
2951 GGCCACGGCG  AGTTCTATGT  CCCACTCCCA  GGGATTCCAC  CAGGGCAGCA
3001 GCGGCCTCTA  TGCTTCTCC  TCGGATGGCT  TCGACCCGCC  GGGATCCAGC
3051 CAGGACCAGC  AGCATCAAGA  GCACGACCAC  GTGGCGCAGC  AGAGCCAGC
3101 AGACAAGCTC  AGGGTCCAGG  GCTTCGACCC  CGCCGCCGCC  GGCTCTTGCT
3151 CCCTATCGAT  GCGGACCAGC  ACGTCGAGCC  CGCGCCATG  TACGACCAGC
3201 CCGCCCGCCG  CGCGCCCTCC  AACATGCTCG  CCGAGATGTT  CAACTTCTCC
3251 GCCCAGACGC  CGTCGGGGCC  GTCCGCCACC  GAGCTGCTGG  CCAGCCAGAT
3301 GAACGCCAAC  TACCGCTTCG  GGTTCGGCA  GCAGGCGCGG  GGAGCGGTAG
3351 CCGGCTTGCC  CGCGCACGGC  GGTGTTGCTG  GGAGCGCCGG  GCCTCGCGCG
3401 GCTGGCGTGG  TCCTCGGCGG  GGCCAACTTA  TTAGGTGAGA  CGTCTCGGCC
3451 CAAGCAGCAA  GGCGGCATGG  CCGGCCTCGC  CACCGACCCG  GCGCGCCGGA
3501 TGCAGCTCTT  CTTGATGAAC  CCTCAGCAGC  AGCAGCAGTC  AAGTCTGTCG
3551 CCGACATCCC  CTCCGCCGTC  TGACGCGCAG  TCGGCCATCC  AGCACCAGCA
3601 GCGGTTCCAG  GCGTACGGCA  ACGCGGCGAG  CTCGTTCCGG  GGCGGCGGGG
3651 CCGGCCTGGT  GGAAGGCCAG  GGCCCTCCTC  TCTCCCTGTC  TCTCCGCTCA
3701 CAGCAGCTGG  AGATGGCGAA  GCAGGCCGAG  GAGCTAAGGG  TGAGAGACGG
3751 CGTGCTCTAC  TTCAACCAGC  AGCAGCAGCA  GCAGCAGCAG  CAGCAGGCCG
3801 CGTCGGTGCA  ACAGTCCCG  ATGGCATTGC  ACGGCCAGGT  GGGCTCCGATG
3851 GGGCAGCAGC  TCCACGTCGG  GTACGGCCCC  GCCGGGGTCG  CCGGCGTGTCT
3901 GCGCAACTCC  AAGTACACGC  GCGCGGCCCA  GGAGCTCCTC  GACGAATTTCT
3951 GCAGCGTGGG  CCGCGGGCAG  ACGATCAAGG  GAGGCGGGCG  CCGCGGCTCC

```

4001 TCGTCGAACC CTAACGCGAG CAAGGGCGGG CCCTCCAGCT CCGGCGCCGC
4051 CCAGTCGCCA TCATCGGCGT CGAAGGAGCC CCCCAGCTC TCCCCTCGCG
4101 ACCGGTTCGA GCACAGCGC AAGAAGGCCA AGCTCATCTC CATGCTCGAC
4151 GAGGCACGTA CCCACAAACA CACGCGCACT TCTCCCCATA TCCCCCTCT
4201 CTCTCTCTCT TCCTCATGCA TGCATGGTGC GATGGTCGTG TCCAAATAGC
4251 TAGCAGCTCC GGCCGGCGCG GCGGCATGGC GCCGGCAAAG TTTAGGTAGG
4301 TGCAACTTGC AAGTGCACA GACAGTAGGT AGCTGGCCGG TAGGGCTAGC
4351 TGACCAGTAC GGCCCTCGAGT CCAGCTGCTT CACAACGAAC TGGCTCTGT
4401 TTTTCTTTCT TTTTFTTTTA CTACCATACC ATGCAGGTTA GTCAGTCAGT
4451 CAGTGAGTCG GACCGGGACG TGGCATGCAC AGCGAGGCGG CCGCCAATGG
4501 CAGTGCAGCG CAGGCAGAGG TAGCTTTTTG GAGGATTGTC ACGACGCAAA
4551 CTCCAAGGGA GATATGAATC TCCAATCATA GTAGCATCCA TCCATCATCC
4601 ATCCACGGC CCCCAGCGGC CGATCCGATT TCTTTTTTGT GCGGTTGTGT
4651 GTGCCGCAAT GCCGTGATAG CAGCTGTTGC CGCAGCATTC ATCGCCCCCA
4701 TTTCTTTATG CTTGCTTGCA TGCATGGACT CTCTCTTTCC ATATGTTCTT
4751 CCCCAGCAA GGGAAAGAGA GTACGGACAC CCGTTGTGTAT TATTATATTT
4801 CCAGCCATCT CCACACACAC GCATTTGGGC TATGATTTGT GTCACGTCAC
4851 CACGTCTAAT TATCTCGTAA TATAGTATCA ATATCATACA CTACTACTCT
4901 AGTTAGTCTC TCTAGTAGCT AGCTAGTTGT ATATATATAA GGATGAACA
4951 AAATGGCTAG AGATAGATGG ATGGATGGAT AGCTCAGGTA GATTCTGTGT
5001 GGAGCTGTTA GAATTTGGCA CAGTATAGTG AGTGAGGAGG TACGAGGGGT
5051 AGCACTCACA AGTCCATGT GTCCCGGAT ACTATATATT ACTACTCTGT
5101 CTACATAATT GGAAGAGAG ATCGGCGATC AACAGCACGA GCACAGGAAC
5151 AAATCGGCAC ATGCAAGTTA GATGCCTGTG CGCATGGCTT TGCTGTTGCC
5201 AAACGGCCGT GGGCCTCAGC TCCTCTGTGT CTTCCCACCC ATTTCTCGCT
5251 CATAATTGTG CCAGCGACAC ATGCTACGCC ATGCCCATGT CTTAATTGCC
5301 CGCACCCAAA TTGTGTTTCT TCTTTTCGTG TGTGTGTGTG TGGTGGGTG
5351 GTAACCTTGA ATTTTCTTCT TCATCACAAT CCAACGACGA TCATGCATGC
5401 ATGCATGCGT CTTAATTAAT CTCTTAGTCT ATCTGCTTGT GATTTTCTCT
5451 CCATTTCTAG CTTGTTTACT TTCGTTTACT CTTGCTATAG ACTGTACTCA
5501 TAATTTACAG AACTTGGAGA TGGATCGATG TGCGTGGTTG GTTAATTAGC
5551 TCAGTCGTTG TGAATGTGTG TTTTGTGGT TCCACAGGTG GATCGGAGGT
5601 ACAACCCTA CTGCGACCAG ATGCAGATGG TGGTGAACCT CTTGCACTCG
5651 GTGATGGGGT TCGGGCGCGC GACGCCCTAC ACGGCGCTGG CGCAGAAAGGC
5701 CATGTCNCG CACTTCCGGT GCCTCAAGGA CGCCATCGCC GCGCAGCTGC
5751 GGCACACCTG CGAGCTGCTT GGGGAGAAG ACGCCGGCAC CAGCTCCGGG
5801 CTGACC AAGG GGGAGACGCC GCGGCTCCGC GCCATCGACC AGAGCCTCCG
5851 GCAGCAGCG GCCTTCCACC ACATGGGCAT GATGGAGCAG GAGGCTGGGC
5901 GGCCCCAGC CGCCTCCCC GAGCGCTCCG TCAGCATCCT CCGCTCCTGG
5951 CTCTTCGAG ACTTCCCTACA CCGTACGTA CCACCATCCA TCCATCCATC
6001 GCAATCTCT CCAACATTAT CAACTCACTG CTCCTTACC TACGCTCTAC
6051 TCCTACGTCG TTAGATGTCC ATGCAGTACA GTCGATCGAT CAGGTATTCA
6101 GGTGGGCATG CATAGCTGCG TGCATGCATG CATGCGACTG TTCTTCTCTA
6151 GGATAGACTA GCCTGGCATG CATGCATGGA GGAATTTGCA TTAGCTCTC
6201 TAGCCATGCA TGCATGGGAT CTGGCGGCGA ATGCATGCCG TTCGTCCGTC
6251 CGTCCGTGCA CATGTTAGGG GTGCTAGGAC GGTACGAGCA CTGCACCTAC
6301 CACGGGCAGC TTCTGCTTTG TTCGGCGGCC CTCTTTCCCT CCGCTCCTC
6351 CCCTCTCCCT GTTTTGGCCG TGTGCTGAT TGATGCTGCT GCGCTGCGCT GCTTTCCGAA
6401 AAGCAGTAAT TTTTCTCGAG ATCCCGGCTA AAAACCGGCT GACCGGCGCG
6451 CAGGCAGGGA CAGCGGCCAC GCCATGCCGG GCACTGTGCA TATTCCTTCC
6501 CTTTTGCCCC TCCCAGATTA CTTTCCCATC ATTGCAGAAA TTCAACTTTC
6551 TCCGCCCCAG TTTTACTGCT CCCCCCCCC CCTGCCGTT TTTAGTGGCT
6601 GCAGCAGGG TGGATGGACA CTGGCTGTCA GTCTACCTCC AGACCTCAGC
6651 TCAGGAATTC TGCTTATCTT TTTTCAAAG CTCCTCACGC GCGCGCAAAA
6701 GCCTCAGCTA TAGCCCCGCC CACCCCTGCG CTGCCATCGC CTGCTTCCAT
6751 CCTGGAGCC TTTTCTGGC TTCTGCTGCA TGCAGCATCA GCATAGCATG
6801 GGCAAGCTTG CTAGCTTTAC AAGTTCTGTT TCGCATCGTG CACGCACCAT
6851 GCCATTGCCA TGCTCTGCCG CTCTGCTGAG AGATCAAAG AATATCCATC
6901 AGATCGGAG GGGTTTATCT AGGAATCCGT TTCTTTTTGG TTTATTTCCG
6951 TCCGTGCGTG CGTGCATGCA TGCACGCGTA GGTAGGTGGA ATGGAACAAG
7001 GCATATGTTG CTCATCTGGG CAGCGCACAT ATAATTCGTA TATGATTTGT
7051 GAACAGTGCA CCGCTGCCCG CAGTGTGGT GCTGTTCCGT TGCTGTGCT
7101 GCTTGCCACT GCATGCTGCT GCTTGTGCAG TGAGGCAGCT ATCTAGAGTA
7151 GCAGGCATGA AGGAGTGCAT GCAGCCTAGC TTAATGATCA TCGGTCCGTT
7201 TTGTATTTTG CATGGAGTAT TTGTATGCT GTTGCTGATG CGTGGCTTCG
7251 TCGTGACGTG CGTGCTCAGG TACCCAGCG ACGCCGATAA GCACCTGTTG
7301 CCGAGACAGA CGGGGCTGTC CAGGAACCAG GTTTGTACCA CTTTTCTTAC
7351 CGCACTGTGC ATGCATGCAT GCATATACAT CGTATACATG GAATCTTAC
7401 AGACTTTTCT TGCGTGCGCA TGCATGGGAT GTTACACTGT TGACCATACC
7451 CTGATTTGTG TCTTTGTTCC CTTTTTCTCT TCTAGGTTTC GCATTTTGT
7501 TCTCTTCTGT TGTCTAAAAA CTTGATAGCT TCACCATTCA AAAAGAAAAA
7551 AAAACTCGAT GGCTTCACCA CTCAAAAAGA AACTTGATAG CTTCATAGTC
7601 ACACAGAGCT ATAGCATCCG TTACCCTTTA GTTTTACTTA CCGATCATGC
7651 AAGGTAACAC ATACGTAATG TGAAGTTGGG AACGGAAAGA GGAGTCGTAT
7701 ACTAAATTAC TCATAAATTG TGGAAAATCC TCAAATAGAT ACCCCGAGAA
7751 GATTTCACTG CCTAAACATT CAATCCGAGT ATAGTATGCA CAATTTACAT
7801 ATGACGCTGC AAACCTTATGT CCAAATTTG ACAATGCAGC ATTTTTTTAA
7851 CATCATGGGA TAATCAACAC GAGAAATAAAA CATAGAGAAT ACACATGTAC
7901 TTTCTTTGAT GAATAAAACT GAACAGTGTG ATGTATGGAG AAATCGATAG
7951 TGTCTCACT ATTTAAGCAA TGGCTGAATG CAATTTGTCT CTAAGAGATG
8001 AAACCTTATC CTCCATTCTA AAAGAACATG TATCTCATGC ATAGTTGTCT
8051 CCCCCAAGGC TGCCACACT CCGTTGAACA AGTGCCAGCC AATCGAGCA
8101 CTCCACAGGC TTACTTTGAT TGGCTCATGC CTCATCACTT GGCCTAGTT
8151 GTTGGCGTAA TCTGAAAATA TTAGGACCT CGTGACCTAC GGCCTAGTG
8201 CATGGCTTGT TTTCCCTCA TCGACAACAT GAGTTAGTCT TCCTACCTC

8251	AGCCATGGAT	CATAGTCTGG	TAATAGCTCA	CTATGTGATG	GCTTGCAAGC
8301	ATCTCAATAC	CCTAGCTCAT	GACTGCAAAG	CGTCGCGTCC	ATGGCCCTGC
8351	ACAACTTACC	TAAAATTTAA	GTGCAATTCT	AGAAGAAGAA	AACGACGAGG
8401	AGCGATTAAC	TTGGGTATCG	GCAGGTGGCT	AACACCTATT	TGCGCGTGAA
8451	AAGGCTTATG	GTGGGGAGGG	GTGTTGTAGT	ATGCAACTTT	GCATTTCTCC
8501	GGACATTTCT	TGTTTGTTTTG	GGTTTGAATG	TTACCACAAC	TTGAACCTTT
8551	TCCACATTTT	AATGCAATTC	ATAGTTTTTTT	TAAGAAACTT	CTTTTTTTTC
8601	ATGTTGCAAC	TTTAATTTTTT	GTGATAACTA	GGTAACACAC	CGTTTGTTC
8651	ATAGAAAATT	CAAGCAATGA	AATTATCAAA	AAGGAAATTA	GAAATGCAAA
8701	GAATAGTACA	ACACGCATTA	TAGTTGTGTG	AATGGTAAAA	ACCTAGAGGT
8751	AATGGAGGGT	GGAAATGGATG	CATGTTATAT	TGCCTTGTGA	CATTCAAGCT
8801	CAGTTATTTT	TAATAAGAAC	ATAAGTATAT	ATTATGTGGG	CTTGCATGTG
8851	CTTAGTGATG	TGGAGGGCTT	GCATGTGGTG	GAAGTGAAAA	TGGAAAGTAG
8901	AAGGGTTGCA	TACACTTGAT	GATGTGGATG	GCTTGTATGT	GCATTTAAAT
8951	CGGATCATT	ACTTTGATAA	ATAATAGTAT	AATTAACATA	CAAATGCCCG
9001	TCAATAAACA	AGAGCGATTA	AAAGTCGCTA	ATACAAAGAG	AGGCAAACT
9051	CTAATTTTCA	TCCTTAAGAA	ACTAAATTGC	ATGACAGAAT	ACTTTCTTTT
9101	TTTCCACTTG	GTTAGAATGA	TCCTATCAAA	TGCTGGTAAA	GTATAATTAAT
9151	TTATATAACA	TTTAAATGAC	AATACCCATG	CATGTTAAAT	GAAAAGTAGA
9201	AACTCTAGTC	AGTTTAAACT	GATTTTTGAG	TGAATTAATC	TATTTTCCAA
9251	TCATTTACTAC	AAATGAATGG	AAAAATCAAG	AAAAATGATC	ATATTAATTT
9301	ATATTTAATA	TGTGTGATAC	GTATGGACCN	CCNATATGCA	TATGCAANAC
9351	CATCTACTTC	AATGTAGATC	ATGTNACTTC	AATTGCAGTA	TTCTCAGCTG
9401	CATAATTGTC	CACATATANA	TTAGGCATGT	ATATGTTCTGA	AGNGTACTCT
9451	CACCTCTCTT	GCTGTTFCGAT	CATATATATA	CTTACTTTTA	TCTTGCAGTT
9501	TTTCGGAGAA	TAGCTTAGCT	TTCACTTCAC	CTATCTCTCT	TTTGTACTGT
9551	CTTCTGGGAC	GTGGTCCCTT	CACAGGTGCC	CCCTCATGCA	TGTCGTAAC
9601	AATCCATGGC	CCTCTTGGTA	CACAATTTTC	ATTTGCTGTT	TTCCTAATGC
9651	GGGACAACGC	AAACCATGCC	CCTCCCAGC	TCCCTTATCA	CGTGTCCCC
9701	TCCCGGAACT	CGTGAACAAA	CTGTGTGCGT	GTAATCGTGT	GTCATATGCA
9751	TGCTACTCTT	CCATAGGTTA	GTAACCTCGT	GTGTAACCTT	CATGCAGAGT
9801	TCCGTAGTTT	GTATGGTAGT	TTGGCAACGT	TTCCGGTAGAT	TTAATTTATG
9851	TTCAATTTGTC	AAAACAATTC	TTGTTTTAGT	CTCCGCAAAA	AAAAAAAGTA
9901	TTTCTTGGTT	TTTACGATCA	TAGGGACTGT	CAAAC'TTCTC	AGGCTGAAGT
9951	AGGCAAGTAG	CGCCTAGCAA	AGTCTTCTGT	TTAGGATCTA	ATTAACCTAC
10001	TCCCTCGTGT	AGCACCCGTAC	TTTTACTATG	TCCGGCTCTG	GCCAGTAGGT
10051	ACACCGTTTTA	TTCCAAGCAA	GACATTTAGC	TTGTTTTATGT	ATAGCTAGGA
10101	ATTGACTAGT	GAACCTACTT	TGATTTAGAC	GGAGAATCTC	TGATTTCTAAA
10151	TTTATCATTG	GGTCTAACTT	TCTCAGTCAA	TTAATTTGTTG	TTTTTCCTAAG
10201	GCTTTGATTA	CATCAACATT	GTTGAAATCG	TGTATGCATC	TGCAAAACACT
10251	TAATCAATAT	GCACTAAAT	GGTAGAGTAC	CTTCTGTGTG	ACCAATTGCA
10301	TGTGGCTTCA	TCTTGAAGCA	ACACGATCAA	TCTGGTCTCT	TTTLAGTTTAT
10351	GTGGTTTCTA	TGGACCATTA	GCTAGCTGTC	TTTGTGTTGT	GTTGAAAATT
10401	CGCTATACAA	ATAATTGAAG	TAGCTAGGAT	TTTTTTTTCT	TTTTTGCGGG
10451	CAAAGTAGCT	AGGAGCCTTG	GGGTACTTAA	CAAGTTAATA	GTGGTTTTCT
10501	AAGATAGAAA	AGCCTTTTCT	TGCTTCAGTC	AAAAATATGA	GAATAGTAAC
10551	ATAAGGTTAA	CAAAGAAAGG	AGAAAATAGC	TGCAGGACCA	AGCAGTACAG
10601	TTTAGAGTAC	ACCAAAAAATA	GCAAAAGGGA	AATTATTTTT	ACTCACAAAA
10651	CTAATTGATA	CCAAAATGGA	TCCC'TAAGTT	TCGATGATAT	ATATGCATGT
10701	GGTTTAAAGT	GCAC'TAAGTT	ATCTAATTTT	CGTACACCTA	GTCCAAC'TGC
10751	TACCTAGCTA	TATATGGTCG	AATTTTATCC	CGTTCTTCTT	GTTTTTCCAG
10801	GATAATTTTT	TGAACTTAAC	AGGATTCAAA	CAAGCCATTT	TGTCATGATA
10851	ATGGGTGACT	CTCCAATGAG	CAAAATATCT	CATCATGTCT	AGTGTATACT
10901	ATTATGTATC	TGCCAATATG	TGCGGTTCAA	ACCAATAACT	AGGACATAAT
10951	GCAAGTTTTT	TTGTGACACA	TTATAATATC	CTCGAGACCA	TGTAGAACCT
11001	ACACCTAAAT	TGGCGTGAGC	TTGCCCTTTC	AAAAGCATTT	TAGCGACTAT
11051	ATAAATGAAA	AACTAAGACA	GGTGTGGGTG	GGGAGACTGA	TAGTTAAAGT
11101	GAAATAAAAT	CAC'TGAAATG	AAAA'TTGTCT	GTCAAAACAT	TAGTTCTTAG
11151	TTATTTGGAT	GGGTATGCA	ATTTACGAT	CTACTGCTAA	AATTTATTTGT
11201	TGTTCAAGTT	GTGTTATTTA	GAACTATCCA	CTGAATCTTT	TAAAAAACAG
11251	GTACAAACTT	AGTATGTGAT	TATTC'TAAAC	TGTCCTCAT	TTATTTCTAAT
11301	AATGTACACT	TACTGTGCGG	ATTCGTAAT	AAATAAATAA	ATCTGGGAGA
11351	CTATCCCGTA	ACTATAGACT	GCGCGGATTC	CGTAATAGAA	CGTAAAACAA
11401	TTATCCAGTA	ACTATAGATG	TATAC'TTGG	GCAAGCAATT	TAGGGTTAAT
11451	CATTTTTTCC	TATGTACTCT	CTCTGTTTCT	AAATATAAGT	CTTCTTAAAA
11501	AGTCTACTAA	ATATTACATA	CGGATGTAGA	ATAAACATAT	TTTAAAGTAT
11551	AGATTCATTT	ATTTTACTTT	GTATGTTGTT	CGTAGTAAAA	TCTCTAAAAA
11601	GACTAACATT	TAGGAACCGA	GGGAGTAATT	TTCAATGGCA	TCCATGCTCAA
11651	GAAATAATGT	TAGGAGAGCC	TGGCGGTATG	ATAGTATCAA	TTTAAATTTAG
11701	TTGCTTACCA	CATACTTCTC	CGTTCCAAAA	TATAAGTCTT	CTTAAAGATT
11751	TCACTAGGAG	ACTACATACG	AAGCAAAATG	AGTAAATTTA	CAC'TCTAAT
11801	TGTGTCTATA	AACATATGTA	TGTAGTCCGA	AACCTCTAAA	TAGACTTATA
11851	CTTAGGAACG	GAGTATATTT	TGGCGAATAG	CTCCCTTTAC	CGTTTAAATAG
11901	GGGTAGAGAC	AGTACATATA	TAAACCTCTA	ATAATATGAA	AAAGCAAAAT
11951	CATGTTGCAA	AGGAACTACT	AAATTGACTAG	TACAACGAAA	TCAGTACAAA
12001	CGAAACAGGA	CAAA'TAAGCG	CTGGGTAAAA	ACCGAAAATG	ACAGTGTGGA
12051	CTGCTGAGCA	AAGGTATCTA	CTCCTAGCTA	GCTACCCTAC	AGTTCGCTGC
12101	ACAGATGCAT	GCATGCATGC	ACGCATGGCG	CCATTGCTCT	ATGGACCCTC
12151	CCTATGCCTG	CAATAATTCT	TTTGGTTAAT	TTCTTTTGG	TCAACTCCAG
12201	GTCTCGAATT	GGTTTCACTAA	CGCCCGCGTC	CGGCTGTGGA	GCCCATGAT
12251	CGAGGAGATG	TACCAGCAGG	AGACCAAGGA	GCTCGAGGGC	TCCTCCGCGG
12301	CCGCCGCGGG	CGCGCGCGGC	GTGGCGGGGC	CCGAGTCCGG	CAACGACCCC
12351	TCTGGCGCGG	ACGACTTGCA	CTCCCGGACG	ACCACCGGCT	CGCAGCGACA
12401	GTTAGTAATA	CACCACGGCG	GCGGCAGGTA	CGGCCAACAA	GAAACCGGGA
12451	TGTCCGCGGT	CCACCCCAT	AAGCTCGACC	CCGGCGCGGG	GCCATCCGTT

12501	GCGGACGCCG	CCTTCGTCGG	TCTTGACCCG	GCGGAGCTCC	TTGGCGGCGA
12551	CGCGCACGTG	GGTGCCGCCG	ACGACCTGTA	CGGGAGGTTT	GAGCCCCGGG
12601	TGAGGATGAG	GTACGGGGCC	GCCACGACCG	GCGCGGTCTC	CGGCGACGTG
12651	TCCCTTACGC	TGGGCCTGCA	GCACGCCGGC	GCCGGCAACC	AGGGGCCGGA
12701	CGGCAGCGGC	CGGTTCTCCT	TGAGAGACTA	CAATGGTTGT	TGATGCCTAC
12751	CTACACACAT	ATCTTGATTA	TTCATTCATG	GCTCAGGCAT	GCATTGCATT
12801	ATTTGGAGCA	CGCTGAGGAG	ATTCATCGAA	GAGAGAAGAA	AGAAAGCAGT
12851	AGCACCAGAG	AAGACAGAGA	GATAAAATTG	CATGGTGCCT	CTGGAGGTGG
12901	TGCAGGGGAT	GGGAATATAT	ATTAATATAC	GAGACAAATC	ATCATCTTCA
12951	TTTTCTTCTT	GCTCAGATGA	TTCTTAATTT	AGCTAGGTTA	ATTCCTTTCC
13001	TTAGGCATTA	TTGTTGGGGG	GCTAAGGAAA	ATCGATCTGT	ATACAGGAAA
13051	AGAAAAGATAG	GAAGTGTATG	TTATAGATTT	GTTTTGGTCA	CTCCTTTTTT
13101	TTGGTTCTCT	TGTCCTGTTC	CATGTTCTGT	TTCTTGTTC	GTTTTAGTCT
13151	TGGTGTACCA	TTTTTTTTTC	CTCCTTTTCA	TCTGTAACTA	AACATAAGAG
13201	AAACATACAT	ACATACATAC	ATATACATAT	ACATGGATGC	ATATGGTAAA
13251	TATTGGGGAC	ATATACATAT	GGCTACTACA	TGCATTTGGC	GCCCCATCTC
13301	GATGAACCCA	AGAGAGAGAG	AGATGTATGG	TACATGCATA	CACTTGGCCG
13351	GGTACGAGTG	TGGTCACTCA	CTCACGGTTG	GCTGGCTGGC	ATATGTACGT
13401	GCAACTTGTG	CGTGGCTCTT	TTGATTTTGC	CCCACCTTTT	GGGGAATCCA
13451	ATTGATGCCA	TGTCGGGGAA	AGTTATTCTG	CTGAAAATAG	TAGTATGTGC
13501	GTGCGTGGTA	TATATCGTAT	CAAGAACAAC	AACTGCCACT	CTAGTTTTTA
13551	CAGGATTGGT	ACGTACATAT	GAAC TACAGT	GGTATTTGTA	AGCAGGCCTT
13601	GGTGGGTGGG	TTGCACCTGT	CGGTGGGGCC	TACCTACCAA	TATGTCAATC
13651	ATGCTCATGC	ATCAGTACTA	TGTAAGTATC	CCGGTTGAAAG	TGATTAATTA
13701	GCAGCAGGAA	CTACTCCTAA	TCAAGTTGCT	CACTGATGGG	CTCAATTNTC
13751	GTAGCACTGA	TGGATGGGCG	CAAGCAACCC	GATGCTGCTG	CATATAGATA
13801	TATGCATGGG	GGCTGTACAG			

7.2.3 Genomische Sequenz von *JuBel2*

```

1   AGGGGGGGGG GNAAAANCNT TAACCCCCCT TAAAAANAAN AAATCTTTT
51  GGGGATAAAA AAATAAAAAA AAAGGGGNTN TNGGGCAAAA AAAGNNTCNG
101 AAAAAAAAAA NTTNTTTANN TNNTTTGGNA ANTAAANACC NATTTGGAAA
151 TATTNTGGGA AANANCCNCC CTTTTTTGGG GGCCCCGGTT TNNTCCNTTT
201 TTTTGGGGGG GGGCCTNAAA AGTCCCTTTT NGCCNAAGNN TTTTNGGNT
251 CNTTNAAAAA GCCNATCTTG GNATCCNTGT TGCCCACCGT CGNTNNAANA
301 AGGAGTTTNT GGCCATCGGA ACCACCGACA AAGGGAATGA GAAGCAGGGT
351 ACTTTTGCAA GTTATGAGCA TGGTCTACT CTTCTTATC CGGTGATGC
401 GTCCTGGAAC ATGGATACAC GCGCTACCAA CCACCTGACG AGCGACATGG
451 GAAAGCTCTC CACACAGGTG CCATACCGTC GGCATGATCA GGTTCATACT
501 GCAAACGGGG AAGGTATGCA CATCTCACAT ATTGGTCAGG CATCCCCTCT
551 TACTCGTCGA TCCACAAAAT TACGTCTTCT TAATGTCCTT TGAGTTCCTT
601 ATGTTTCACG TAGTTTGTGG TCTGTTCCTA AACTTACTCG TGATAATAAT
651 ATTTCTGCTG AGTCGCATCC TTTTTTATTT TTTTGTAAAG GATCGGGACA
701 CGAGGGACAT ACTCCTTAGA GGTGCTTGGC GCAATAATGG TCTCTACGCA
751 CTTGATGTGC CACCTGGTCC TAGTGCTTTT AGCGGTGTTC GTGTGTCTCC
801 ATCAGAGTGG CATGCGCGCC TTGGTCATCC TGCCAGTCCG CATCCCTTCT
851 ATGTTCTTCA TCGTCATGAG CTCCCAATTG TGTCCAATAA ATATGATGAT
901 GCGGTTTGTG ATGCCTGTTA GCAAGGCAAG AGTCATCGGC TTTCTTTTTC
951 TAAGTCGAGT CGTGTAGTCA CTAAACCGCT TGAGCTTGTA TTTTCGATG
1001 TATGGGGCCA TGCCCAAAGT TCTGTTAGTG GTCATAACGA CTATGTCACT
1051 TTCTTTGATG CTTATAGGCG GTTCACTTGG TTTTATCTTC TTAAGCGCAA
1101 GTCCGATATG TTTAATGTTT TCTTACAATT CCAAGCGCAT GTGGAGCGTC
1151 TGCTTAGCCA CAAAATTATT CATGTGCAGT CTGATTGGGG TACTGAGTAT
1201 CACAACCTCA ATGCGTCTT TAGTAATCTT GGAATTAATC ATCGGGTGTG
1251 TTGTCTCAT ACACCCAAC AGAATGGTGT AGGTGAGCGC AAGCATCGTC
1301 ATATAGTTGA GACTGGTCCC ACTTTGCTTG TTCATGCCTC GGTTCCTTTT
1351 TGGTTTTGGA GTGATGCGTT TTCCAACGCA TGCTTTCTCA TTAATCGACT
1401 ACCTACATGA CTCCTGCACA TGAAAACATC TCTTGAACTC TGTGTGAATG
1451 AAATCCCTGA TTATACGTTT TTCAAAGTTT TTGAGTGTGC TTGTTGGCCA
1501 CATCCCCGTC CATATAAGCA ACGCAAGTTG GATTTTTGAT CTAAACAGTG
1551 CGTGTCTCTT GGCTATAGTT CTCTTCATAA AGGGTACAAG TCTCTCATG
1601 TTCCCTCCAA CCGCGTCTAC ATTTCTCGTG ATGTGGTGTG TGATGAGAAT
1651 GTCTTTCTCT TTGCGGCATC TCCGGTCTGC TCCACCACTC CCATACACC
1701 TGAGCAACCT ACCTTGCCAT TGCCGTGTTAA ATTTGTGTAT TGTGCATATA
1751 CTCACTTGTT ATTACCTAAC CATGGTCCAG GTAAGTGGAG TGGAGCACGC
1801 CTTGAGCTTC TGGACGCATA TGCCGGTGTG GCCTGTGTGC GGTACACCTG
1851 CGATGGCTTC ACCTACGTCA GCTGCGGCTG GCTGCGGCTG CGCCTGCGGT
1901 CCAGCTGCAC CCGCGCTTGT GCCGGCTGCG ACTCCACCAG TTGCACCCGC
1951 GCCTGTGTGC GCTACGACTC CGCTAGCTGC ACCTGTGCCG GCTTCGTTGG
2001 TAGAGCCCGG CTCACCTGCG TCGGTTGTGA TGGTTGAGTC GCCTCGGCTC
2051 GCCTTGGCCT CCCCCTGGT TTCGGAGGCG GCATCTTCGC CATCACCTCC
2101 GCCGCTGTCT GCTCCTCTGC GTCCCTCGTAC GCGAAGTCAG AGTGGTATCA
2151 TTCGCGCGAA GGAACGAACT GATGGCATAG TTTACCGGAT TCGCGCGTGT
2201 ATGGCACAGA CACATGCTGA TCCCCTGACC GAGCCTCGTC ATTTCCAGGC
2251 AACTCTTCGG ATTCCTCATT GCGCGCTAC CATGGAGTAG GAGTTTCATG
2301 CACTGCAGAG GAATGATACT TGGCGTTTAG TTCCTCCTGT TCTTGGGCTC
2351 AACATCATTG ATTCCAAGTG GGTTTTCAAG GTAAAAAAA TGTGATGGT
2401 TCCACTGAGC GCTACAAGGC GTGGTTGGTG GCCAAAGGTT TTAACAACAG
2451 CTATGGTCTT GATTATGCGG TTACTTTTCA CGGAATGTGT AAACATACCA
2501 CTATTCGGTT GCTCTGTGCC TTGGCTGTTG CCAAGGGGTG GTCTCTGCGC
2551 CAGCTTGATG TTCAGAATGC TTTTCTCCAT GGGATCATGG AGGGAGAAGT
2601 TTACATGTGT CATCCTTGTG GTTTTGTGTA TCCAGCTCGT CCACATTATC
2651 AAGTTCGCCT GGTTAAGGCA CTTTATGGAC TTAAGCAGAC TCCTTCGTGC
2701 ATGGCATGTT CGACTGGGTT CGGTTCTTCC ACCAACTTGG GTTCACTCCG
2751 TCCACTACTT GACACGTAC TGTTCCTCTT TCATCGCTTC TGANGTCACT
2801 ATGTATCTTC TGGGATATGT AGATGACATC ATTCTTATCA GCTCCTATGT
2851 GTCTGTGGCG GATCGTCTAC GGTGTGCTTC TTCTTGTGTT CACTTTGATG
2901 TTAAANGATC TGGGGGCTCT CCCATGCTT TCTTGGGCTT GAAAAGTTTC
2951 ACGGTCCTT TGCTGCCCTC ACTCTTACTC AGCATAAGTA CTCTTGGAC
3001 CTGCTATGTC GTGCAGGTAT GTTGCCTTGC AAACATGCTA CCACCTCTAT
3051 GTCTGCGATA GATCGGTTAT CAGCTTGGGA TGGTGACTTG CCCCCTCCG
3101 ATGATGCTAC TGAGTACCAC CGTCTGTTG TTGGAGCTTT GTAGTACTTG
3151 ACTATTACAC GACCTGATAT CTCTTATGAA GTCAATCGTG TATGCGGGTT
3201 TCTTCATGCT CCACGGACTT CACACTGGTC AGCTGTGAAG GTATCTTGC
3251 GGTATCTCTC TCACACTATC TCCTTCGGTT TGCATCTTCG GTCTACCTCT
3301 TCTTGTGCTC TCTCGGCCTT CTCTGATGCT GATTGGGCTA GGAATTCGGA
3351 TGACCGTCSA TCCACAGGGG GCCATGCTGT CTTTATAGTT GATAACTTGA
3401 TTGCTTGGAG TGCGCGCAAG CAGGCCACAG TATCTCGGAG TAGCACTGAA
3451 GCAGAATACA AGGCAATTGT CAATGGCACG GCCGAGCTTA TTTGGGTACA
3501 GTCTGTGTTA AGAGAATTAT GCATCTCTCA ACAGGAGCCA CTGTTCCTTT
3551 GGTGTGATAA CATTGGTGCA ACATACTTTT CATCTAATCC AATGTTCCAT
3601 GCTCGTAACA AGCACATCGA AGTTGGCTAT CATTTTGTAA GGGAACCGCT
3651 TGACCGGAAA CTTCTTCGTA TCAAGTTCAT CTCTTCCAAG GATCAACTTG
3701 CTGACATCTT CACAAGCCTT CTTCATAAAT CAGAGTTTGA GTGATGCAGG
3751 CGCAATCTTA ACTTACTTTG TCGTTTCAGAA CGGAGTTAAG ATTGAGGGAG
3801 GGTGTAGAC TATGTATTTT TACAGTTTTC GTATATACCC TGTATCTTGT
3851 TACACCCCTT ATATATATGA GATAGCCACA TCCTGTATTG GGTGTCTGTC
3901 AGTTCCCCAC AACATATTGT TTTACACGGC GAATGGCGGA GGAGCCTCAT
3951 GGAGGAAGAC GACGATCCTA GCGACAGGTA TCATACTTTC ATTCGTTTTT

```


4001 ACTTGGACTG AAAAATCCTC CAACGACAAT TATTCTGGAA AAGAGGGAGT
 4051 AGTTTGAAAA ACTAAGGAAA CGTTTGTGCGA TTCTTTGTAG GACTAGCATT
 4101 AGCATTAGCA TTAGCATTGT TGGTATGCAG TCGCGGGGTG CTGGGGCCGA
 4151 AGGAACGAAA CCTCCTCCGT CAAAAGGAGT AAAAAAGCG CCGTAAAACC
 4201 AGACTCGAAT CCGGCACCCA TAGCTCCCAG CGCCAACCGG AGAGCTCGCA
 4251 GCCGTGGTGT AAAATTTGTTG GCATGCAAAAT GCACGGTTAC CATTACCAGC
 4301 AACAGCTGTA TGTAATTAAG CCGCGGCAGG GGCAGGACGC ACGCACGCAC
 4351 GCACGCACGG CCAGCGTCAG CTTGGAGTTG GACCACAGCA GCAGCAGCTA
 4401 TCTAGTACTC CTTCACTCAC TCACTCACTC CCTCGCTCGC TGCCCTCTC
 4451 GCTCCGTTAT CCGCCCGCTT TCGCTTTCAC GGCTCCTTAC CGTTTCCCCC
 4501 TCCCCTGGNA CCGACAGAGC CTCGCTCTCC TTTTCACTC CTCCCCTNGC
 4551 CTTTGGGGGC CCGAACCCAA CCACAGCAGC CATCGGGGGA ACCGAGGAGG
 4601 AGAAAAGAGG GCGAGCGAGC GAGAGAGGGA GAGATAAAG GCGAGGGGAA
 4651 GGAAGGGAAG GGAAGGCTAC AGCAGCGGAG ACAGAGGGTG GGAGATACCA
 4701 TACCACCAGC GGGCAGCGCG ACAGCGAGCC AGGCCCGGCG CTCGGAAAGT
 4751 GCGGAGCCGT TTCCCTCCA CCTCCACTCT CTCAGGGGCC ACGGAGGCCA
 4801 CCCACCCAG CCAGGTGCTG GTGCTCCTGC TCTACCTCGC TCGCTGCC
 4851 GCCACCCACC CACCGCTCAC GTACGCGCGG GCGCTCGCCA TGTCGTCTCC
 4901 CGCCGGCGGG TACGGCGGCG CCGAGGCCCA CCACCACGGC CACATGTCTC
 4951 TTCACAGCCA TGACACCAC ATGGCGGCGG CCGCGGCCGG GTCGGGCGGG
 5001 CAGCTCTACC ACCTGCCGCA GCACAGCCGC CGCGAGAAGC CTCGGTCTCC
 5051 GCCGGACGCC GCCGCGGAGG ACTCACCGCC GACCCCCCTT GCCCCGACC
 5101 ACCAGACCA CCAGGCCGGG GCGTGGCCTC CCCCAGCCTT CTACTCTAC
 5151 GCGTCCCTCT CCTCCTCCTA CTCACCGCAC AGCCCCACGG TGCCCGAGGG
 5201 CCAGCAGCTG GTGCTCAACG GGCTCACCGC CCAGCAGGTC ACCGCGCAGC
 5251 AGTTCCCGCA CATCCCCACG CACAATTCT CGCTCTCCT CTCCTCCGCG
 5301 TCGTCCAATC CCGCCACGGC GCCCCCGACG CCCAGGAAGC AGCAGGAGCC
 5351 GGGAGCGGCC GGGCCGTGCG GTCCCTTTCAC CCGCTACGCC TCGGTGCTCG
 5401 GGGATCCAA GTTCTCTGTC CCGGCGCAGA GGCTGCTGGA GGAGATCTG
 5451 GACGTGGGAG GCAGCGCCGC GCACGCGGAC CGCAGCTCC CGGACGAGG
 5501 CCTGCTCGAC GCAGACACGA TGGACGTGCG CGACGACGAG CTGGACCGCC
 5551 CAGGCCCATC GTACGGCGCC GAGCAGCAGT GGAAGAAGC GAGGCTCATC
 5601 TCCATGATGG AAGAGGTGAG CTAGGGTACC ACGTCCAAAT TTCTACTCTA
 5651 CCTCGTTTGC TTTCGATGCTG CTGCGCTGGG ACTGGGAGCG CCAAGAATCT
 5701 TGCACATAG GGTACATCA CCATGGCTTT GCTTGTCTTT ATTCACTGTG
 5751 CTTCCGCGGT TGCATGTGCT TTTGATTTGA TGATCATTTT CATGCGCGCT
 5801 GTTACATTAC ATTTGTTCGG ATTTTCTTTT TCTCCTTTGG CCACAGTGCC
 5851 GCACTGCTCA CCCCACAACA TTTGCTGCTT TCCTTGCTCC TTTTCTCTC
 5901 GCCAAAGATT GGATGTGAT TAGTTTCGCC GCACTAAGCA CACCTTTTCC
 5951 GAATGCCATC TACATGAATG AAAACACAAT CGATTATTTT CCTCGAACGC
 6001 TTTGGGCGA TAGGTGATGC TGGAAACCAG CAAAACCTTC GCGGTCATG
 6051 TCAAGAAAAA TCAAGTTCTT TCATCTTCCA CATGGTTATA AGCATCGGAG
 6101 GACTTGACCC TCTCGCAGCG TCCTCTTCCA ACCTCTGAGG CAATACTACA
 6151 TGGGATGGGA ATCTACGTAC GATGTAGTAG AAAGCTTCCA TTTATGGAGC
 6201 TCCCAGTCTT ACAGTAGCAG GCGAGCTTGC TGGTCTGACC TCTTTATTA
 6251 TGGCGTCTTA CTTCTATAGT TGGGAAGTAG GCTTTGGCTC GTTGATGTCA
 6301 CATCCACATG AAAGCTAAAG CTCGTTGATG CCGTTTATCT CTACTCTA
 6351 CTAATCCGGC TGCAATTAAT CACCTCTCTC ATCGTAGGTG TGCAAGAGGT
 6401 ACCGGCAGTA CTACCAGCAG GTCCAATCCG CGATCGCCTC GTTTCGAGAGC
 6451 GTCGCCGGGT TCAGCAACGC AGCCCCGTTT ACGGCGTTGG CCCTGAGGGT
 6501 GATGGCCAAG CACTTCAAGA CCATCAAGGA GATGATACTG ACCCAGCTGC
 6551 GCAACACCAG CAAGATGCCG GTCAAGGGGT CGTCCATGAG CAAGGACATC
 6601 ACCATCTTCG GCCTCGGCGG CCGCGGCGGC GCCCCGCTCG ACCTTTTCA
 6651 GAGAGGGAGC AGCGTGAACG GCTTCGGCCA GCCGCACAAC ATCTGGCGCC
 6701 CCCAGGGGG CTTCCCGGAG CGCTCCGTC ACGTCTCCCG GGCTTGGCTC
 6751 TTCGAGCACT TCCTGACCC GTAAGTTTCT TTCTTATCCA ATCCACTCAA
 6801 CTAATTACTG CTAGCTCATG GTAATTAGCA TTACTGCTTC ACTAGACGAC
 6851 GTACGTACTC CGCGCCTTTA GAAGATAATA ATGCTTCTAT GCATAGTGGT
 6901 GCCACATCCA CATGATTATG CTGGGCTGG ACCTGCGGTG GTTTTAGCTG
 6951 ATTGCAAGCA ATCCTCGGTG TCGAAATCAT TAGGATCGAT GGATGGCCGA
 7001 GCATGCATGA TCGAGTGTCA TGGCATGGCT TAGCTTGGCT TGGCTGGCA
 7051 TCCAATCAT TCTATGGAG CTAATAAGAT GGCAAGCCAC AGCTTTTAA
 7101 GGTCTTGTTC ATTTTGAGCT GTGCACATCA TCAATCCATT TGCTAACAGT
 7151 CTAGGTCTCT CGTTGCATCT TTTCTTAGAT CCTGACATTT ACATGACTTT
 7201 CCAACTATCA TTAGGTGAGC GGCTTTAAGG ATTTGGTTAG GCGCTCTTAA
 7251 TTATACTTAT GTGCTTGTCT ATTTTGTCTAT GCACTGACTG AGAAACAAC
 7301 TGCGAGTAAG CTTACTTCTA ATGCAGTTTT AGGGGGCACC CACCTGTAGG
 7351 AAGATGAAAC ATCATCATTT TTTTGGTTGT TTTGCATACT ACATCTTGTA
 7401 GTACAATCGT TTTTCCATG ATGTAAGACC TGGTGGTTAC ATCTGGTTGA
 7451 TTGGTATAAT GTTAGCATAT TCAGTTGTTA ATTATAACTT TATAATGCTA
 7501 GAGCCTTTCC ATTTCCAAC TGGATTTGGTA TTATATCTG TACCCTTAT
 7551 TCATTATTGC TGCCAATATT TCAAAGCTCT AGAAAAGAAA GACTGATAAT
 7601 TGTCGATTCA TGTCCTTTTG TTAGATCACA CATCCACCAA TTCTTAGATT
 7651 TAATTAACCT GCCCTTTGCA AAAGAAAAGG GCCTACTTGG GCGTGTCTAG
 7701 ACTGATAAGA GAAATTTCTT AAGATCGAAC CTTTATTTTT GAGATGTTGC
 7751 TTGGAGTTAT GTATGTTTCA ACCGAATAAA CAAACCATGA CAGGCACGAG
 7801 CACAATAATT TTCTTTGTTT CCCTCATCTA ACCCTAACCT GCGCTGTTT
 7851 CTAGTACACC TTTTCTATTC ACTCTGGGCA TTCAAATATA ATTTGTTAGT
 7901 CCCCACAATC GGTGCTTAGA TTTAACTTGC TCTTAAAAAA GGTCTTCTG
 7951 GATGGTGCTA TACTGATAAG AGAAATTCTC TAAGATCAAA AACTTTGTTT
 8001 CTAGGGCGGA GTTATTTGCA ATGTTAAAGA CTGAATAAAA AGCTATGACA
 8051 GGCACCTCAC CCTTACCTGG CTTTGTTTTT CACTCATTTT CTACTGGCAT
 8101 TCGTCTGATA TTTGGTTGA AACCTTGCAG GTATCTTACC GTATGGCACA
 8151 AGCAAATGCT GGCCAAGCAA ACTGGTTTAA CAAGGAATCA GGTAAAGCAGC
 8201 AACTAAAGCT GGGGACTGTT AGCACTAGCA TGTCTTTTGG TTTCTGGAAC

8251 TTACTGTAGT TGACATGTTG GTGGGTTAAT GGGTGTCTGT CAGGTGTCTGA
8301 ACTGGTTCAT CAACGCGAGG GTGAGGCTCT GGAAGCCAAT GGTGGAGGAG
8351 ATCCACAACC TGGAGATGAG GCAGGTGCAC AAGCAGTCAC CGCACGACAA
8401 TGGCAGCCAG CACGGCGTCC ACGGCCATGC TCACCAGCCA TCGTCACAGC
8451 AGCAGCAGCA GCAGCGCAGC GGCAAGCGCT CCGAGCCCTG CGACTCGCAC
8501 CTCGGCCAGT GCAGCGGCGT CACCAGGAAC CACCACCACC ACAGCAACCC
8551 TCGCGCTCC TCCCATGGTG GCGGCTTCCC GGACGACCTC TCCCAGATGT
8601 CCCACTCCAT GCAGCAGGGC CAGGTGACCT TCGCCGGCTA CGGCGCGCTG
8651 CCTCCAGT CCCAGCAGCA CCAGCACCAG CACCAGCACA GCAGCATGGC
8701 GTCGCGCAG CACCCCATC ATCAGCATCA CGTCGGCGCC GCCGGGGCGG
8751 GTAACGGCGG CGGCGTGTG CTCACCCCTG GCCTCCACCA GAACAACAGG
8801 GTCTGCTTCG GGGAGCCGCT GCCGGCCAAC CTCGCGCACC GGTTCCGGCT
8851 GGAGGACGTC GTGAGCGACC CCTACGTGAT GGGCTCCTTC GGCGGCGGCC
8901 AGGACCGGCA CTTCCCAAG GAGATCGCG GCCACCTGCT CCACGATTC
8951 GTCGGGTGAC CGATGCTCAG CTCAGCTCAG CTCAGCTCGG CGCGCTCCAC
9001 GCTGATGCAC ATTGTTGTAA TGTACGCACG CACTGTGGT AATCCTAGGC
9051 TGGTATATAA GTCGATCAT AAAATCACTT GCGGCTTGG CTTCACGATC
9101 GGCATGAAGA ACACGGTCGA TTCCTTTGGA GGGCGGATGA AACATTGACA
9151 TGCCCTCACA TGTGTACTCC TACTAGATCA CCCAGGCATG CATGCCGTCC
9201 AACATTCAAG CACCTTGTGG GCTACACATA GCTTCAAAAT ACCTTGTTC
9251 AAAAGGTTTT ATATGGTCTT CTGCCATTTG TCCTAGAGCT TTTGGATCAG
9301 CCTGTGGTAA TCAATGAAAT GCATGCATGT GTTACCATAT GGCCAAGGAA
9351 AAGTTACCTC TTGTTTATGC TCGATAGTGT TACTACCATT ACTGTATTAC
9401 TGTGCTGCAG CTAGTCCTT GTTTATGCC AGAAGTTTFA CTCCACCATT
9451 TATTTACTGT GCTGCAGCCG AAGGATCAAC TGGTCTCTGT AGAATATGAC
9501 CGTCCTCCGG CCCTGTTACG TTAGCCTTTC GATGATAAGA TATGAAACCT
9551 GCTGTGCTAG TTAGTCTTTT GATGCGCGGT TATATTAATA TTATGATACT
9601 AATCACGCCG GCGTTTCTGT TATCCCTGT ATCCATCGAT GGGGGTAGCC
9651 TNCTAAAGTC TGGACAGGCC ATGATTTGGA CGCCTGTTGA CCCCTAATA
9701 GGCTCCGCAC GCTTACAAAA

7.3 Liste verwendeter Oligonukleotide

Zufallsprimer für die cDNA-Synthese:

AGA TCT CGA GNN NNN N

4285 ATA AGG ATC CAT G CT CGT GTA CCA GGA

JM1 AATGTCGACGCGATTAGCACTTGACCTC

JM3 TTA TGG ATC CTC TCC CTA AAC ACC GCG C

JM4 ATT TCT CGA GCG AGC TAG CCG AAC CTG TAG

JM5 TTT TGG ATC CCC ATG GAG GAG ATC GGC CA

JM6 ATA TGG ATC CGG ATG GGT CGC GGT AAG GTG

JM7 AAA AGT GGA CCT CAA GCG TTG AGG TGG CTC

JM8 ATT TGG ATC CCG AGC TAG CCG AAC CTG TA

JM15 ATT AGG ATC CTG GAC CAG TTC ATG GAG GC

JM16 TAA TGG ATC CCC AAG ATC ATC TCC CAC CC

JM17 ATT AGG ATC CGA GGA GAG ACA GAG CTT CC

JM18 AAA TGG ATC CTG CGC ATG GAT CGG AGC AGC

JM19 TTA TGG ATC CGT GTC GGG GAG ATC TCG CAG

JM20 ATA AGG ATC CAG GTT CAT GAA CCG AGG CGG

JM23 TTA AGG ATC CAG ATG GCC TCC GTC GGG

JM24 TTA AGG ATC CGC CGT CAC CTT TTT CTC TTG

JM31 AAT AGG ATC CCA GGA AGC TCT GTC TCT CCT

JM32 AAA TGG ATC CCC AAG ATC GCG CAT CCC

JM33 TTT AGG ATC CCC ATG GCG TAC CAG TAC CAC

JM34 ATA AGA ATT CAA GAT CAT CTC CCA CCC CCA

JM35 AAT AGA ATT CAT GAT GGA TGA ATT GAG CAA AC

JM36 AAA AGT CGA CTT CAA GTG CCA ATA CTT CC

JM42 TTT TAT CAA TTG GGC AGC AGG GGC GGG

JM43 TAA ATT CAA TTG CCC GGG CTC GAG CCC

JM46 CCT TCT GCG CTA GCG CCG TGT AGG GCG

JM47 ATT TAA GAT CTC AAC CAT TGT AGT CTC TC

JM48 TTT TTG CCC GGG CCG GCA CGA GGG GCG G

JM50 AAA AAG TCG ACC CTA CAC GGC GCT AGC GCA G

JM64 TTT TAG GAT CCC GGC ACG AGG TTC CCG

JM65 AAA AAG AAT TCG TGC GGC TGG CCG AAG C

JM66 CCT AAC GAA AGG AAT TAA CCT AGC

JM84 ATT AAG GAT CCT CGG TCG TCG GGC GAT CCA AGT TC

JM85 TTT AAG TCG ACA TGT TGG ACG GCA TGG ATC CCT GG

JM86 TTT TTG GAT CCC GCA GCG GCA AGC GCT CCG AGC

JM87 AAA TTG GAT CCG CGG CGA CGC CCT ACA CGG CGC

JM88 AAT AAG TCG ACC CCG TCT GCC TCG CCA ACA GGT GC

JM89 TTA AAG GAT CCG AGT CCG GCA ACG ACC CCT CTG GC

JM90 TTT TTG TCG ACG GAG TGA CCA AAA CAA ATC TAT AAC ATA CAC TTC C

JM91 AGG GGA TGT CGG CGA CGA CCT TGA CTG C

JM92 GCC GTC TCT CAC CCT TAG CTC CTC GGC

JM93 CGA GAA GTT GTG CGT GGG GAT GTG CGG G

JM94 GAG CAC CGA GGC GTA GCC GGT GAA GGG
JM95 TTT TTG GAT CCC GGG GCC AAC TTA TTA GGT GAG ACG TC
JM96 AAA TTG TCG ACG CCT CCT GCT CCA TCA TGC CCA TGT G
JM106 TTA AAC CAT GGA AAA TGT ACG ACC ACG CCG CCG CC
JM107 ATT TAT CTA GAC AAC AAC CAT TGT AGT CTC CTA AGG
JM108 AAT AAA CTC GAG AAA ATG GAA TTC CGT CAC CAG CAC CAC CAG
JM109 AAA TTT TCT AGA TCA CCC GAC GAA ATC GTG GAG CAG
JM110 CCA CAC ACA CGC ATT TGG GCT ATG
JM113 TGG CGT AGC ATG TGT CGC TGG CAC
JM114 AAA AAA CCA TGG CCT ACA CGG CGG TAG CGC AGA AGG C
JM117 GGG ACA GGC GCC ACG CCA TGC CGG
JM119 TGC ACA AGC AGC AGC ATG CAG TGG CAA G
JM121 TCG CCC CAC TAA GCA CAC CTT TTC CGA
JM122 GAG AGA GGT GAT TAA TTG CAG CCG GAT TAG
JM123 TGC TAA CAG TCT AGG TCC TCC GTT GCA TC
JM124 ATT ATT GTG CTG GTG CCT GTC ATG GTT TG
JM125 TTT TTT GAA TTC GAG ACA GAG CTT CCT GAG ATT G
JM126 TTT TTT GAA TTC TCA AAG AAG AAG AAG AAA GGC
JM127 TTT TAA GAA TTC GAA GCT CGC CAG CAG CTC CTC
JM128 AAA AAT CTA GAG CTA GCC GAA CCT GTA GAG CCC
JM129 AAT TTT CTA GAC CTT GGG GAG CTT GCC TTT CTT C
JM130 ATT AAA GAA TTC GAG CCC CCG CAG CTC TCC CCC
JM131 TTT AAA GAA TTC CGC TCC GTC AGC ATC CTC CGC
JM132 AAA TTT GAA TTC ATG TAC GAC CAC GCC GCC GCC GCC

7.4 Abkürzungen

5'-UTR	5'-nicht-translatierte Region
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne von GAL4
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BD	DNA-bindende Domäne von GAL4
bp	Basenpaar
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	counts per minute
C-terminal	carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
g	Gramm
GUS	β-Glucuronidase
HB	Homöobox
HD	Homöodomäne
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Phage Lambda
M	molar
Min.	Minute
μ	micro
mM	millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	nano
Nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
n.d.	not determined
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	Plaque-bildende Einheiten
PNK	Polynukleotid-Kinase
PVA	Polyvinyl-Alkohol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAM	Apikales Sproßmeristem
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Elektrophorese
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
Std	Stunde
Tab.	Tabelle
WT	Wildtyp

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Rohde und Prof. Dr. F. Salamini für die Themenstellung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Doktor kmueller bedanken, dessen Arbeit die Grundlage für alle meine Experimente darstellte, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand (wenn er gerade dazu aufgelegt war), und dessen Beistand besonders in der harten Phase des Zusammenschreibens unbezahlbar war.

Vielen Dank auch an Rainer Franzen, ohne den die *in situs* nie geklappt hätten, an ThiHa Nguyen, die mit den SSCP-Analysen schon fertig war, bevor ich überhaupt wußte wofür die Abkürzung steht, und Tamara Turbanski für ihre Hilfestellung bei cDNA-Screens und Proteinexpressionen. Carlo Pozzi und Jürgen Schmitz danke ich für die Bereitstellung von cDNAs und Pflanzenmaterial, und Hans Sommer für die Hilfe bei der Herstellung der Two-Hybrid-Bibliothek.

Außerdem ein dickes Dankeschön an Alice Kaufmann, ohne die die Gruppe Rohde nicht das wäre was sie ist. Danke, Ahmed, Birgit, Brigitte, Dieter, Dirk, Heike, Mervat, Mike, Tine, Vladimir, Yamei und besonders Luca, die Ihr sowohl wissenschaftlich als auch privat eine wichtige Rolle während der letzten Jahre gespielt habt.

Am allermeisten möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich, wie bisher bei jeder meiner Eskapaden, auch während dieser Arbeit bedingungslos unterstützt haben. Vielen Dank natürlich auch an meine Freunde Corinna, Haakon, Matte, Stefan, Susanne und den lieben Nachbarn, die, wenn auch meist aus der Ferne, immer für mich da waren.

Erklärung

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

Köln, den 23.9.1999

Judith Müller
Gutenbergstr. 84
50823 Köln
0221/5102709

LEBENS LAUF

11.09.69	geboren in München als deutsche Staatsangehörige
1976-1979	Besuch der Grundschule an der Kleinfeldstraße in Germering bei München
1979-1987	Besuch des Carl-Spitzweg-Gymnasiums in Germering bei München
1987-1989	Besuch des Dante-Gymnasiums in München
1989	Abitur
1989-1990	privates Musikstudium
1991-1996	Biologiestudium an der Ludwig Maximilian Universität München
1996	Diplom Biologie
1996-1999	Promotionsstudiengang Biologie an der Universität Köln und Dissertation am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung