

**Untersuchungen zum Funktionswandel
der *AGAMOUS*-ähnlichen MADS-Box-Gene
aus Samenpflanzen im Verlauf der Evolution**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anna Charlotte Kirchner

aus Heidelberg

Köln 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Saedler
Prof. Dr. Diethard Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2001

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1 Ursprung und Evolution der Blüte.....	1
1.2 Die <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie ist eine Subfamilie der MADS-Box-Genfamilie	4
1.3 Die <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie ist monophyletisch.....	5
1.4 Das ABC-Modell der Blüte in höheren Blütenpflanzen.....	7
1.5 Die Gene aus Angiospermen und aus Gymnospermen der <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie wirken in reproduktiven Organen.....	9
1.6 Ziel dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	13
2.2 Bakterienstämme und Plasmidvektoren	13
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	13
2.4 Arbeit an <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.4.1 Pflanzenmaterial	13
2.4.2 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.4.3 Kreuzungen.....	14
2.4.4 <i>In planta</i> -Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.4.5 Untersuchungen am Binokular	17
2.4.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	17
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	18
2.5.2 Präparation genomischer DNA.....	18
2.5.3. Aufreinigen von PCR-Produkten und Gelelution.....	18
2.5.4 Präparation von RNA	18
2.5.5 RNA-Aufreinigung	19
2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gestützte Verfahren.....	19
2.5.7 cDNA-Synthese	20
2.5.8 Plasmidkonstruktion mit Einführen künstlicher Schnittstellen	20
2.5.9 Markierung von DNA-Sonden	21
2.5.10 DNA-Geltransfer-Analysen.....	21

2.5.11 Sequenzierungen.....	21
2.6 Computeranalysen	21
2.6.1 Sequenzanalysen.....	21
2.6.2 Stammbaumberechnungen.....	21
3. Ergebnisse.....	23
3.1 Phylogenetische Untersuchung der <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie	23
3.1.1 Phylogenierekonstruktionen	25
3.1.2 Struktur motive	28
3.2 Überexpression von Genen der <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie im Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.2.1 Klonierung der Überexpressionskonstrukte	31
3.2.2 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.2.3 Phänotypische Analyse der <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen, die <i>AGAMOUS</i> -ähnliche Gene überexprimieren.....	33
3.2.4 Molekulare Analyse.....	51
3.3 Komplementationsversuch von <i>agamous</i> durch 35S:: <i>GGM3</i>	55
3.3.1 Kreuzung von 35S:: <i>GGM3</i> mit <i>agamous</i>	58
3.3.2 Phänotypische Analyse.....	61
3.3.3 Molekulare Analyse.....	66
4. Diskussion.....	68
4.1 Phylogenetische Unterteilungen der <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie.....	68
4.1.1 D-Funktionsgene sind älter als C-Funktionsgene, und deren gemeinsamer Vorfahre besaß spezifische Merkmale beider Gengruppen	68
4.1.2 N-terminale Extension ist eine Synapomorphie der <i>AG/ZAG1</i> -Superklade.....	69
4.2 Vergleichende heterologe Überexpression phylogenetisch informativer Gene der <i>AGAMOUS</i> -Genfamilie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
4.2.1 Die Stärke der Überexpressionsphänotypen hängt von vielen schwer kontrollierbaren Faktoren ab	71
4.2.2 Eine „ <i>curly-leaf</i> “-Phänokopie verursachen auch einige Nicht-AG-ähnliche MADS-Box-Gene, wenn sie in <i>Arabidopsis thaliana</i> ektopisch überexprimiert werden	72
4.2.3 Unterschiede der Überexpressionsphänotypen korrelieren mit Unterschieden in der Genverwandtschaft	73
4.2.4 <i>ZMM2</i> und <i>ZAG1</i> weichen bei ektopischer Überexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i> vom Wirkungsschema der anderen C-Funktionsgene ab	76

4.3	35S:: <i>GGM3</i> kann <i>agamous</i> teilweise komplementieren	76
4.3.1	<i>GGM3</i> kann <i>in vitro</i> als Homodimer und als Heteromer mit MADS-Domänen-Proteinen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> an CArG-Boxen binden.....	77
4.3.2	Der Komplementationsphänotyp 35S:: <i>GGM3</i> ; <i>ag/ag</i> ähnelt schwachen <i>ag</i> -Allelen	79
5.	Zusammenfassung	81
6.	English abstract	82
7.	Literaturverzeichnis	83
8.	ANHANG	91
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	91
8.2	Oligonukleotide	92
8.3.	<i>alignment</i>	94
8.4	Eidesstattliche Erklärung	99
8.5	Danksagung	100
8.6	Lebenslauf.....	101

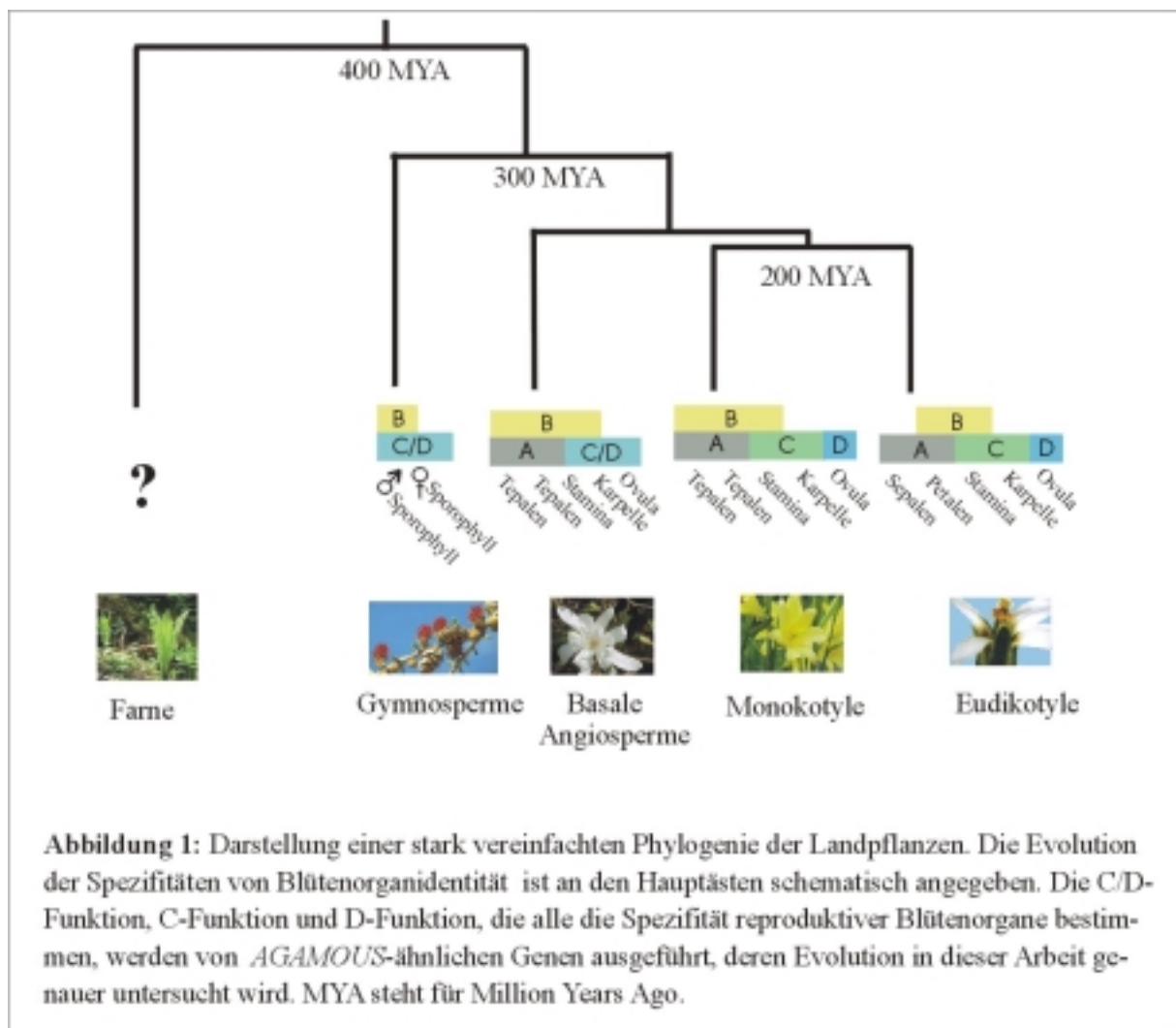
1. Einleitung

Eine wichtige Schlüsselfrage der evolutionären Entwicklungsbiologie ist, wie sich verschiedene Grundbaupläne komplexer Lebewesen entwickelt haben, was diesen Grundbauplänen biologisch zugrunde liegt, und warum einige Grundbaupläne so erfolgreich geworden sind. Mit der evolutionären Entwicklungsbiologie sollen außerdem die Zusammenhänge zwischen Ontogenese- also der Entwicklung eines Individuums, und der Phylogenese- der Evolution verschiedener Organismen, aufgeklärt werden. Alle vererbaren Veränderungen in Merkmalsausprägungen müssen unumgänglich mit einer Veränderung der Ontogenese einhergehen. Entwicklungskontrollgene, die maßgeblich an der Ontogenese eines Individuums beteiligt sind, und die die genetischen Stützen bei der Herausbildung eines Körperplans sind, müssen auch bei der Evolution dieses Bauplans eine zentrale Rolle eingenommen haben, weil die Ontogenese mit der Phylogenese durch die zwingende Anpassung an die Umweltgegebenheiten über die Veränderung wichtiger Entwicklungskontrollgene miteinander verknüpft ist (Riedl, 1975; Theißen und Saedler, 1995). Nach drei Jahrzehnten intensiver entwicklungsbiologischer Forschung an den Grundbauplänen der Tiere, wird nun zunehmend auch die Evolution der Pflanzen mit entwicklungsbiologischen Methoden untersucht (Albert *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998; 1999; Mouradov *et al.*, 1996; 1998; Münster *et al.*, 1997; Purugganan *et al.*, 1995; Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1995; Theißen *et al.*, 1996; 1999; Winter *et al.*, 1999). Ähnlich wie die Tierentwicklung wird auch die Pflanzenentwicklung durch komplexe hierarchisch organisierte Gennetzwerke gesteuert. Diesen Netzwerken gehören überwiegend Mitglieder konservierter Genfamilien an, von denen die Familie der MADS-Box-Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, bei der Pflanzenentwicklung eine dominierende Stellung einnimmt (Meyerowitz, 1997; Purugganan *et al.*, 1995; Riechmann und Meyerowitz, 1997; Theißen *et al.*, 1996; 2000). In der vorliegenden Arbeit wird mit molekularen entwicklungsbiologischen Methoden und Stammbaumanalysen die Evolution einer MADS-Box-Gensubfamilie untersucht, die bei der Evolution des Grundbauplans der Blüte, insbesondere bei der Identitätsgebung reproduktiver Blütenorgane, eine Schlüsselrolle einnimmt (Abb.1).

1.1 Ursprung und Evolution der Blüte

Vor ca. 140 Millionen Jahren hat sich ein sehr erfolgreicher Grundbauplan innerhalb der bereits komplexen Gruppe der Samenpflanzen entwickelt, der Bauplan der Blüte (Sun *et al.*,

1998). Die Blüten der Blütenpflanzen (Angiospermae) sind gekennzeichnet durch Stamina mit zwei Pollensackpaaren und durch den vollständigen Einschluß der Ovula in Karpelle (Sun *et al.*, 1998; Warburg, 1913). Heute stellen die Angiospermen bezüglich ihrer Artenvielfalt mit ca. 300.000 Arten und ihrer Biomasse die dominierende Pflanzengruppe dar (Crepet, 1998). Mit Auftreten der Angiospermen wurden die meisten anderen Landpflanzen weitgehend verdrängt. Rezente Nachfahren von Pflanzenarten, die es wahrscheinlich schon im Devon vor ca. 400 Millionen Jahren gab, sind nur noch Vertreter der Lycophyta (Bärlappe), Equisetales (Schachtelhalme), Bryophyta (Moose) und Pteridophyta (Farne). Rezente Nachfahren von Pflanzenarten, die es wahrscheinlich schon im Karbon und Perm vor 360-300 Millionen Jahren gab, sind nur noch vier Vertreter nicht angiospermer Samenpflanzen, nämlich die Gruppe der Nacktsamer (Gymnospermen), die aus Koniferen, Cycadales, Ginkgophyta und Gnetales besteht.



Die Gymnospermen sind die am nächsten verwandte Pflanzengruppe zu den Angiospermen (Donoghue und Doyle, 2000; Doyle, 1994; Friis und Endress, 1996; Taylor und Hickey, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Samenpflanzen, also Gymnospermen und Angiospermen, sind monophyletisch, das heißt, daß sie von einem letzten gemeinsamen Vorfahren abstammen, der nicht auch der Vorfahre eines anderen Taxons ist (Barnabas *et al.*, 1995; Bowe *et al.*, 2000; Chaw *et al.*, 1997; 2000; Goremykin *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1997; Samigullin *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1999a; Soltis *et al.*, 1999b). Die Frage nach dem letzten gemeinsamen Vorfahren der Blütenpflanzen und nach dem Aussehen der ersten und ursprünglichsten Blütenpflanze konnte bis heute nicht beantwortet werden (Chaw *et al.*, 1997; Donoghue und Doyle, 2000; Doyle, 1994; Friis und Endres, 1996; Taylor und Hickey, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Die Schwierigkeiten bei der Suche nach dem Aussehen und den Eigenschaften der ursprünglichsten Blüte und dem unmittelbaren gemeinsamen Vorfahren der Blütenpflanzen bestehen darin, daß es einerseits keine Fossilienfunde aus der Zeit gibt, in der die Blütenpflanzen vermutlich entstanden sind, und außerdem keinen nächsten Verwandten der Blütenpflanzen gibt, der direkter Nachfahre einer Linie ist, die zwischen dem Zeitpunkt der Auftrennung der Linien, aus denen die heutigen Gymnospermen und Angiospermen hervorgegangen sind vor ca. 300 Millionen Jahren, (Goremykin *et al.*, 1997)) und dem mutmaßlichen Ursprung der Blütenpflanzen (vor vermutlich maximal 140 Millionen Jahren) entstanden ist. Die ältesten Fossilienfunde von Blütenpflanzen aus der Kreidezeit vor ca. 130 Millionen Jahren (Crane *et al.*, 1995; Endress, 1994) weisen bereits eine sehr große Anzahl an verschiedenen Familien auf, was auf eine besonders rasche adaptive Radiation dieser Pflanzengruppe schließen läßt (Crane *et al.* 1995). Die Linie, die zu den heutigen Angiospermen führt, trennte sich aber gemäß molekularen Befunden schon vor ca. 300 Millionen Jahren von der Gymnospermenlinie (Goremykin *et al.*, 1997). In dieser Zeitspanne, die zwischen dem Beginn der Angiospermenlinie und den ersten Fossilienfunden von Angiospermen liegt, können sich die heute lebenden als ursprünglichsten angesehenen Angiospermenblüten schon sehr weit vom ersten Angiospermen-Blütentyp wegentwickelt haben. Neuere molekulare Untersuchungen weisen zunehmend verlässlich darauf hin, daß in den *Amborellaceae*, *Nymphaeaceae* und einer Klade aus *Schisandra*, *Illicium*, *Trimenia* und *Austrobaileya* (die sogenannte ANITA-Gruppe) die basalste Gruppe der heutigen Blütenpflanzen zu sehen ist (Qiu *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 1999a; Soltis *et al.*, 1999b). Es ist aber unwahrscheinlich, daß die ursprünglichsten Blütenpflanzen das auffällige Perianth der ANITA-Gruppe besaßen, denn die meisten frühen Fossilien zeigen eher kleine, unauffällige Blüten (Albert *et al.*, 1998; Crane *et al.*, 1995; Friis *et al.*, 1997;

Krassilov, 1991). Nachdem bereits weitgehend untersucht ist, was dem Grundbauplan der Blüte einer höheren Angiosperme biologisch zugrunde liegt (in Abschnitt 1.4. beschrieben), werden heute zur Evolution und Ursprung der Blüte immer noch folgende Fragen gestellt:

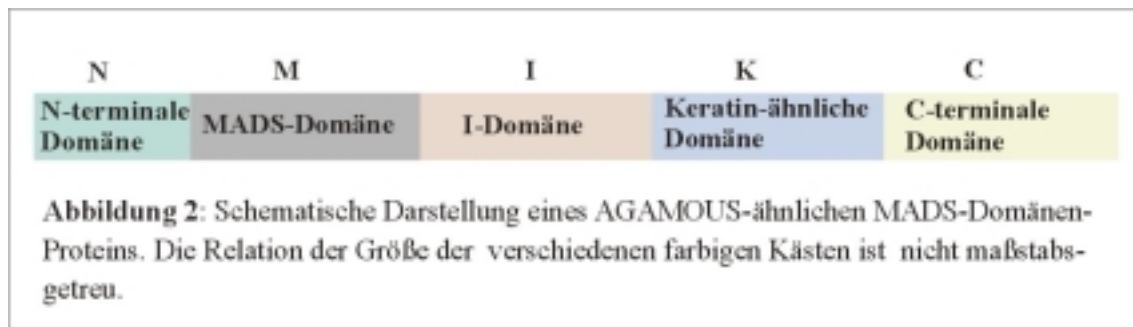
Wie und woraus ist die Blüte in der Evolution der Landpflanzen entstanden?

- Welche Strukturen der Nichtblütenpflanzen sind Blütenorgan-homologe Strukturen?
- Wie sah der letzte gemeinsame Vorfahre der Blütenpflanzen aus?
- Wie sah die ursprünglichste Blüte aus?

Heute wird zunehmend versucht, die Lücke mit molekularbiologischen genetischen Markern zu überbrücken, die zwischen den heute lebenden nächsten Verwandten der Angiospermen, nämlich den Gymnospermen, zu den Angiospermen besteht. Diese Herangehensweise wird auch in dieser Arbeit genutzt, in der die *AGAMOUS*-Genfamilie untersucht wird, eine Genfamilie, die für den Grundbauplan der Blüte maßgeblich ist, die aber auch Mitglieder aus Nichtblütenpflanzen einschließt, nämlich die Gymnospermen. Damit ergibt sich die Möglichkeit zu untersuchen, wie die Gene evolviert sind, die beim Grundbauplan der Blüte mitwirken, und welche Aufgabe solche Gene aus Nichtblütenpflanzen haben, deren orthologe Gene in Blütenpflanzen die Identität der Blütenorgane mitbestimmen. Die *AGAMOUS*-Genfamilie umfasst alle Mitglieder der in Abbildung 1 dargestellten C/D-, C- und D-Funktionsgene und ist eine Subfamilie der MADS-Box-Multigenfamilie.

1.2 Die *AGAMOUS*-Genfamilie ist eine Subfamilie der MADS-Box-Genfamilie

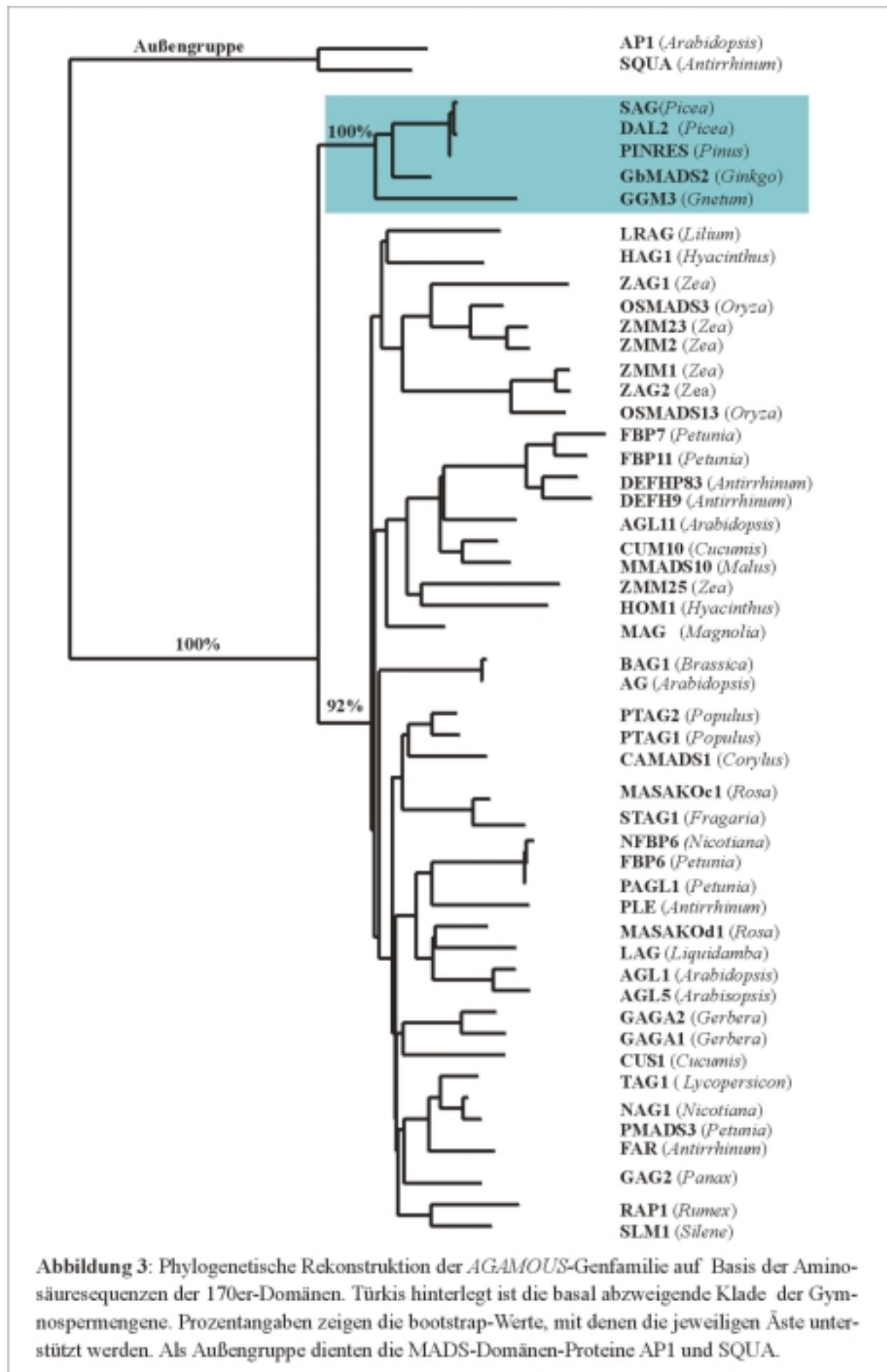
MADS ist ein Akronym für vier Gene eines Gentyps, der ein hochkonserviertes DNA-bindendes Strukturmotiv beinhaltet, die sogenannte MADS-Box: *MCM1* aus *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS* aus *Arabidopsis thaliana*, *DEFICIENS* aus *Antirrhinum majus* und *SRF* aus *Homo sapiens*. MADS-Box-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die DNA als Proteindimere binden. Die MADS-Box-Genfamilie umfasst inzwischen schon ca. 500 Gene, die sich wiederum in zum Teil sehr klar abgegrenzte Unterfamilien gliedern. Die *AGAMOUS*-Genfamilie ist eine Subfamilie der MADS-Box-Genfamilie des für Pflanzen charakteristischen MIKC-Typs. MIKC ist ein Akronym für die Strukturabfolge verschiedener Proteindomänen. Die MADS-Domäne besteht aus 57 Aminosäuren und ist der DNA-bindende Teil des Proteins (Purugganan *et al.*, 1995). Nach der MADS-Domäne folgt die sogenannte I-Domäne (I steht für *intervening*), die nur schwach konserviert und in ihrer Länge variabel ist (Ma *et al.*, 1991; Münster *et al.*, 1997). Die I-Domäne erhöht wahrscheinlich die Spezifität der Proteindimerisierung, die dann mittelbar auch die Spezifität



der DNA-Bindung erhöht (Purugganan *et al.*, 1995). Der I-Domäne folgt dann die Pflanzen-MADS-Domänen-Proteine kennzeichnende K-Domäne (K steht für Keratin-ähnlich) (Theißen und Saedler, 1995; Theißen *et al.*, 1996). Die K-Domäne spielt wie die I-Region bei der Proteindimerisierung eine wichtige Rolle (Shore und Sharrocks, 1995; Riechmann und Meyerowitz, 1997). Die C-Domäne ist die am wenigsten konservierte Domäne der MADS-Domänen-Proteine. Sie spielt eine Rolle bei der Ausbildung ternärer Komplexe von MADS-Domänen-Proteinen (Egea-Cortines *et al.*, 1999) und trägt zur Transkriptionsaktivierung bei (Theißen *et al.*, 2000). Die meisten Mitglieder der *AGAMOUS*-Genfamilie gehören zum seltenen NMIKC-Typ der MADS-Box-Genfamilie (Abb.2). Eine Verlängerung des Proteins vor der MADS-Domäne, die sogenannte N-terminale Verlängerung, ist eine Struktur, deren Bedeutung noch unklar ist. Auch die Konsensussequenzen, an die MADS-Domänen-Proteine binden, sind konserviert. MADS-Domänen-Proteine binden die DNA-Sequenz CC(A/T)₆GG, sogenannte CArG-Boxen (Hill *et al.*, 1998). CArG-Boxen befinden sich in vielen Promotorsequenzen von MADS-Box-Genen, aber auch in denen von vielen anderen Genen (Shore und Sharrocks, 1995).

1.3 Die *AGAMOUS*-Genfamilie ist monophyletisch

Von der *AGAMOUS*-Genfamilie sind derzeit 49 Mitglieder bekannt, die aus unterschiedlichen Samenpflanzen isoliert worden sind (Abb.3). Kein *AGAMOUS*-ähnliches Gen konnte bisher aus Farnen, Moosen oder niedrigeren Organismen isoliert werden. Die *AGAMOUS*-Genfamilie zeichnet sich relativ zu anderen Subfamilien der MADS-Box-Genfamilie durch eine besonders hohe Konservierung der Gene aus den unterschiedlichen Spezies aus. Besonders die bei den meisten MADS-Box-Genen am wenigsten konservierten Bereiche der



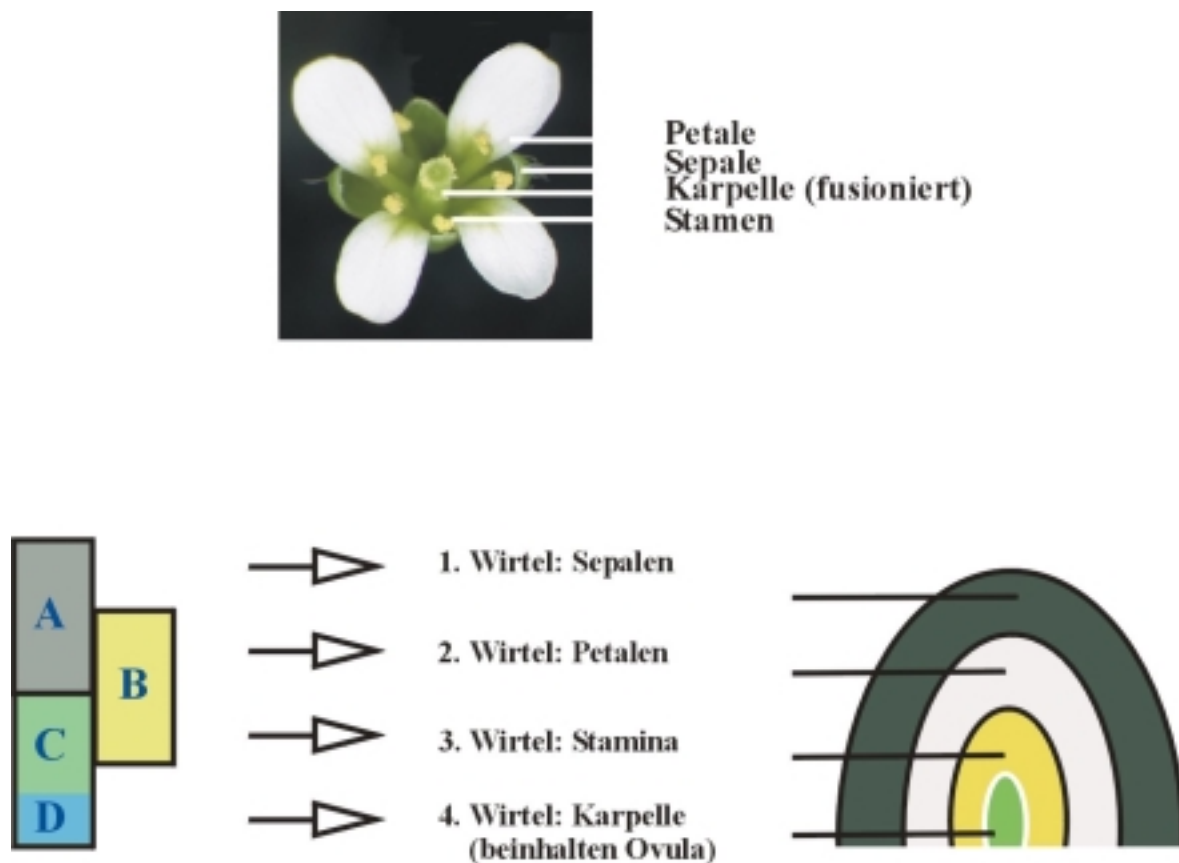
K-Region und des C-terminalen Bereiches weisen innerhalb der *AGAMOUS*-ähnlichen MADS-Box-Gene eine viel höhere Ähnlichkeit zueinander auf als die Gene aus anderen Subfamilien zueinander. Die meisten *AGAMOUS*-ähnlichen Gene haben außerdem eine um ca. 30 Aminosäuren längere I-Region als andere MADS-Box-Gene. Phylogenetische Analysen mit den 170er-Domänen [170 Aminosäuren umfassender Aminosäureabschnitt, der die MADS-Domäne, die I-Domäne und einen Teil der K-Domäne einschließt (Münster *et al.*, 1997)] aller Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie zeigen, daß die Gymnospermengene basal zu allen Angiospermengenen liegen und monophyletisch sind (Abb.3) (Winter *et al.*, 1999).

1.4 Das ABC-Modell der Blüte in höheren Blütenpflanzen

Besonders gut untersucht ist die Rolle vieler MADS-Box-Gene bei der Blütenentwicklung der Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* und *Petunia hybrida*. Es konnte gezeigt werden, daß Vertreter der MADS-Box-Genfamilie an der Initiierung der generativen Wachstumsphase, der Identitätsdeterminierung der Blütenmeristeme sowie der Festlegung von Position und Identität der einzelnen Blütenorgane maßgeblich beteiligt sind (Coen und Meyerowitz, 1991; Ma, 1994; Meyerowitz, 1997; Riechmann und Meyerowitz, 1997; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990). Mit Hilfe des ABC-Modells der Blüte (Abb.4) können florale homöotische Gene klassifiziert werden (Coen und Meyerowitz, 1991). Mutationen der Blütenorganidentität dieser Pflanzen fallen in vier Funktionsklassen, A, B, C und D. Fast alle bisher bekannten floralen Blütenorganidentitätsgene stammen aus der Familie der MADS-Box-Gene (Riechmann und Meyerowitz, 1997; Theißen *et al.*, 2000). Vollständiger Verlust der A-Funktion verursacht die Transformation der ersten beiden Wirtel, Sepalen und Petalen, in Karpelle und Stamina. Vollständiger Verlust der B-Funktion verursacht die Transformation der mittleren beiden Wirtel, Petalen und Stamina in Sepalen und Karpelle. Vollständiger Verlust der C-Funktion, verursacht die Transformation der inneren beiden Wirtel, Stamina und Karpelle, in Petalen und Sepalen. Studien der jeweiligen Doppelmutanten ergaben, daß jedem Blütenwirtel von einer individuellen Kombination der A-, B- und C-Funktionsgene seine Identität gegeben wird, nämlich der 1. Wirtel (Sepalen) von A-Funktionsgenen, der 2. Wirtel (Petalen) von A- und B-Funktionsgenen, der 3. Wirtel (Stamina) von B- und C-Funktionsgenen und der 4. Wirtel (Karpelle) nur von C-Funktionsgenen (Weigel *et al.*, 1994). An *Petunia hybrida* wurde die D-Funktion beschrieben und definiert (Colombo *et al.*, 1995). Vollständiger Verlust der D-Funktion, die von den Genen *FBP7* und *FBP11* ausgeführt wird, führt dazu, daß Ovula zu karpelloiden Strukturen umgewandelt werden. Bis heute wurde die generelle Gültigkeit des ABC-Modells für alle Blütenpflanzen allerdings eingeschränkt. Für

die Blütenentwicklung der höheren Eudikotylen *Arabidopsis*, *Antirrhinum* und *Petunia* konnten in den letzten Jahren Unterschiede aufgedeckt werden, sogar zwischen *Antirrhinum* und *Petunia*, zwei sehr nah verwandten Arten (Davies *et al.*, 1999, Weigel und Meyerowitz, 1994). Außerdem wurde auch das ABC-Modell an *Arabidopsis* erweitert und verfeinert (Chen *et al.*, 1999; Ferrandiz *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2000). Für die evolutionsbiologische Fragestellung des Blütenursprungs müssen solche Systeme zusätzlich in phylogenetisch informativen Taxa untersucht und miteinander verglichen werden.

Abbildung 4: Schematische Darstellung des ABC-Modells der Blütenentwicklung in *Arabidopsis thaliana*.



1.5 Die Gene aus Angiospermen und aus Gymnospermen der *AGAMOUS*-Genfamilie wirken in reproduktiven Organen

Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über einige Funktionsstudien der Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie gegeben. Alle bisher untersuchten Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie zeichnen sich dadurch aus, daß sie in generativen Organen angeschaltet sind. Entweder in männlichen Blütenorganen, den Stamina, und in weiblichen Blütenorganen, den Karpellen, oder in Samenanlagen, den Ovula. *AGAMOUS* (*AG*) ist das florale homöotische C-Funktionsgen aus *Arabidopsis thaliana*. Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt wurde, hat die C-Funktionsverlustmutante keine generativen Blütenorgane, sondern anstelle der Stamina im 3. Wirtel wachsen Petalen, und anstelle der Karpelle im 4. Wirtel wachsen Sepalen. Im 4. Wirtel wachsen dann in mehrfacher Wiederholung zwei Wirtel Petalen und ein Wirtel Sepalen, das heißt, daß *AG* auch für die Determinierung der Blüte entscheidend ist. Es wurde gezeigt, daß *AG* solche Gene regulieren muß, die die Stamenentwicklung und Karpellentwicklung determinieren (Riechmann *et al.*, 1999; Yanofsky *et al.*, 1990). *AG*-RNA wurde in jungen Blüten im 3. und 4. Wirtel nachgewiesen, später nur noch in speziellen Zellschichten dieser Wirtel. In *apetala2*-Mutanten (*ap2*) (entspricht der A-Funktionsmutanten) weitet sich die *AG*-Expression auch auf die ersten beiden Wirtel der Blüte aus. Somit ist die *AG*-Expression direkt oder indirekt von *AP2* abhängig (Bowman *et al.*, 1991). Mit Überexpressionsstudien von *AG* wurde die Hypothese getestet, ob *AG* und *AP2* antagonistisch wirken. Dabei wurde festgestellt, daß die ektopische *AG*-Expression in den ersten beiden Wirteln die Expression von *AP2* hemmt und die Organe der äußeren beiden Wirtel, Sepalen und Petalen, stark in Richtung von Karpellen bzw. Stamina verändert (Mizukami und Ma, 1992). Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Bindeeigenschaften von *AG* wurde herausgefunden, daß die MADS-Domäne und die I-Region des *AG*-Proteins notwendig und hinreichend sind, um DNA als Dimer zu binden. Die N-terminale Extension vor der MADS-Domäne von *AG* ist nicht erforderlich, um bei der ektopischen *AG*-Überexpression einen *ap2*-ähnlichen Phänotyp zu erzielen (Mizukami *et al.*, 1996). Auf Proteinebene wurde außerdem gezeigt, daß die K-Domäne von *AG* mit den K-Domänen anderer MADS-Domänenproteine interagiert, nämlich *AGL2*, *AGL4*, *AGL6* und *AGL9* (Fan *et al.*, 1997), von denen *AGL2*, *AGL4* und *AGL9* neuerdings synonym *SEPALLATA1* (*SEP1*), *SEP2* und *SEP3* genannt werden, weil die Blüte der Tripelmutante für *sep1*, *sep2* und *sep3* nur noch aus Sepalen besteht (Pelaz *et al.*, 2000). Zusammenfassend werden *AG* drei wichtige Funktionen zugeschrieben:

-
- erstens das Vorsehen von Determination der Blüte und eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation (wie oben beschrieben beginnen *agamous*-Mutanten statt des 4. Wirtels eine komplett neue Blüte, das wiederholt sich, bis ca. zehn neue Blüten in der Anfangsblüte entstanden sind),
 - zweitens die Identitätsgebung von Stamina und Karpelle, dabei muß AG in den Zellschichten L2 und L3 aktiv sein (Sieburth *et al.*, 1998)
 - und drittens die negative Kontrolle von Genen, die die Identitätsgebung von Petalen und Sepalen steuern.

Weiterhin wird die Rolle von AG bei der Entwicklung der Ovula diskutiert. Das Homöoboxgen *BELL1*, das für die Ovulaentwicklung in *Arabidopsis thaliana* wichtig ist, ist von der Interaktion mit AG abhängig (Western und Haughn, 1999). Als AG positiv regulierende Faktoren konnten *LFY* und *API*, als AG negativ regulierende Faktoren *AP2* und *LUG* identifiziert werden (Conner und Liu, 1999; Meyerowitz, 1994; Western und Haughn, 1999). *HUA1* und *HUA2* sind möglicherweise Transkriptionsfaktoren einer neuen Proteinfamilie, die auf der selben hierarchischen Ebene wie AG wirken und die AG-Wirkung erleichtern (Chen und Meyerowitz, 1999). Die Überexpression des putativen AG-orthologen Gens aus der Tabakpflanze *Brassica napus*, *BAG*, in *Arabidopsis thaliana* ergab ähnliche Ergebnisse wie die Überexpression von AG in *Arabidopsis thaliana*. Petalen bzw. Sepalen wurden in staminoide Strukturen im 2. Wirtel und in karpelloide Strukturen im 1. Wirtel transformiert (Mandel *et al.*, 1992). Ergebnisse der heterologen Überexpression des putativen AG-orthologen Gens, *OsMADS3* aus Reis in Tabak führte zu staminoiden Strukturen an Petalen und zu leicht karpelloiden Sepalen (Kang *et al.*, 1995). In zunehmend mehr Pflanzen wurde inzwischen anstelle eines AG verwandten Gens ein Genpaar gefunden (Abb.3). So wurde in *Antirrhinum majus* neben *PLE* (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990), dem putativen AG-orthologen Gen, *FAR* isoliert, das zum Teil redundante aber auch nicht überlappende Funktionen bei der Stamenentwicklung hat (Davies *et al.*, 1999). *FBP6* und *pMADS3* wurden aus *Petunia hybrida* isoliert, die zu AG die größte Sequenzähnlichkeit zeigen (Abb.3) (Kater *et al.*, 1998). *SHP1* und *SHP2*, ebenfalls zwei Gene aus *Arabidopsis thaliana*, die Mitglieder der *AGAMOUS*-Genfamilie sind, spielen eine Hauptrolle bei der Fruchtentwicklung (Liljegren *et al.*, 1998). *CUS1* eine Gen aus Gurke, das nah verwandt zu *SHP1* und *SHP2* ist, wird in dem Gewebe exprimiert, das die Ovula umgibt (Filipecki *et al.*, 1997). Aus *Zea mays* wurden bisher fünf Gene isoliert. *ZMM2*, *ZMM23*, *ZMM1*, *ZAG2* und *ZAG1*. *ZMM2* und *ZMM23* sowie *ZAG2* und *ZMM1* sind jeweils die am nächsten verwandten paralogen Gene (Theißen *et al.*, 1995). *ZMM1* und *ZAG2* sind Ovula-spezifisch exprimiert (Schmidt *et al.*,

1993). Während in einer *zag1*-Mutanten ein Verlust der Blütendeterminierung zu beobachten ist, ist die Bildung der Stamina größtenteils unbeeinträchtigt, einige Zellen aber, die sonst Karpellprimordium werden, bekommen die Fähigkeit, weiter zu proliferieren und das Programm der Blütenorganinitiation neu zu beginnen. Das Expressionsmuster von *ZMM2* und *ZAG1* ist im Detail unterschiedlich: *ZMM2* wird stärker in Stamina, *ZAG1* ungefähr gleichstark in Karpellen und Stamina exprimiert (Mena *et al.*, 1996). Eine unerwartete Funktion wurde bei dem Gen *TAG* aus Tomate beobachtet: Zwar liegt sein Wirkungsort auch in der Blüte, aber statt in Stamina, Karpelle und Ovula, spielt dieses Gen eine Schlüsselrolle beim Reifen der Sepalen (Ishida, 1998). Auch aus vielen anderen Blütenpflanzen sind Genpaare isoliert worden, die in die *AGAMOUS*-Genfamilie fallen, wie zum Beispiel *MASAKO1* und *MASAKO2* aus *Rosa rugosa* und *PTAG1* und *PTAG2* aus *Populus trichocarpa*. Aus *Petunia hybrida* wurden *FBP7* und *FBP11* isoliert, zwei Gene, die größere Sequenzähnlichkeit zu *AGL11* aus *Arabidopsis thaliana* als zu *AG* haben, und die wie *AGL11* spezifisch in Ovula exprimiert werden (Rounsley *et al.*, 1995). Eine Cosuppression von *FBP7* und *FBP11* bewirkt, dass anstelle von Ovula stigmatisches Gewebe wächst (Angenent *et al.*, 1995). Die Überexpression von *FBP11* in der gesamten Blüte von *Petunia hybrida* führt zu ektopischen Ovula auf der Außenseite der Petalen und auf der Innenseite der Sepalen (Colombo *et al.*, 1995). Putative *AG*-orthologe Gene aus Gymnospermen sind zum Beispiel aus den Coniferen *Picea mariana* und *Picea abies*, und der Gnetalen *Gnetum gnemon* isoliert worden (Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß in Gymnospermen bisher nur jeweils ein Gentyp gefunden wurde, im Gegensatz den Blütenpflanzen, die oft zwei oder mehr Gene besitzen, die in die *AGAMOUS*-Genfamilie fallen. Die Gymnospermengene, *SAG1* (*Picea mariana*), *DAL2* (*Picea abies*) und *GGM3* (*Gnetum gnemon*) werden alle ausschließlich in reproduktiven Organen exprimiert (Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999). In den weiblichen Zapfen der Coniferen sind die *DAL2*-Transkripte in den Samenschuppen nachweisbar, nicht aber in Ovula. Ektopische Überexpressionen von *DAL2* und *SAG1* in der Blüte von *Arabidopsis thaliana* zeigen Blütenphänotypen, die der ektopischen Überexpression von *AG* und *BAG* in der Blüte von *Arabidopsis thaliana* ähneln (Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998). Bei diesen und auch den vorher erwähnten heterologen ektopischen Überexpressionen im Wildtyp-Hintergrund von *Arabidopsis thaliana* wurde die Expression des endogenen C-Funktionsgens *AG* und der A-Funktionsgene *API* und *AP2* nicht untersucht. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß *DAL2* und *SAG1* wie auch andere heterolog exprimierte *AG*-ähnliche Gene an regulative Elemente der endogenen C- und A-Funktionsgene binden

und deren Expression beeinflusst. So ist nicht geklärt, ob die Phänotypen heterologer Überexpressionen im Wildtyp-Hintergrund von *Arabidopsis thaliana* nicht auf die veränderte Expression der endogenen C- und A-Funktionsgene zurückzuführen sind.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob C-funktionale genetische Mechanismen der Gene des ABC-Blütenmodells auch schon in den Nichtblütenpflanzen, also in allen Samenpflanzen konserviert sind. Über die möglicherweise seit 300 Millionen Jahren konserviert gebliebenen Mechanismen, die auch bei dem Grundbauplan der Blüte moderner Blütenpflanzen essentiell sind, soll die phylogenetische Lücke zwischen den Gymnospermen und Angiospermen weiter geschlossen und die Evolution und der Ursprung der Blüte besser verstanden werden. Zuerst soll eine detaillierte Stammbaumanalyse der *AGAMOUS*-Genfamilie vorgenommen werden, in der die Evolution und Diversifizierung aller Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie in möglichst hoher Auflösung nachvollzogen werden kann. Aus den daraus resultierenden Hauptkladen soll jeweils mindestens ein Gen in *Arabidopsis thaliana* mithilfe des konstitutiv exprimierenden Promotors aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus, CaMV-35S, überexprimiert werden, um die Funktion der jeweiligen Gene zu untersuchen und ein funktionelles Klassifizierungskriterium der Gene dieser sehr umfangreichen Genfamilie zu entwickeln. Als Vertreter eines Nacktsamergens wurde *GGM3* aus *Gnetum gnemon* ausgewählt, als Vertreter eines Gens einer basalen Angiospermen wurde *MAG* aus *Magnolia stellata*, als Vertreter von höheren Dikotylen wurden *PLE* und *DEFH9* aus *Antirrhinum majus*, als Vertreter von Monokotylen wurden *ZAG2*, *ZMM1*, *ZAG1*, *ZMM2* und *ZMM23* aus *Zea mays* ausgewählt. Außer einer genauen phänotypischen Untersuchung der transgenen Pflanzen soll die Expression der heterologen Gene und die Expression des endogenen *AG* bestimmt werden. Um die Auswirkung des endogenen *AG* im Vergleich zu dem überexprimierten Transgen in den Überexpressionsstudien voneinander trennen zu können, soll an einem Beispiel erstens getestet werden, ob die inneren beiden Wirtel der Funktionsverlustmutante *agamous* durch die Überexpression eines heterologen *AG*-Gens in Stamina und Karpelle restauriert werden können, und zweitens, ob die Überexpression eines heterologen *AG*-Gens ähnliche Phänotypen in den äußeren beiden Blütenwirteln von *agamous* (Sepalen und Petalen) erzielt wie im Wildtyp-Hintergrund (äußere zwei Wirtel sind wie in *agamous* Sepalen und Petalen). Die Vergleichsanalyse der Überexpression im Wildtyp und in *agamous* wurde mit dem putativ *AG*-orthologen Gen, *GGM3*, aus der Gymnospermen *Gnetum gnemon* vorgenommen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Für diese Arbeit wurden Chemikalien der Firmen BIOMOL (Hamburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Faust (Köln), Gibco-BRL (Neu-Isenburg), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Saekem (USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) verwendet. Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalmbach), Stratagene (Heidelberg), Gibco BRL (Neu-Isenburg) und Roche (Mannheim) bezogen und nach Anleitung des Herstellers angewendet. Von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) wurden die Radioisotope bezogen. Die spezifische Aktivität des [α ³²P] dCTP betrug 3000 Ci/mmol.

2.2 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

Für Plasmidtransformationen und die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Van Larabeke *et al.*, 1974) verwendet. Als Expressionsvektor zur Pflanzentransformation durch *Agrobacterium tumefaciens* wurde der Plasmidvektor pBAR-A mit den Resistenzgenen gegen BASTA und Kanamycin verwendet (Guillermo Cardon, pers. Mitteilung). Als Klonierungsvektor für Überexpressionskonstrukte wurde pRT-100 verwendet, der den CaMV-35S-Promotor und ein Ampicillinresistenzgen als Markergen enthält (Töpfer *et al.*, 1993).

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Medien, Puffer und Lösungen nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.4 Arbeit an *Arabidopsis thaliana*

2.4.1 Pflanzenmaterial

Es wurden wildtypische Pflanzen der Ökotypen *Arabidopsis thaliana* L. Columbia und *Arabidopsis thaliana* L. Landsberg erecta verwendet. Ferner wurden folgende Mutanten verwendet:

Bestellnummer	Mutante	
der Samen		
N 29:	<i>ap2-1</i>	(<i>apetala-2</i>)
N 25:	<i>ag</i>	(<i>agamous</i>)
N 8853:	<i>clf-2</i>	(<i>curly leaf</i>)
CS 25:	<i>ag</i>	(<i>agamous</i>)
CS 3082:	<i>ap2-2</i>	(<i>apetala-2</i>)
CS 6239:	<i>ap2-5</i>	(<i>apetala-2</i>)
CS 8853:	<i>clf-2</i>	(<i>curly leaf</i>)

Die Samen der hier aufgelisteten Mutanten wurden über das Arabidopsis Stock Center, USA und GB bezogen.

2.4.2 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen wurden in Klimakammern (Heraeus Vötsch, Balingen) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/ 16 h Dunkel) oder Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel) bei 20 °C angezogen.

2.4.3 Kreuzungen

Es wurde folgende Kreuzung durchgeführt: *AG / ag* x *35S::GGM3 / 35S::GGM3* ; *AG / AG*
Heterozygote Pflanzen für die *agamous*-Mutation wurden als Empfängerpflanzen verwendet. Die Karpelle sehr junger Blüten dieser Pflanzen wurden freipräpariert und nach zwei Tagen kontrolliert, ob sie zum Zeitpunkt der Freipräparation bereits befruchtet waren und aus dem Karpell Schötchen wuchsen. Unbefruchtete Karpelle wurden dann mit Pollen der Überexpressionslinie *35S::GGM3* (Klonname: *35S::JM1b.4*) bestäubt. Die F1-Nachkommen aus dieser Kreuzung wurden mit 0,1%er BASTA-Lösung selektiert und die nach Selbstung entstandene F2-Generation aller selektierten F1-Pflanzen erneut ausgesät. Unter den Nachkommen einiger F2-Nachkommen konnten in der segregierenden Population durch BASTA-Selektion und spezifische Amplifizierung und nachfolgende Sequenzierung des *AG*-Locus auch die Zielpflanzen *35S::GGM3* ; *ag / ag* identifiziert werden.

2.4.4 *In planta*-Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Je 8 *Arabidopsis*-Samen des Ökotyps Columbia wurden in Töpfen mit 12 cm Durchmesser ausgesät und sechs bis acht Wochen bei Kurztag gehalten. Nach weiteren zwei Wochen unter Langtagbedingungen wurden die Hauptinfloreszenzen zurückgeschnitten, um eine stärkere Infloreszenzverzweigung zu bewirken. Nach weiteren zwei Wochen unter

Langtagbedingungen konnten die jungen Infloreszenzen gut transformiert werden. Die Transformation erfolgte, indem je ein Topf mit den vorbereiteten Pflanzen kopfüber fünf Minuten lang in eine Suspension getaucht wird, die aus Infiltrationsmedium gesättigt mit *Agrobacterium tumefaciens* besteht. Transgene T1-Keimlinge wurden 3 und 6 Tage nach der Aussaat mit 0,1%er BASTA-Lösung besprüht und so selektiert.

2.4.4.1 Nomenklatur der verschiedenen transgenen Generationen

T0-Generation:

Die unterstrichenen Bezeichnungen der transgenen T0-Generation stehen für die Pflanzen, bei denen die Transformation erfolgreich verlaufen ist. Aus den nicht unterstrichenen T0-Generationen, sind keine transgenen Nachkommen hervorgegangen. Jeweils vier Töpfe mit einem Durchmesser von 12 cm (im Fall von 35S::*ZMM23* fünf Töpfe) mit jeweils 7 bis 8 Columbia-Wildtyp-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*, wurden für die Transformation verwendet, und in jeweils 4 Bechergläser getunkt mit:

- 35S::*GGM3* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM1a, JM1b, JM1c, JM1d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*PLE* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM7a, JM7b, JM7c, JM7d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*DEFH9* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM8a, JM8b, JM8c, JM8d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*MAG* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM10a, JM10b, JM10c, JM10d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*ZAG1* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM3a, JM3b, JM3c, JM3d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*ZMM2* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM2a, JM2b, JM2c, JM2d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*ZMM23* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM6a, JM6b, JM6c, JM6d, JM6e (a-e je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*ZAG2* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM5a, JM5b, JM5c, JM5d, (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*ZMM1* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM4a, JM4b, JM4c, JM4d, (a-d je pro Topf und Medienlösung)

- 35S::*AG* transgenen *Agrobacterium tumefaciens* versetzten Medien

Nomenklatur: JM9a, JM9b, JM9c, JM9d (a-d je pro Topf und Medienlösung)

T1-Generation:

Jeder Topf, bei dem die Transformation erfolgreich (BASTA-Selektion) war, ergab mehr als 10 transgene Pflanzen, (in den meisten Fällen mehr als 50 transgene Pflanzen). Es wurden immer Samen von der T1-Generation von mindestens 10 einzelnen Pflanzen geerntet, die einen ähnlichen transgenen Phänotyp zeigten.

T2-Generation:

Die aus der T1-Generation gewonnen Samen wurden ausgesät (wenn möglich pro Transgen mindesten 40 Individuen), und die daraus wachsenden Pflanzen unter folgender Nomenklatur untersucht:

35S::*GGM3*-Linien: JM1b1-JM1b15

JM1c1-JM1c15

JM1d1-JM1d15

35S::*PLE*-Linien: JM7a1-JM7a10

JM7b1-JM7b10

JM7c1-JM7c10

JM7d1-JM7d10

35S::*DEFH9*-Linien: JM8a1-JM8a10

JM8b1-JM8b10

35S::*MAG*-Linien: JM10a1-JM10a10

JM10b1-JM10b10

JM10c1-JM10c10

JM10d1-JM10d10

35S::*ZAG1*-Linien: JM3a1-JM3a10
JM3b1-JM3b10
JM3c1-JM3c10
JM3d1-JM3d10

35S::*ZMM2*-Linien: JM2a1-JM2a15
JM2c1-JM2c15
JM2d1-JM2d15

35S::*ZMM23*-Linien: JM6a1-JM6a10
JM6b1-JM6b10
JM6c1-JM6c10
JM6d1-JM6d10
JM6e1-JM6e10

35S::*ZAG2*-Linien: JM5a1-JM5a10
JM5b1-JM5b10
JM5c1-JM5c10
JM5d1-JM5d10

35S::*ZMM1*-Linien: JM4a1-JM4a10
JM4b1-JM4b10
JM4c1-JM4c10
JM4d1-JM4d10

35S::*AG*-Linien: JM9a1-JM9a15
JM9b1-JM9b15

T3- und T4-Generationen wurden je nach Materialbedarf für phänotypische und molekulare Untersuchungen wieder ausgesät.

2.4.5 Untersuchungen am Binokular

Blattphänotypen und Blütenphänotypen von *Arabidopsis thaliana* wurden fotografiert. Die Blüten wurden in stärkerer Vergrößerung unter dem Binokular (WILD-Heerbrugg, Photomakroskop) untersucht.

2.4.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die aus den oben beschriebenen Transformationsexperimenten hervorgegangenen transgenen Blüten von *Arabidopsis thaliana* wurden mithilfe eines Rasterelektronenmikroskopes

DSM940 der Firma Zeiss (Oberkochen) auf die Zellstruktur der Blütenorganoberflächen hin analysiert. Die Präparation der Blüten erfolgte durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und einer Goldbedampfung unter Argonatmosphäre (Cryotrans System CT1500, Oxford Instruments, Großbritannien) nach der Sublimierung von Wasserkristallen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden Midi- und Maxipräparationen anhand des Protokolls von QIAGEN durchgeführt. Die Isolierung kleinerer DNA-Mengen erfolgte nach dem Protokoll der TELT-Methode (Wilmzig 1985).

2.5.2 Präparation genomischer DNA

Die Gewinnung genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* für DNA-Geltransferanalysen basierte auf dem Protokoll von Rogers und Bendich (1988). Gemörstertes Pflanzenmaterial wurde in 5 ml/g Frischgewicht 2 x CTAB- Puffer (2% CTAB (w/v), 100 mM Tris HCl (pH: 8,0), 20 mM EDTA (pH:8,0), 1,4 M NaCl) aufgenommen und 20 min. bei 65°C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden in 1 Vol. Chloroform extrahiert, mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen. Einer anschließenden 50 µg/ml RNase-A Behandlung (1 h bei 37°C) folgte eine zweite Aufreinigung mit 1 Vol. Chloroform und eine Fällung der DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH: 5,2) und 0,7 Vol. Isopropanol. Die DNA wird in TE-Puffer bei 4°C gelagert. Für PCR-Analysen genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* wurde das DNA-Isolationsverfahren nach Edwards *et al.* (1991) angewendet.

2.5.3. Aufreinigen von PCR-Produkten und Gelelektion

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte nach Produktanleitung mit „PCR Purification Kit“ (QIAGEN) und „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN).

2.5.4 Präparation von RNA

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde mit dem „BIOMOL Total RNA Reagent“ der Firma BIOMOL (Hamburg) isoliert. Gemörstertes Pflanzenmaterial wurde in 1 ml/ 2g Frischmaterial BIOMOL aufgenommen, auf Eis 2 min. vorsichtig gemischt und mit 0,2 ml Chloroform versetzt und wieder vorsichtig gemischt. Die extrahierte RNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit RNase freier DNase 30 min. bei 37 °C verdaut und erneut einer Extraktion, diesmal mit SEVAG (Chloroform/Isoamylalkohol im Mischungsverhältnis 4:1)

unterzogen. Die RNA wurde in RNase freiem DEPC-behandeltem Wasser oder deionisiertem reinen Formamid gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.5 RNA-Aufreinigung

Im Fall einer DNase-Behandlung nach der RNA-Präparation wurde die RNA nach Herstellerangaben des „RNeasy Kit“ (QIAGEN) über spezielle Aufreinigungssäulchen aufgereinigt.

2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gestützte Verfahren

Polymerase-Kettenreaktionen wurden zur Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte sowie zur Amplifizierung spezifischer cDNAs eingesetzt (RT-PCR).

2.5.6.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Oligonukleotide (*primer*) wurden von Gibco-BRL (Großbritannien) oder MWG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen dieser *primer* sind im Anhang aufgelistet.

2.5.6.2 Standard-PCR

Polymerase-Kettenreaktionen zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte wurden in programmierbaren Thermoblöcken mit beheizbarem Deckel der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. Für die DNA-Synthese-Reaktion wurde taq-DNA-Polymerase und der dazugehörige 10 x Puffer der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Das Standard-PCR-Programm wird nachfolgend beschrieben: Nach 2 min. $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Denaturierung der komplementären DNA-Stränge) folgten 35 Zyklen der folgenden drei Teilschritte: 30 sek. Denaturierung bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 sek. *primer*-Anlagerung bei Temperaturen zwischen $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $68\text{ }^{\circ}\text{C}$, in Abhängigkeit zu der *primer*-Länge und *primer*-Basenzusammensetzung, schließlich 30-90 sek. DNA-Synthese bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach folgte ein 10 minütiger $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ Syntheseschritt, um noch nicht vollständige Synthesen zu beenden.

2.5.6.3 Revers transkribierte PCR (RT-PCR)

Als *template* für diese Polymerase-Kettenreaktionen dienten cDNAs, die künstlich aus RNA synthetisiert worden waren (siehe 2.5.7).

2.5.7 cDNA-Synthese

Aus aufgereinigter DNA-freier Gesamt-RNA wurden cDNA-Synthesen nach Herstellerangaben des Kits „First Strand cDNA Synthesis Using SUPERSRIPT™II for RT-PCR“ (QIAGEN) vorgenommen. Die präparierte cDNA wurde mit Aktinprimern in einer spezifischen PCR auf genomische DNA-Überreste überprüft.

2.5.8 Plasmidkonstruktion mit Einführen künstlicher Schnittstellen

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNAs sollten unter der Kontrolle des CaMV-35S Promotors exprimiert werden. Deshalb mussten die entsprechenden cDNAs im gleichen Leseraster wie der Promotor kloniert werden. Der pRT-100 Plasmidexpressionsvektor weist verschiedene Schnittstellen auf, die die Klonierung in das richtige Leseraster ermöglichen, z. B. dann, wenn die zu inserierende cDNA unmittelbar mit dem Start-ATG beginnt. Um das Start-ATG in eine der vorgesehenen Schnittstellen zu klonieren, mussten in alle cDNAs künstliche Schnittstellen erzeugt werden. In den im Anhang 8.2 aufgelisteten Oligonukleotiden ist entsprechend gekennzeichnet, wie die künstlichen Schnittstellen liegen.

cDNA (Herkunftsorganismus)	künstliche Schnittstelle am Start-ATG	künstliche Schnittstelle nach Stopkodon	35S-Kassette kloniert in pBAR-A über:	Plasmidname in pBAR-A
<i>GGM3</i> (<i>G. gnemon</i>)	NcoI	BamHI	HindIII	pJM1
<i>ZMM2</i> (<i>Z. mays</i>)	ApaI	BamHI	HindIII	pJM2
<i>ZAG1</i> (<i>Z. mays</i>)	NcoI	BamHI	EcoRI	pJM3
<i>ZMM1</i> (<i>Z. mays</i>)	ApaI	BamHI	HindIII	pJM4
<i>ZAG2</i> (<i>Z. mays</i>)	NcoI	BamHI	EcoRI	pJM5
<i>ZMM23</i> (<i>Z. mays</i>)	ApaI	BamHI	HindIII	pJM6
<i>PLE</i> (<i>A. majus</i>)	NcoI	BamHI	HindIII	pJM7
<i>DEFH9</i> (<i>A. majus</i>)	NcoI	BamHI	HindIII	pJM8
<i>AG</i> (<i>A. thaliana</i>)	NcoI	BamHI	EcoRI	pJM9
<i>MAG</i> (<i>M. stellata</i>)	NcoI	BamHI	HindIII	pJM10

2.5.9 Markierung von DNA-Sonden

Mit [α^{32} P] dCTP markierte DNA Sonden für DNA-Geltransferanalysen wurden mithilfe des Klenowenzym markiert und über die Säulchen des PCR Purification Kits der Firma QIAGEN (Hilden) aufgereinigt. Die Einbaurrate von markierten Nukleotiden wurde an einem Aliquot von 1 μ l aus dem Reaktionsansatz (100 μ l) durch einen Scintillationszähler bestimmt.

2.5.10 DNA-Geltransfer-Analysen

Für DNA-Geltransferanalysen (nach Sambrook *et al.*, 1989) wurde genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Kapillarblot auf eine Hybond N+ Nylonmembran (Amersham Buchler, Braunschweig) transferiert. Durch eine fünfminütige UV-Behandlung wurde die DNA auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden fand in 10 x SSC bei 68 °C über Nacht statt. Um überschüssige Sonde wieder zu entfernen, wurden die Membranen zweimal 10 min. in 2 x SSC und 1 % SDS, zweimal 10 min. in 1 x SSC und 1 % SDS und einmal 15 min. in 0,1 x SSC und 1 % SDS bei 68 °C gewaschen.

2.5.11 Sequenzierungen

Die Sequenzierarbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind von der ADIS-Einheit (Automatic DNA Isolation and Sequencing) des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln durchgeführt worden.

2.6 Computeranalysen

2.6.1 Sequenzanalysen

Die Sequenzanalysen wurden mit Hilfe der Programme AssemblyLIGN TM 1.0.9 und MacVector TM 6.5 durchgeführt.

2.6.2 Stammbaumberechnungen

Für Phylogenierekonstruktionen wurden die Programme Wisconsin package V.10.0 UNIX der Genetics Computergroup GCG (USA) und PHYLIP Phylogeny Interference Package V.3.5 (Department of Genetics, The University of Washington) verwendet. Die zugrundeliegende Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm Pileup des GCG-Programmpakets erstellt. Die multiplen Sequenzdateien wurden nach Konvertierung in ein von PHYLIP lesbares Dateiformat verwendet, um eine Distanzmatrix mit Hilfe des Programmes Protdist des PHYLIP-Programmpakets zu erstellen. Diese Distanzmatrix diente als Grundlage zur

Berechnung der phylogenetischen Bäume mittels Neighbor Joining Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) durch das Programm Neighbor des PHYLIP-Programmpakets. Um die Stabilität der Topologie zu ermitteln, wurden jeweils 100 Bootstrap-Proben mittels des PHYLIP-Programms Seqboot erstellt, und die daraus resultierenden Phylogenierekonstruktionen miteinander verglichen und auf den ersten phylogenetischen Baum projiziert. Die Stammbäume wurden mithilfe des PHYLIP-Programms Retree gewurzelt.

3. Ergebnisse

3.1 Phylogenetische Untersuchung der *AGAMOUS*-Genfamilie

Als Voraussetzung für alle funktionellen Untersuchungen der *AGAMOUS*-Genfamilie wurden zunächst die Genverwandtschaftsverhältnisse mit Hilfe von Phylogenierekonstruktionen und Strukturmotiven in der Aminosäuresequenz analysiert. Als Grundlage dienten die Aminosäuresequenzen der Mitglieder der *AGAMOUS*-Genfamilie. Vorausgesetzt man hat einen möglichst vollständigen Datensatz, in dem von den jeweiligen Spezies jeweils alle Mitglieder der zu untersuchenden Genfamilie bekannt sind, die in eine Stammbaumberechnung miteinbezogen werden, lässt die Topologie eines phylogenetischen Stammbaums erkennen, wie nah verschiedene Spezies miteinander verwandt sind, und ob Gene im Lauf der Evolution verdoppelt wurden oder verloren gegangen sind. Man kann Gene nach a) Verwandtschaft oder nach b) Funktion gruppieren. Danach kann man nach einer Korrelation zwischen Genverwandtschaft und Genfunktion suchen. Die Definition für Genfunktion in dieser Arbeit ist wie folgt: Biologische Aufgabe eines Proteins und seinen Vorstufen (RNA und DNA), in seinem Herkunftsorganismus in einem Entwicklungsprozess, der bei Ausfall dieses Proteins oder seinen Vorstufen zur Veränderung der Ausprägung des Entwicklungsprozesses führt. Somit umfasst Genfunktion die Wirkung eines Gens in biochemischer und regulatorischer Hinsicht. Auch wenn sich aus den Aminosäuresequenzen eine klar beschreibbare biochemische Ähnlichkeit ableiten lässt, wissen wir nicht, wie die Gene reguliert werden, d.h. in welchem örtlichen und zeitlichen Rahmen diese Gene in der Ontogenese des jeweiligen Organismus zum Einsatz kommen, und welche Fähigkeiten und Möglichkeiten der Interaktionen diese Proteine im jeweiligen Organismus haben.

Die deutliche Trennung von Gengruppierungen nach Genverwandtschaft und Gengruppierungen nach Genfunktion ist notwendig für diese Arbeit, weil genau das Verhältnis zwischen Genverwandtschaft und Genfunktion Gegenstand der Untersuchung ist. Für diese Arbeit stellt sich die Frage, wie stark die Korrelation zwischen Genverwandtschaft und Genfunktion ist. Um diese wichtigen Unterschiede zwischen Gengruppierungen bezüglich Genfunktion oder Genverwandtschaft im folgenden Text deutlich erkennbar zu machen, stelle ich nachfolgend eine eindeutige Benennung vor:

Bezüglich der Genverwandtschaften habe ich die *AGAMOUS*-Genfamilie (Abb.5) in 6 Kladen eingeteilt, nämlich die

-DAL2-Klade, die mit 100% bootstrap-Unterstützung alle Gymnospermengene von den Angiospermengenen abgrenzt

-AGL11-Klade, die eine reine Eudikotylengruppe umfasst, die mit 92 % bootstrap-Wert unterstützt wird

-AG-Klade, auch eine reine Eudikotylengruppe, die mit 92 % bootstrap-Wert unterstützt wird

-MAG-Klade, da diese „Klade“ bisher nur aus einem Vertreter besteht, einem Gen der basalen Angiospermen *Magnolia stellata*, ist sie mit 100% bootstrap-Wert unterstützt

-ZAG2-Klade, eine reine Monokotylengruppe, die mit 100% bootstrap-Wert unterstützt wird

-ZAG1-Klade, ebenfalls eine reine Monokotylengruppe, die mit 100% bootstrap-Wert unterstützt wird

Die übergeordneten Kladen, die jeweils zwei oder mehr dieser sechs Kladen umfassen, werden entsprechend als Superkladen bezeichnet (Abb.5) z.B. **AG/ZAG1-Superklade**.

Für viele Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie sind auch bereits Genfunktionen oder Teile von Genfunktionen ermittelt worden, einerseits mit Hilfe von Expressionsanalysen andererseits mit Genfunktionsverlustmutanten (Angenent *et al.*, 1995; Bowman *et al.*, 1989; Brunner *et al.*, 2000; Colombo *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1999; Filipecki *et al.*, 1997; Kater *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1996; Mizukami *et al.*, 1996; Perl-Treves *et al.*, 1999; Rigola *et al.*, 2001; Rutledge *et al.*, 1998; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Tandre *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999). Der Wirkungsort aller Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie liegt im generativen Bereich der jeweiligen Pflanze. Jedoch wirken einige Gene sowohl in männlichen als auch weiblichen reproduktiven Organen, wie zum Beispiel viele Gene aus AG-Klade aber ebenso Gene aus DAL2-Klade und der ZAG1-Klade. Die bisher untersuchten Gene aus der ZAG2-Klade und der AGL11-Klade sind dagegen in ihrem Wirkungsort auf den Bereich der Ovula begrenzt. Die Genfunktion, die für die Bildung von weiblichen und männlichen Reproduktionsorganen, nämlich Stamina und Karpelle, eine Schlüsselrolle spielt, wurde intensiv in *Arabidopsis thaliana* und *Antirrhinum majus* untersucht (Davies *et al.*, 1999; Ma und Mizukami, 1995; Mizukami *et al.*, 1996; Mizukami und Ma, 1992; 1995; 1997; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990) und wird **C-Funktion** genannt. Die Bildung der Stamina wirkt nur in Kombination von C-Funktionsgenen mit B-Funktionsgenen (Weigel und Meyerowitz, 1994). Die Genfunktion, die bei der Bildung von Ovula eine Schlüsselrolle spielt, wurde intensiv in

Petunia hybrida untersucht und wird **D-Funktion** genannt (Angenent und Colombo, 1996; Angenent *et al.*, 1995; Colombo *et al.*, 1995).

3.1.1 Phylogenierekonstruktionen

Von den Phylogenierekonstruktionen auf Grundlage der Aminosäuresequenz, wird im folgenden auch auf die jeweilige Genverwandtschaft geschlossen. Vorausgesetzt wird, daß die *AGAMOUS*-Genfamilie eine monophyletische Gruppe ist (siehe Einleitung 1.3, Abb.3). Für die Untersuchung der phylogenetischen Stellung der Gene untereinander wurden die folgenden Datensätze benutzt:

- Aminosäuresequenzen des MIKC-Bereichs (siehe Abb.2) aller Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie, ohne den Sequenzbereich der N-terminalen Domäne, ohne eine Außengruppe (Abb.5).
- Aminosäuresequenzen des MIKC-Bereichs (siehe Abb.2) aller Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie der Proteine außer denen der *ZAG2*-Klade und *ZAG1* (siehe Abb.6), weil diese Proteine der *ZAG2*-Klade einen komplett anderen C-terminalen Aminosäuresequenzteil haben.

So wird das *alignment* (siehe Anhang 8.3, *alignment* zu Abb.6) deutlich verbessert, und dadurch lässt sich das Verhältnis zwischen den einzelnen Kladen, der *DAL2*-Klade, der *AGL11*-Klade, *MAG*, der *ZAG1*-Klade und der *AG*-Klade klarer erkennen.

In Abb.5 liegt die *DAL2*-Klade mit 100% bootstrap-Unterstützung basal, und alle restlichen Gene fallen ebenfalls mit 100% bootstrap-Unterstützung in die *ZAG2/AGL11/MAG/ZAG1/AG*-Superklade. Die Superklade, in der alle Kladen außer der *DAL2*-Klade und der ebenfalls mit 100% bootstrap-Wert unterstützten *ZAG2*-Klade zusammenliegen, wird nur mit 32% bootstrap-Wert unterstützt. Eine relativ gute bootstrap-Unterstützung zeigen dagegen sowohl die *MAG/AG/ZAG1*-Superklade mit 81% und die *AG/ZAG1*-Superklade mit 62 %. Die einzelnen Kladen sind mit bootstrap-Werten 100% für die *ZAG1*-Klade, 100% die *MAG*-Klade und 92% die *AG*-Klade jeweils gut abgesichert. Der niedrige bootstrap-Wert, mit dem die *AGL11/MAG/ZAG1/AG*-Superklade (32%) unterstützt wird, im Gegensatz zu einerseits der hohen bootstrap-Unterstützung der *ZAG2/AGL11/MAG/ZAG1/AG*-Superklade und der *MAG/AG/ZAG1*-Superklade zeigt, daß die Mitglieder der *AGL11/MAG/ZAG1/AG*-Superklade nicht näher miteinander verwandt sind als mit den anderen Kladen.

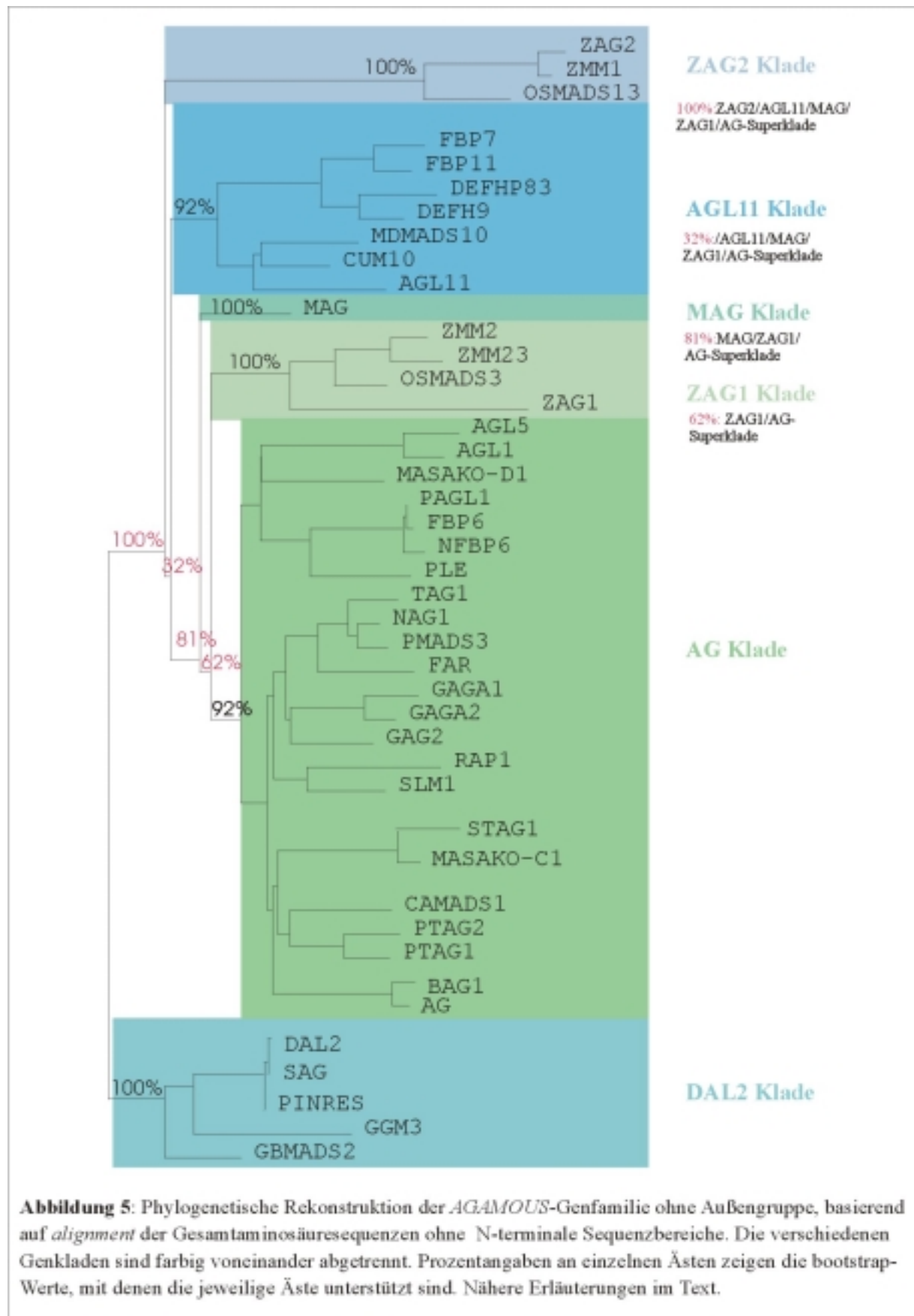


Abbildung 5: Phylogenetische Rekonstruktion der *AGAMOUS*-Genfamilie ohne Außengruppe, basierend auf *alignment* der Gesamtaminosäuresequenzen ohne N-terminale Sequenzbereiche. Die verschiedenen Genkladen sind farbig voneinander abgetrennt. Prozentangaben an einzelnen Ästen zeigen die bootstrap-Werte, mit denen die jeweilige Äste unterstützt sind. Nähere Erläuterungen im Text.

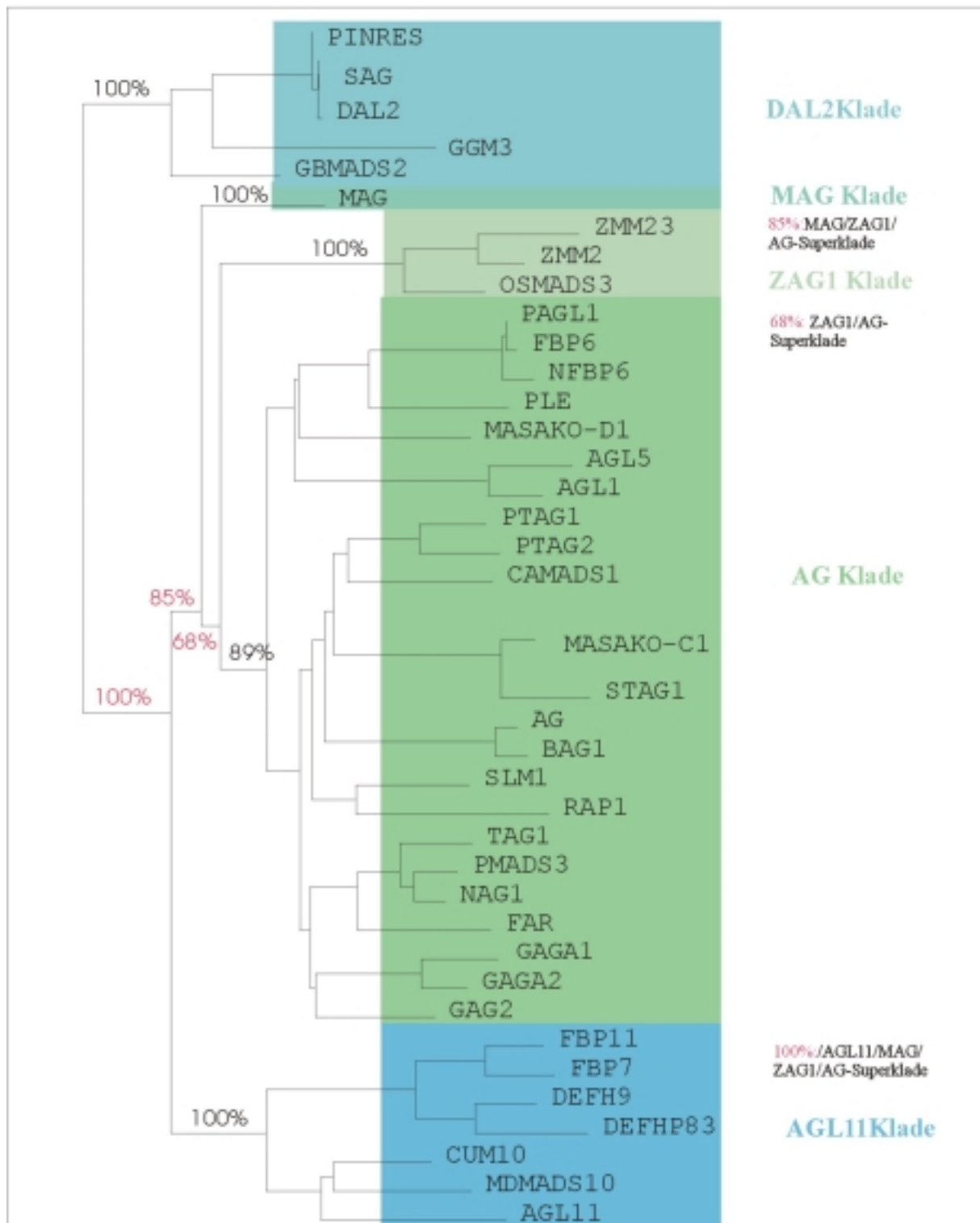


Abbildung 6: Phylogenetische Rekonstruktion der *AGAMOUS*-Genfamilie wie Abb.5 aber ohne ZAG2-Klade und ohne ZAG1. Die verschiedenen Genkladen sind farbig voneinander abgetrennt. Prozentangaben an einzelnen Ästen zeigen die bootstrap-Werte an, mit denen die jeweiligen Äste unterstützt sind. Nähere Erläuterungen im Text.

Die *ZAG2*-Klade und die *AGL11*-Klade enthalten beide D-Funktionsgene. Die gute Unterstützung der *MAG/AG/ZAG1*-Superklade zeigt, daß auch die Kladen, die C-Funktionsgene enthalten, näher miteinander verwandt sind als mit den anderen Kladen. Ein Problem des für Abbildung 5 zugrunde liegenden Datensatzes ist, daß sich der C-Terminus der *ZAG2*-ähnlichen Proteine und von *ZAG1* nicht mit dem C-Terminus der anderen Proteine der *AGAMOUS*-Genfamilie *alignen* lässt und dadurch das Gesamt-*alignment* verschlechtert. Eine Sequenzdatenbankrecherche, ob der C-Terminus der *ZAG2*-ähnlichen Proteine durch einen Domänen austausch seine entsprechenden Sequenzen in anderen Spezies an einer anderen Stelle im Genom hat, ergab keine entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen. Um die Stammbaumtopologie zwischen den anderen Kladen noch einmal mit einem optimalen *alignment* zu vergleichen, wurde die für Abbildung 6 zugrundeliegende Berechnung des *alignments* ohne die *ZAG2*-ähnlichen Proteine und ohne *ZAG1* durchgeführt. In diesem Stammbaum (Abb.6) werden die Superkladen *MAG/AG/ZAG1* (85%) und *AG/ZAG1* (68%) noch etwas stärker unterstützt als in dem Stammbaum in Abbildung 5 (81% bzw. 62%). Aus den Topologien der Abbildungen 5 und 6 lässt sich schließen,

- daß die *DAL2*-ähnlichen Gene die phylogenetisch ältesten Gene sind
- daß die *AGL11*-ähnlichen Gene und die *ZAG2*-ähnlichen Gene phylogenetisch älter sind als *MAG*, die *AG*-ähnlichen und *ZAG1*-ähnlichen Gene
- und somit zu erwarten ist, daß es ein *AGL11*-ähnliches Gen auch in *Magnolia stellata* gibt, wenn es nicht sekundär verloren gegangen ist, weil die Aufspaltung von Monokotylen und Dikotylen nach der Evolution basaler Angiospermer stattgefunden hat, ein solches Gen aber noch nicht identifiziert worden ist
- daß es im Laufe der Evolution mehrfach Genverdopplungen gegeben hat: in Gymnospermen (*DAL2*-Klade) gibt es jeweils nur einen Gentyp in einer Spezies, in höheren Dikotylen z.B. *Antirrhinum majus* zwei *AG*-ähnliche (*PLE* und *FAR*) und zwei *AGL11*-ähnliche (*DEFH9* und *DEFHP83*) Gene

3.1.2 Struktur motive

Bisher außer acht gelassen wurden spezifische Struktur motive der Aminosäuresequenzen, durch die sich ebenfalls Möglichkeiten zur Verwandtschaftsanalyse von Gengruppen ergeben. Diese Methode zur Genverwandtschaftsanalyse kann die bereits beschriebene Einteilung in Genkladen durch Phylogenierekonstruktion unterstützen oder abschwächen. Wenn vorhanden, sind die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Bereiche vor der MADS-Box und die der C-terminalen Bereiche hinter der K-Box schneller evolviert als die Aminosäuresequenzen der MADS-Box und der K-Box. Da aber die N-terminalen Extensionen und die C-terminalen

Abbildung 7: a)

grün hinterlegt sind die verlängerten N-terminalen Bereiche der MADS-Domäne von Mitgliedern der *AG*-Klade und *ZAG1*-Klade. Blau und türkis hinterlegt sind die Anfänge der MADS-Domänen, die N-terminal nicht verlängert sind, von Mitgliedern der *AGL11*-Klade, *MAG*-Klade, *ZAG2*-Klade und *DAL2*-Klade.

a)

zms2	MTDL	SCGSSKVEK	QVAAAPTGG	DQGGQGGKI	EIKRIEMTTN
zms23	MTDL	SCGSSKAAK	GGQAATGG	GGDQGGKI	EIKRIEMTTN
zag1	MNIREKATP	STVTEIMSTL	TSAGQQLKE	FISGGGGAS	VAGGAAEEN
ag11				N	EEGGGSEAE
ag15				N	EGGADSEVAE
manako_d1				MEYFRQ	ITVADPESSE
fbp6				MY	FFWQEFESSE
pag11				MY	FFWQEFESSE
nfbp6				ME	FFWQEFESSE
p1e				ME	FFWQD...
manako_c1				MAYEN	KPWTLDADA
stagi				MAYEN	KPWTLDADA
ag				TAYQ	ELGGD...
bagi				MAYQ	ELGGD...
gag1				ME	SDVLELPS
gag2				D	TQDE...
ptag1				MYEN	E
ptag2				MAYQ	E
canad1				MEFRQ	Q
far				MALIA	D
tag1				MYQ	D
pead3				MYQ	D
tag1				MYQ	D
gag2				MYQ	D
s1m1				MYQ	D
cap1				MYQ	D
cus1				MS	WEEEDD
zag2					MDGGKI
zms1					MDGGKI
canad11					MDGGKI
fbp11					MDGGKI
fbp7					MDGGKI
defb9					MDGGKI
defb93					MDGGKI
cus10					MDGGKI
mdad10					MDGGKI
ag111					MDGGKI
zmad42a					MDGGKI
dal2					MDGGKI
sinres001					MDGGKI
GMAD12					MDGGKI
gag3					MDGGKI
MW421					MDGGKI

Abbildung 8: b)

zeigt alignment C-terminaler Bereiche der MADS-Domänen Proteine. Mit entsprechenden Farben hervorgehoben sind konservierte Sequenzbereiche, die mit der Genkladenbildung aus den Phylogenierekonstruktionen korrelieren.

b)

fbp11	MNPAT...	GG	ETWAF...	...	QQY...	...	M	LQLM...	...	MDGGV	ETDPLFSH	DKK	SLQSE
fbp7	MNPAS...	GG	ETWAL...	...	QQY...	...	M	LQLM...	...	MDGV	ETDPLFSH	DKK	SLQSE
defb9	MNPAG...	GG	ETWAL...	...	QQY...	...	M	LQLM...	...	MDGV	ETDPLFSH	DKK	SLQSE
defb93	MNPAG...	GG	ETWAL...	...	QQY...	...	M	LQLM...	...	MDGV	ETDPLFSH	DKK	SLQSE
cus10	...	MVSGQ	ELWAI...	...	QA...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
mdad10	...	MVSGS	ELWAI...	...	QA...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ag11	WQ...	MVSGS	ELWAI...	...	KA...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
canad1	MNGA...	A	ETD...	...	NHPT...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
zms23	MIGL...	P	ETD...	...	FFV...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
zms2	MNVVF...	ETD...	FF...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
zmad42a	MISAP...	...	YDAL...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
zmad42b	MISAP...	...	YDAL...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
dal2	MISAP...	...	YDAL...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
pisres0001	MISAP...	...	YDAL...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
GMAD12	MIFPF...	...	YDAL...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
gag3	MITAA...	...	YDAL...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ag11	VI...	QST...	T...	...	YKSGV...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ag15	VINGQ...	...	T...	...	YKSGV...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
fbp6	LMHGG...	...	SE...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
pag11	LMF99...	...	SE...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
nfbp6	LMF...	...	GG...	...	SE...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
p1e	LMF...	...	GG...	...	SE...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
manako_c1	AIAGG...	...	SG...	...	ST...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
stagi	AITGG...	...	SG...	...	ST...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ag	MIFA...	...	F...	...	ETD...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
manako_d1	MNPRTL...	...	J...	...	AID...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ag	LMF99...	...	S...	...	M...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
bagi	LMF99...	...	S...	...	M...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ptag1	LMF99...	...	AD...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
ptag2	LMF99...	...	YN...	...	F...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
canad1	VMPGG...	...	GN...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
gag1	LMF...	...	S...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
gag2	LMF...	...	S...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
naq1	LMF...	...	S...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
pead3	LMF...	...	S...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
tag1	LMF...	...	SN...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
gag2	LMF...	...	S...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
far	LMF...	...	SG...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
cap1	LMF...	...	SGS	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE
s1m1	LMF...	...	S...	...	Y...	...	M	FLV...	...	QY...	...	DKK	SLQSE

Sequenzen trotzdem noch zu einem guten *alignment* führen, kann man diese Bereiche dazu nutzen, um nach einer noch höheren Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse zu suchen. Ein Strukturmotiv ist das Vorhandensein eines N-terminalen Bereichs vor der MADS-Box. Wie in Abb.7a zu sehen ist, kommt diese Verlängerung am N-Terminus nur bei *AG*-ähnlichen und *ZAG1*-ähnlichen Genen vor. *DAL2*-ähnliche, *ZAG2*-ähnliche, *AGL11*-ähnliche Gene und *MAG* weisen keine Verlängerung am N-Terminus auf. Durch das Fehlen bzw. das Aufweisen einer N-terminalen Extension vor der MADS-Box werden die Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie klar in zwei Gruppen aufgeteilt (Abb.7a). Dieses Merkmal korreliert mit der Genkladenbildung, die die Phylogenierekonstruktionen ergeben haben, insofern, als daß die Gene aus den basalen Kladen, *DAL2*-Klade, *ZAG2*-Klade, *AGL11*-Klade und *MAG* keine N-terminale Verlängerung vor der MADS-Box haben, sondern nur die Gene aus der *ZAG1*-Klade und *AG*-Klade. Wahrscheinlich hat sich demnach die N-terminale Extension erst mit der Entstehung von den Genkladen entwickelt, die C-Funktionsgene enthalten. Die *AG*-ähnlichen Gene und die *ZAG1*-ähnlichen Gene haben eine unterschiedlich lange N-terminale Extension. Im Fall von *AGL1* und *AGL5* sind es z.B. 48 Nukleotide verlängertes offenes Leseraster (entspricht 16 Aminosäuren), im Fall von *ZAG1* 153 Nukleotide verlängertes offenes Leseraster (entspricht 51 Aminosäuren). Innerhalb der *AG*-ähnlichen Gene lassen sich aufgrund des *alignments* der N-terminalen Extension zwei Subgruppierungen bilden: neben den *ZAG1*-ähnlichen Genen, die bereits in den Phylogenierekonstruktionen eine eigene Klade bilden, unterteilen sich die *AG*-ähnlichen Gene in *PLE*-ähnliche N-terminale Bereiche und *FAR*-ähnliche N-terminalen Bereiche (Abb.7a). Die Proteine *CUS1*, *MASAKO-D1* und *ZAG1* lassen sich im N-terminalen Bereich nicht eingruppiert. Das Aminosäuresequenz*alignment* des C-terminus bestätigt erneut Genverwandtschaftsverhältnisse aus den Stammbaumberechnungen (Abb.7b). Auffällig ist die Konservierung von zwei Aminosäuren, **RN**, (Abb.7) in allen Proteinen.

3.2 Überexpression von Genen der *AGAMOUS*-Genfamilie im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*

Als Modellpflanze für die vergleichenden Überexpressionsstudien von verschiedenen Genen aus der *AGAMOUS*-Genfamilie wurde *Arabidopsis thaliana* verwendet, deren Blütenentwicklung bereits sehr gut untersucht worden ist, und die sich leicht mit Fremdgenden transformieren lässt. Durch eine Überexpression einzelner Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie in der *Arabidopsis*blüte werden homöotische Veränderungen in den äußeren beiden Wirteln, den Petalen und den Sepalen, erwartet, wie sie bei der Überexpression von *AG* bereits gezeigt

worden sind. Die Überexpression von *AG* in der ganzen Blüte führte zur vollständigen Umwandlung der Petalen zu Stamina und von den Sepalen zu Karpellen (Mizukami und Ma, 1992). *AG* wird im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* in den äußeren Blütenwirteln nicht exprimiert und wirkt antagonistisch zu A-Funktionsgenen wie zum Beispiel *API*, das seinen Wirkungsort in Sepalen und Petalen hat (Mizukami und Ma, 1992). Ob eine Überexpression anderer Vertreter aus der *AGAMOUS*-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*, - deren Ursprung in solchen Pflanzen liegt, die phylogenetisch bis zu 300 Millionen Jahre älter sind als *Arabidopsis thaliana*, - eine ähnliche Wirkung wie das endogene *AG* aus *Arabidopsis thaliana* haben, soll hier untersucht werden. In diesem Kapitel soll demnach das Funktionspotential von Mitgliedern der *AGAMOUS*-Genfamilie aus Gymnospermen, basalen Angiospermen, Monokotylen und Dikotylen im Vergleich untersucht werden.

3.2.1 Klonierung der Überexpressionskonstrukte

Um das Funktionspotential diverser Vertreter der *AGAMOUS*-Genfamilie in der Blüte von *Arabidopsis thaliana* zu testen, wurde in einem ersten Schritt, die jeweilige cDNA in den Plasmisvektor pRT-100 hinter den konstitutiv exprimierenden CaMV-35S Promotor (aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus) kloniert. In einem zweiten Schritt wurde diese CaMV-35S::cDNA-Kassette in den Plasmidvektor pBAR-A kloniert, der ein Resistenzgen für das Herbizid BASTA enthält (Abb.8). Als Kontrolle für die Auswirkungen des BASTA-Resistenzgens auf den Habitus von *Arabidopsis thaliana* wurde ein Kontrollkonstrukt verwendet, das keine CaMV-35S::cDNA-Kassette enthält sondern nur das BASTA-Resistenzgen (siehe Abb.8, erste Zeile). Als weitere interne Kontrolle wurde auch ein Überexpressionskonstrukt mit *AG* erstellt. Der zu erwartende Phänotyp (Mizukami und Ma, 1992) sollte als Maßstab für die Ausprägungsstärke der anderen Überexpressionsergebnisse dienen. Um die vollständigen offenen Leseraster der verschiedenen cDNAs in die CaMV-35S-Kassette zu klonieren, mussten mit Hilfe der PCR-Methode künstliche Schnittstellen unmittelbar vor das Start-Kodon und hinter das Stop-Kodon des offenen Leserasters konstruiert werden. Es wurden für jedes Gen Schnittstellen erzeugt, die nicht im offenen Leseraster des entsprechenden Gens vorhanden sind, aber in der multiplen Klonierungsstelle des pRT100-Vektors anwesend sind. Im zweiten Klonierungsschritt wurde die jeweilige CaMV-35S::cDNA-Kassette mit Hilfe von HindIII oder EcoRI aus pRT100 geschnitten bzw. herausamplifiziert, ausgewählt danach, welches der beiden Enzyme nicht in das offene Leseraster der entsprechenden cDNA schneidet. Für EcoRI mussten wieder künstliche Schnittstellen erzeugt werden, weil dieses Enzym nicht in der multiplen Klonierungsstelle des pRT100 schneidet.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der Konstrukte. Rechts die im Text verwendeten Namen der Konstrukte. Nähere Erläuterungen im Text.

Die mit HindIII ausgeschnittenen oder EcoRI herausamplifizierten CaMV-35S::cDNA-Kassetten wurden entsprechend in die HindIII oder EcoRI-Schnittstelle des pBAR-A-Vektors kloniert. In Abbildung 8 ist angegeben, welche Enzyme für die Klonierungen der verschiedenen cDNAs verwendet wurden. Die dafür erstellten und verwendeten *primer* sind im Anhang unter 8.2 aufgelistet.

3.2.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Vier mal unabhängig wurden die durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten *in planta*-Transformationen pro Gen durchgeführt. Die verschiedenen daraus hervorgegangenen transgenen Generationen sind mit eindeutiger Nomenklatur in Abschnitt 2.4.4.1 beschrieben.

3.2.3 Phänotypische Analyse der *Arabidopsis*-Pflanzen, die *AGAMOUS*-ähnliche Gene überexprimieren

Nachfolgend werden die phänotypischen Auswirkungen der ektopischen Überexpression heterologer *AGAMOUS*-ähnlicher Gene in *Arabidopsis thaliana* dargestellt.

3.2.3.1 Allgemeiner Wachstumshabitus

Zunächst soll der allgemeine Wachstumshabitus der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen kurz beschrieben werden, die ein Gen der *AGAMOUS*-Genfamilie überexprimieren. Der interne Standard, den die Überexpression des endogenen *AG* liefern sollte, wird dabei nicht berücksichtigt, weil er zu keinem erkennbaren veränderten Phänotypen geführt hat. In der T1-Generation wurden nur vereinzelte Pflanzen beobachtet, die dem Phänotyp der Funktionsverlustmutante *agamous* ähneln, was ein Indiz für eine Cosuppression des Transgens und des endogenen Gens ist. Als Vergleichsstandard wird sich auf die veröffentlichten Ergebnisse der Überexpression von *AG* bezogen (Mizukami und Ma, 1992). Im Vergleich zum Wildtyp und zur Kontrollpflanze K57 beginnen die transgenen Pflanzen, die eine cDNA aus der *AGAMOUS*-Genfamilie überexprimieren, unter Kurztagbedingungen, (8 h Licht/ 16 h Dunkel) aunahmslos alle, früher zu blühen (Abb.9). Während eine Wildtyppflanze nach 3 Wochen unter Kurztagbedingungen mit mehr als 14 großen und kräftigen Rosettenblättern noch mitten in der vegetativen Wachstumsphase ist (Abb.9, A), beginnen die transgenen Pflanzen bereits nach 9-14 Tagen, in die generative Wachstumsphase zu wechseln. Sie haben zum Zeitpunkt der Blütenbildung meistens erst 8-10 Rosettenblätter gebildet, die sehr viel kleiner und leicht bis sehr stark eingerollt sind (Abb.9). Insgesamt bleiben die transgenen Pflanzen während ihres gesamten Lebenszyklusses deutlich kleiner

und schwächer, sie verzweigen sich in der generativen Phase weniger, und in Einzelfällen wird nur eine einzige terminale Blüte gebildet.

3.2.3.2 Blatt-Phänotypen

Der Blattphänotyp der transgenen Pflanzen ist gegenüber Wildtypblättern extrem verändert. Vom Beginn des Wachstums der Blätter rollen sie sich der Längsachse nach ein, so daß sie keine wildtypische oval- bis kreisförmige Blattoberfläche bilden (Abb.9 A). Die eingerollten Blätter kennzeichnen, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, ausnahmslos alle hier untersuchten transgenen Pflanzen, die ein Gen aus der *AGAMOUS*-Genfamilie überexprimieren (Abb.9). Die zur Kontrolle mit dem BASTA-Resistenzgen transformierten Pflanzen zeigen die gleiche Blattform wie die wildtypischen Blätter von *Arabidopsis thaliana* (Abb.9, B). Die Blattphänotypen der transgenen Pflanzen sind in den meisten Fällen deutlich stärker ausgeprägt als in der *curly leaf*-Mutante von *Arabidopsis thaliana*. In einigen Individuen ist anstelle sich verzweigender Infloreszenzen eine terminale Blüte entstanden, was ebenfalls ein kennzeichnender Phänotyp der *curly leaf*-Mutante ist (Goodrich *et al.*, 1997).

3.2.3.3 Blüten-Phänotypen

Das Hauptinteresse der Überexpression der oben erwähnten Gene und deren Funktionspotential liegt auf der Blütenentwicklung, weil die entsprechende Wildtypfunktion dieser Gene in Blüten bzw. generativen Organen lokalisiert ist. Deshalb wurden die transgenen Blüten genauer als die Blätter, mit dem Binokular und dem Rasterelektronenmikroskop, auf ihre Struktur hin untersucht. Zunächst sollen noch einmal schematisch die Erwartungen der Überexpressionen der zu untersuchenden Gene zusammengefasst werden, die sich gemäß des ABC-Modells der Blütenentwicklung ergeben würden. Abbildung 4 zeigte bereits, in welcher Weise die A-, B-, C- und D-Funktionen in *Arabidopsis thaliana* zusammenwirken. Das C-Funktionsgen *AG* wirkt nur in den inneren beiden Blütenwirteln, den Stamina und Karpellen (im Fall von *Arabidopsis thaliana* sind die zwei Karpelle fusioniert, die Karpelle werden auch als Gynoecium bezeichnet). *AG* wirkt in Verbindung mit B-Funktionsgenen als Kontrollgen der Entwicklung von Stamina (C-Funktionsgen und B-Funktionsgene, wie z.B. *AP3* und *PI*), alleine als Kontrollgen der Entwicklung von Karpellen (C-Funktionsgen) und zusammen mit D-Funktionsgenen als Kontrollgen der Entwicklung von Ovula (C-Funktionsgen und D-Funktionsgen, wie z.B. *AGL11*). An der Steuerung und der Ausbildung der äußeren beiden Wirtel, also Sepalen und

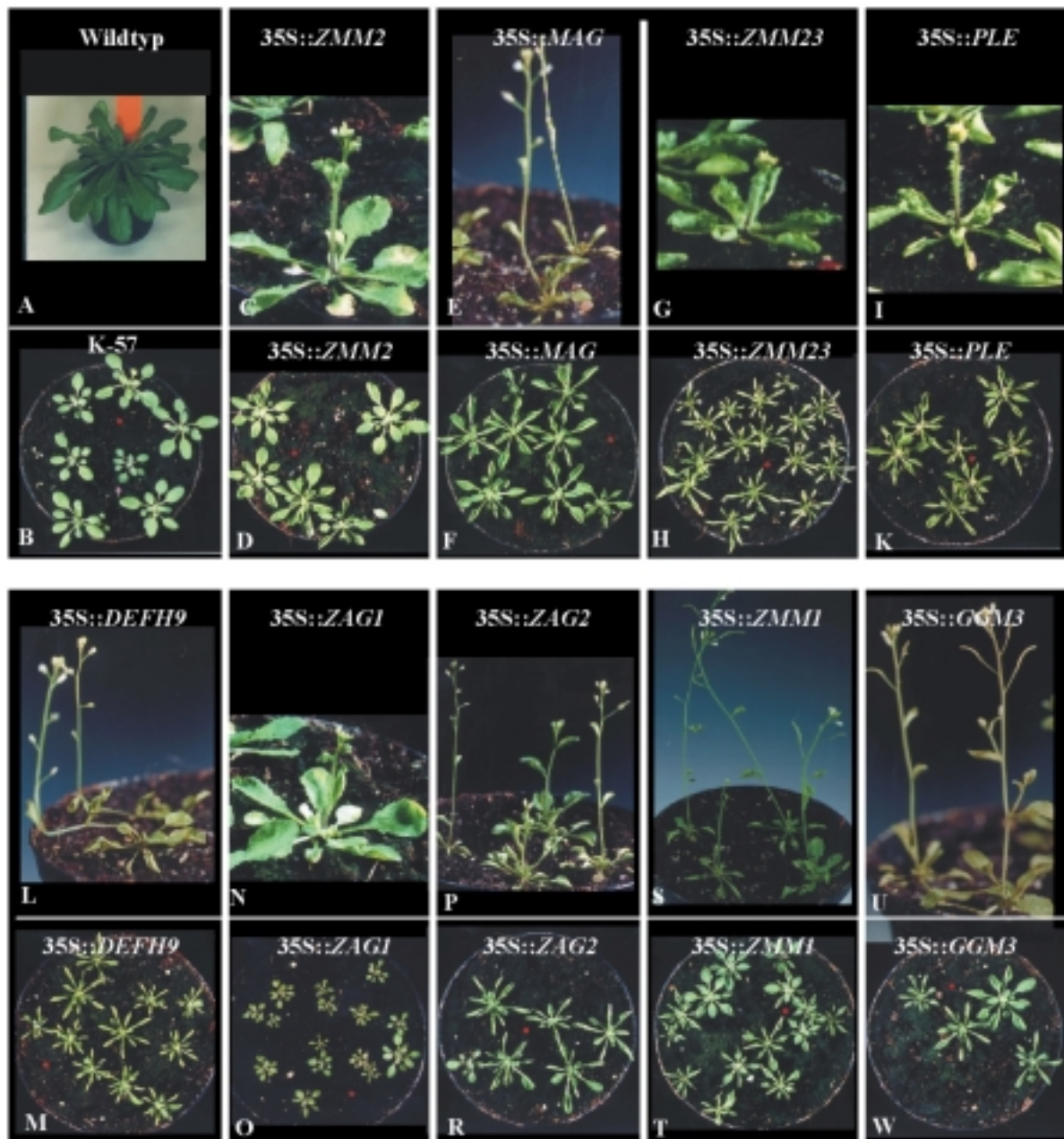


Abbildung 9: Phänotypen bezüglich früher Blüte und Blattform von repräsentativen Pflanzen, die aus den *in planta*-Transformationen entstanden sind. Alle hier gezeigten Pflanzen sind aus der T2-Generation. A zeigt Wildtyp mit mehr als 14 Rosettenblättern (24 Tage alt). B zeigt Kontrollpflanze mit BASTA-Resistenzgen ohne weitere transgene cDNA (9 Tage alt). Alle weiteren Bilder zeigen Pflanzen, die das angegebene Konstrukt überexprimieren im Alter zwischen 9 und 14 Tagen.

Petalen, sind C- und D-Funktionsgene nicht beteiligt. Werden nun nah verwandte Gene zu *AG* aus anderen Samenpflanzen auch in den äußeren beiden Blütenwirteln ektopisch überexprimiert, wird ein Phänotyp erwartet, der der *AP2*-Verlustmutante ähnelt, in der durch den Ausfall dieses A-Funktionsgens das C-Funktionsgen *AG* auch in den äußeren Wirteln exprimiert wird. In dieser A-Funktionsverlustmutante bilden sich anstelle der Petalen Stamina und anstelle der Sepalen Karpelle (Bowman *et al.*, 1991; Kunst, *et al.*, 1989). Als Bezug für alle nachfolgend beschriebenen Blütenphänotypen der transgenen Pflanzen werden die wildtypischen Blütenorgane von *Arabidopsis thaliana* herangezogen, die in Abbildung 10 dargestellt sind.

3.2.3.3.1 35S::*PLE*

PLE aus *Antirrhinum majus* wurde als Vertreter eines höheren Eudikotylengens ausgewählt, das in die Klade der *AG*-ähnlichen Gene fällt (Abb.5) und von allen ausgewählten Genen am nächsten mit *AG* verwandt ist. In Abbildung 11 werden die Überexpressionsphänotypen von *PLE* in der Blüte und die dazu passende schematische Darstellung des ABC-Modells gezeigt. Die Blüten von 35S::*PLE* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Zu Beginn der Blütenentwicklung unterscheiden sich 35S::*PLE* *Arabidopsis*-Pflanzen, (wie 35S::*ZAG1*, 35S::*ZMM23* und 35S::*ZMM2* *Arabidopsis*-Pflanzen) vom Wildtyp durch ein im Verhältnis zu den ersten beiden Wirteln schnellere Entwicklung des 3. und 4. Blütenwirtels. Karpelle und Stamina wachsen verglichen mit Blütenblättern und Kelchblättern so schnell aus, daß das typische Stadium einer Wildtyp-Infloreszenz nicht auftritt, deren Blüten noch vollkommen von den grünen Sepalen umhüllt ist (vgl. Abb.11 und Abb. 15a). Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung entstehen weder erkennbare Petalen noch Sepalen (Abb.11a-c). Im 2. Wirtel bilden sich staubblattähnliche Blütenorgane (Abb.11f und 11g), im 1. Wirtel karpelloide Organe aus (Abb.11f und 11g). Zum Teil wachsen alle vier Blütenorgane des 1. Wirtels zusammen und bilden am gesamten oberen Rand stigmatisches Gewebe (Abb.11b,d,h). Stigmatisches Gewebe befindet sich in der wildtypischen Blüte ausschließlich auf der Oberseite der Karpelle (vergl. Abb.10a). Die Zellen an der Außenseite dieser stark karpellähnlichen Struktur sehen aus wie die Zellen eines wildtypischen Gynoeciums (die zwei fusionierten Karpelle). An den inneren Rändern der karpelloiden Kelchblätter wachsen auch Ovula (Abb.11e). Die vom 1. Wirtel eingeschlossenen Organe des 2. Wirtels sterben meistens schon sehr früh ab, da sie durch diesen Einschluss von Licht und Luft abgeschirmt und am Auswachsen gehindert werden. Die Stamina und Karpelle sind kleiner und schwächer als in Wildtyp-*Arabidopsis*-Blüten, die Stamina bilden weniger

Abbildung 10: Aufsicht und Seitenansicht einer wildtypischen Blüte von *Arabidopsis thaliana* (a) sowie Detaillansichten der einzelnen wildtypischen Blütenorgane (b).

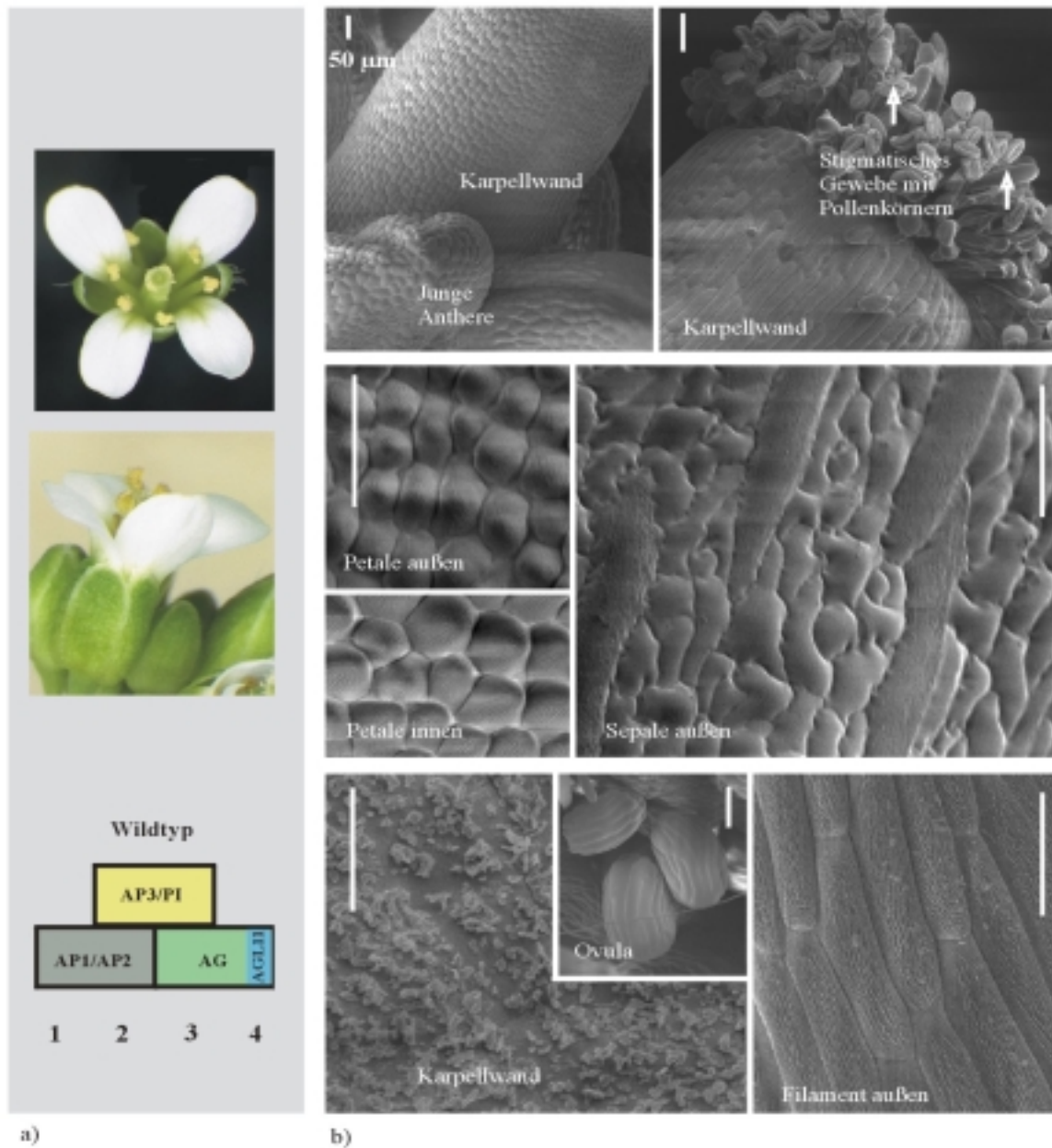
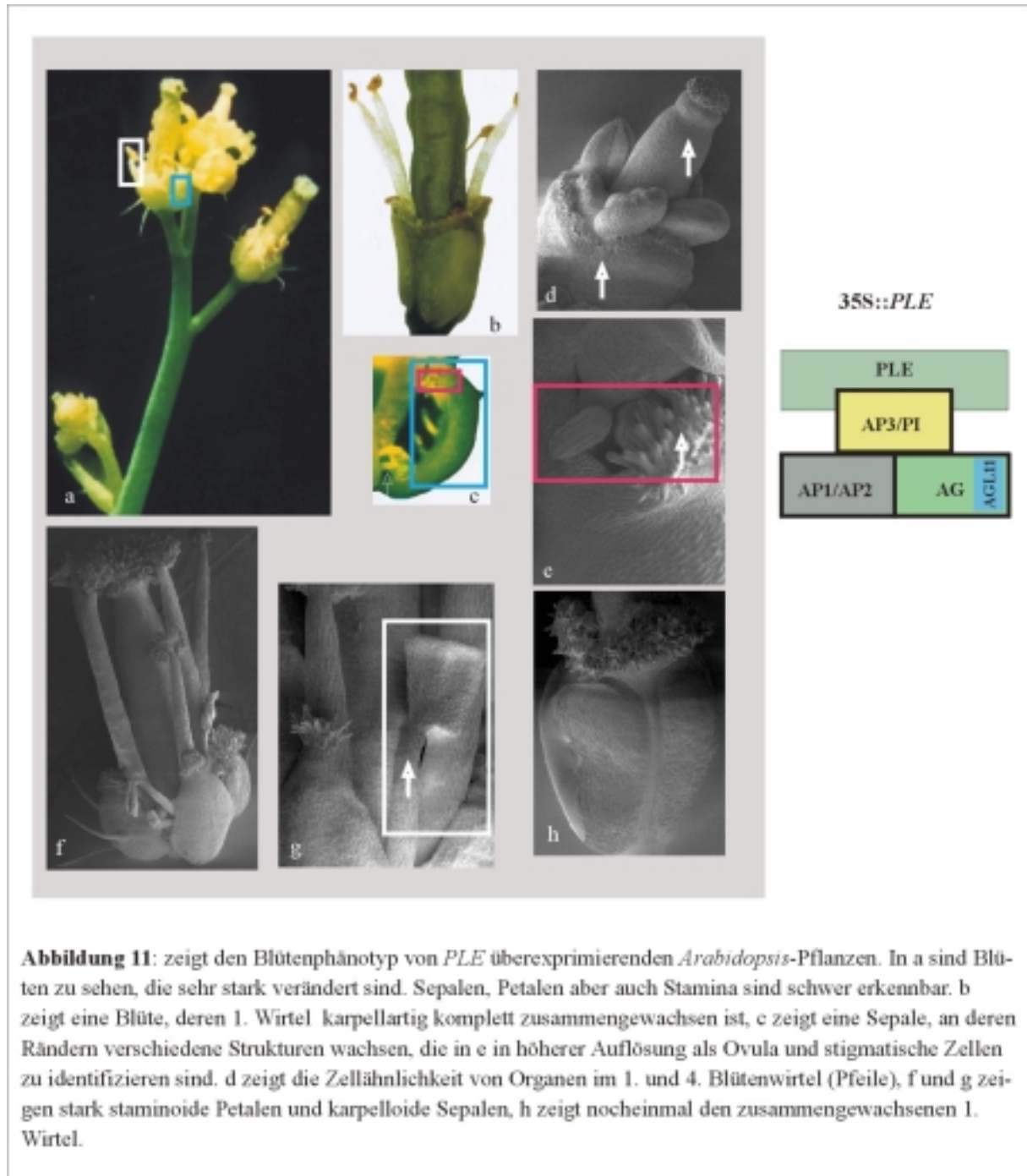


Abbildung 10: a) zeigt eine Blüte von *Arabidopsis thaliana* in Aufsicht und Seitenansicht und das ABC-Modell der Blütenentwicklung mit *AP1/AP2* als A-Funktionsgenen, *AP3/PI* als B-Funktionsgenen und *AG* als C-Funktionsgen und *AGL11* als putativem D-Funktionsgen. Die Numerierung 1-4 soll die Wirtelnummerierung von außen nach innen darstellen. b) zeigt einzelne Gewebe der Wildtypblütenorgane stark vergrößert in elektronenmikroskopischen Aufnahmen.



Pollen. *PLE* erzielt in den Sepalen und Petalen somit die gleiche Entwicklungstendenz wie *AG*, wenn es dort überexprimiert wird. Im 3. und 4. Wirtel der 35S::*PLE Arabidopsis*-Pflanzen sind unter dem Rasterelektronenmikroskop keine homöotischen Veränderungen zu erkennen.

3.2.3.3.2 35S::*DEFH9*

DEFH9 aus *Antirrhinum majus* wurde als Vertreter eines höheren Eudikotylengens ausgewählt, das in die Klade der *AGL11*-ähnlichen Gene fällt (Abb.5). In Abbildung 12 werden die Überexpressionsphänotypen von *DEFH9* in der Blüte und eine schematische Darstellung des entsprechenden ABC-Modells gezeigt. Die Blüten von 35S::*DEFH9* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind etwas kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Die gesamte Blütenentwicklung von 35S::*DEFH9 Arabidopsis*-Pflanzen unterscheidet sich nicht sichtbar vom Wildtyp (Abb.12a und 12b) In den vier Wirteln der 35S::*DEFH9*-*Arabidopsis*blüten sind auch unter dem Rasterelektronenmikroskop keine partiellen homöotischen Transformationen zu erkennen gewesen (Abb.12c).

3.2.3.3.3 35S::*ZMM1*

ZMM1 aus *Zea mays* vertritt (zusammen mit dem nachfolgend beschriebenen Gen *ZAG2*) die Klade der *ZAG2*-ähnlichen Gene (Abb.5). In Abbildung 13 werden die Überexpressionsphänotypen von *ZMM1* in der Blüte und wieder das dazu passende ABC-Modell gezeigt. Die Blüten von 35S::*ZMM1* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind wie auch die von den 35S::*DEFH9* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen kaum kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Die gesamte Blütenentwicklung von 35S::*ZMM1 Arabidopsis*-Pflanzen unterscheidet sich nicht sichtbar vom Wildtyp (Abb.13a und 13b). Auch die Untersuchungen unter dem Rasterelektronenmikroskop ließen keine partiellen homöotischen Transformationen in den Blüten durch die Überexpression von *ZMM1* erkennen (Abb.13c und 13d).

3.2.3.3.4 35S::*ZAG2*

In Abbildung 14 werden nun die Überexpressionsphänotypen von *ZAG2* in der Blüte und die schematische Darstellung des dazu passenden ABC-Modells gezeigt. Die Blüten von 35S::*ZAG2* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind, wie schon die Blüten der 35S::*DEFH9 Arabidopsis*-Pflanzen und 35S::*ZMM1 Arabidopsis*-Pflanzen etwas kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Die gesamte Blütenentwicklung von 35S::*ZAG2 Arabidopsis*-Pflanzen unterscheidet sich nicht sichtbar vom Wildtyp (Abb.14). Auch die

Untersuchungen unter dem Rasterelektronenmikroskop bestätigen wieder, daß keine partiellen homöotischen Transformationen in den Blüten durch die Überexpression von *ZAG2* erzielt werden konnten (Abb.14c-f).

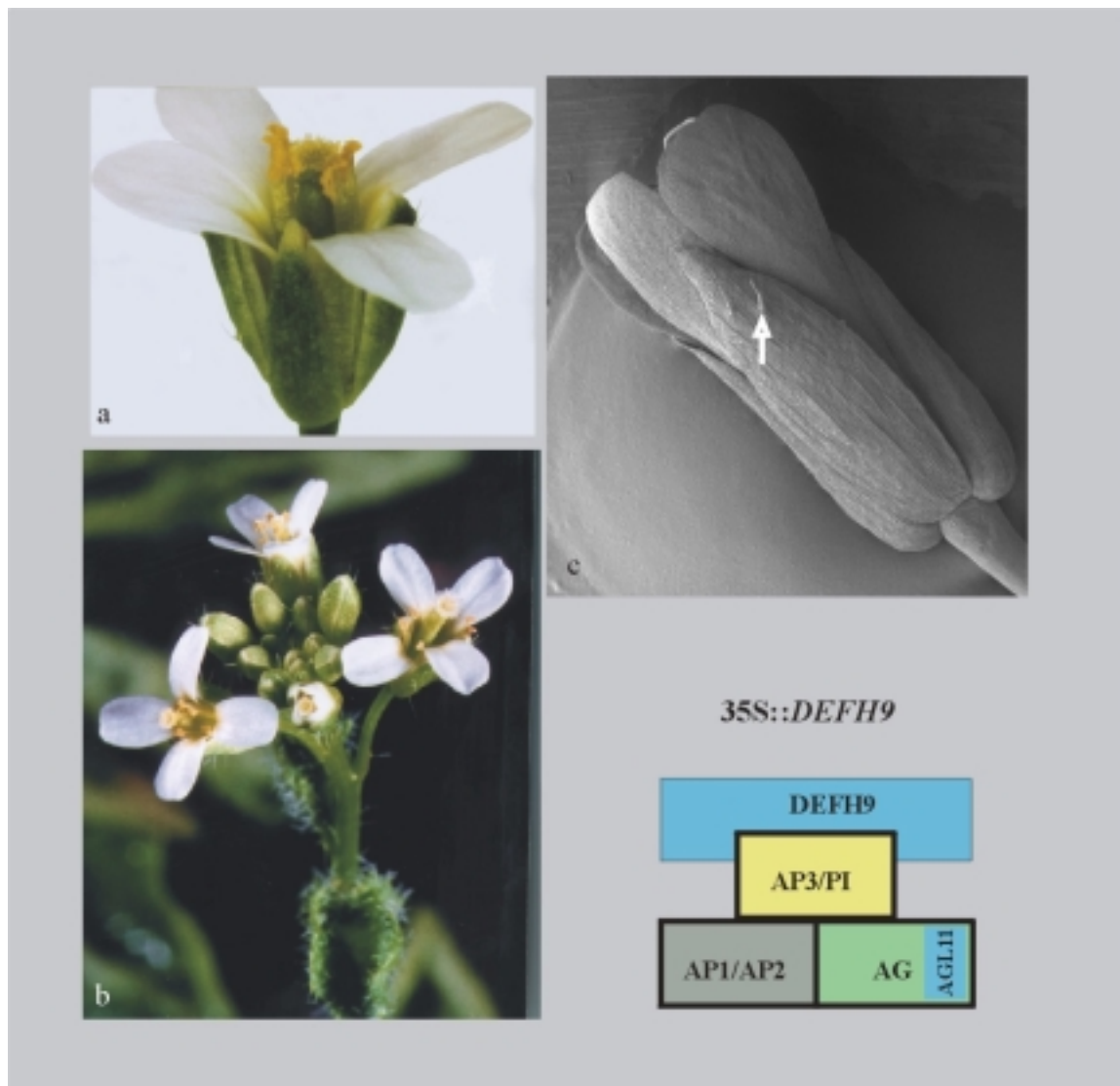


Abbildung 12: zeigt den Blütenphänotyp von *DEFH9* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. In a und b sind wildtypisch aussehende Blüten zu sehen, auch die elektronenmikroskopische Aufnahme in c zeigt keine homöotischen Veränderungen im Vergleich zur Wildtypblüte.

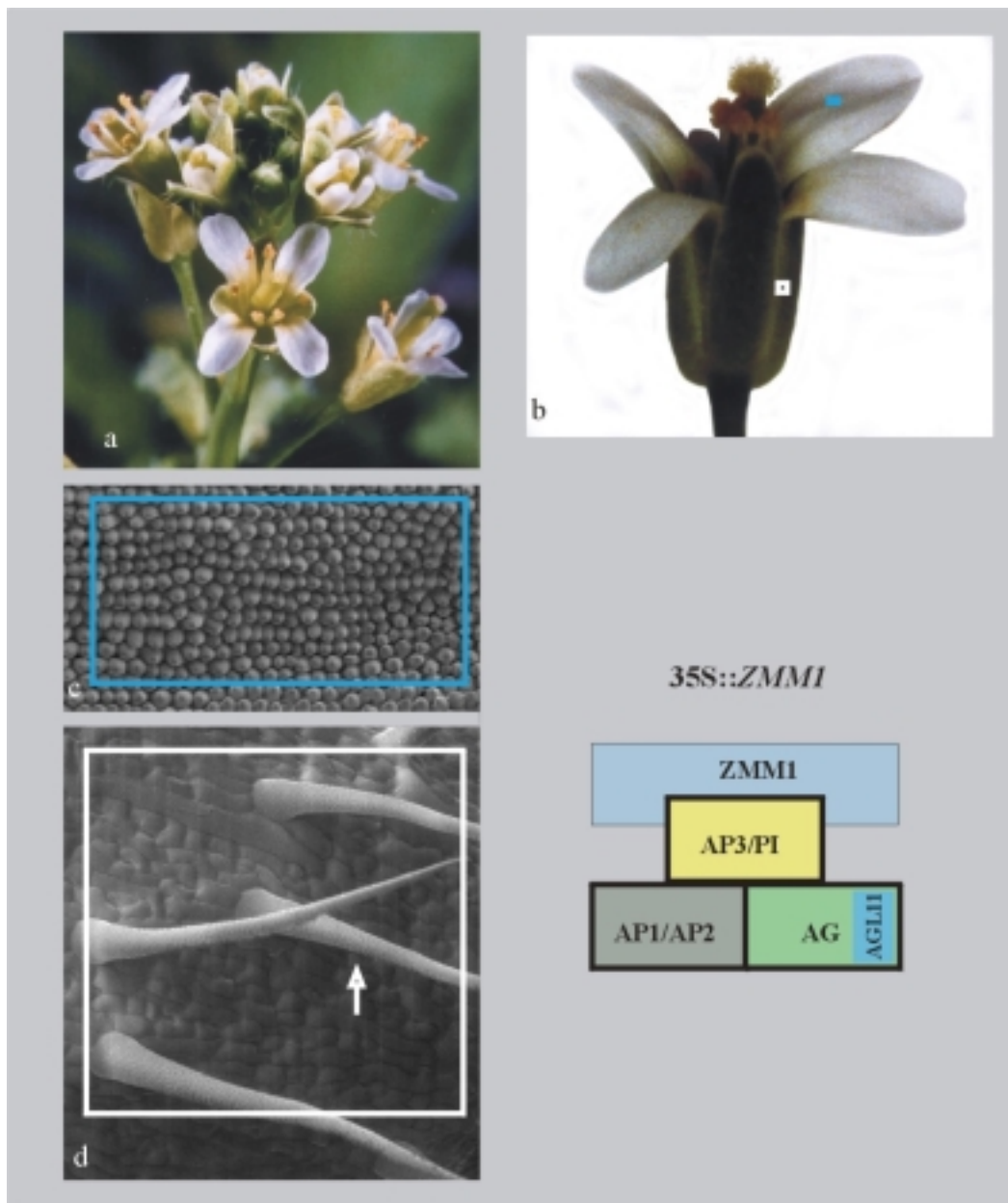


Abbildung 13: zeigt den Blütenphänotyp von *ZMM1* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. In a und b sind Blüten zu sehen, die von Wildtypblüten nicht zu unterscheiden sind. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in c und d zeigen keine Zellveränderungen in den äußeren beiden Blütenwirteln. c: runde geordnete Petalenzellen und d: typische Sepalenaußenwandzellen mit unverzweigten Trichomen.

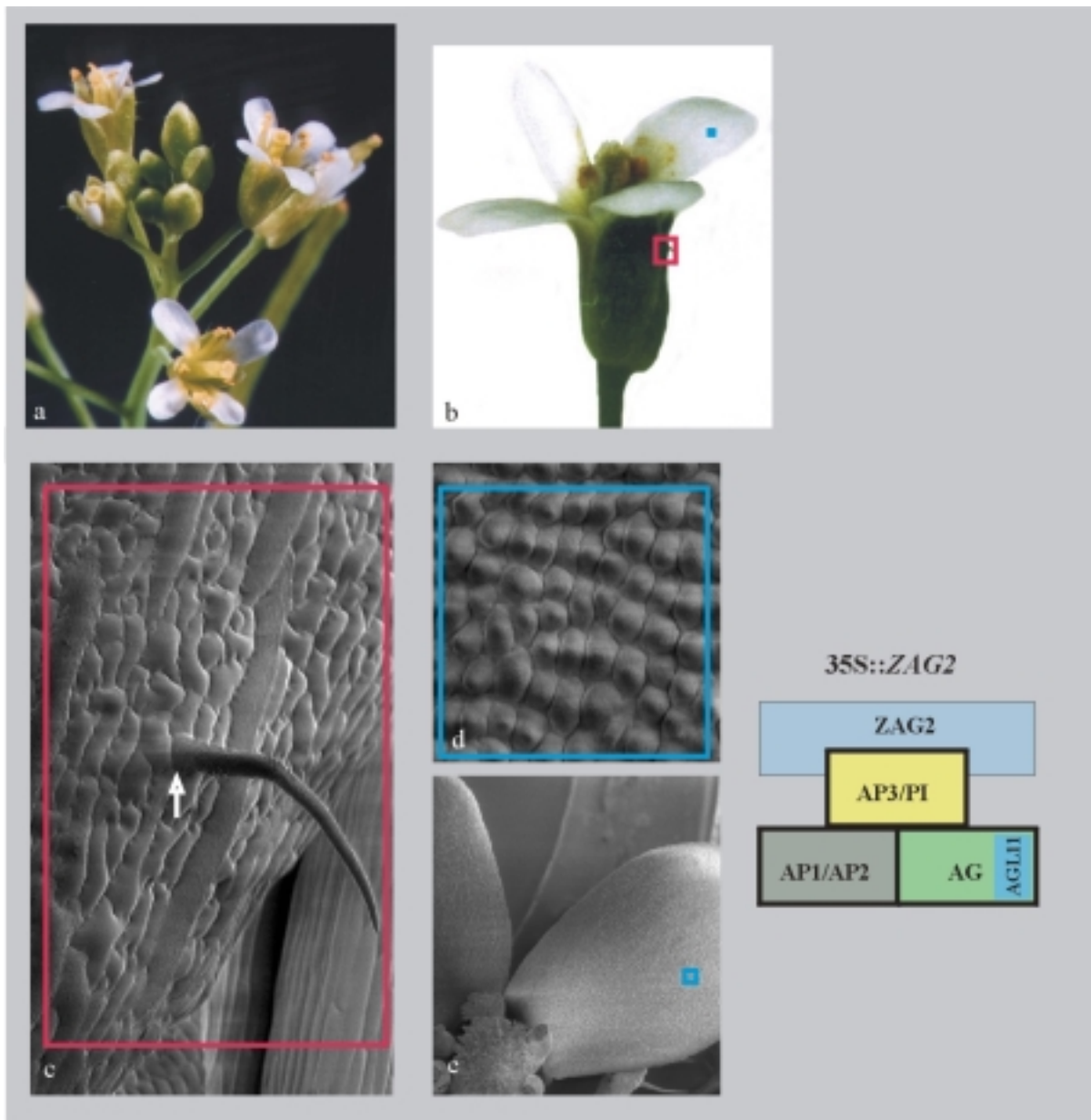


Abbildung 14: zeigt den Blütenphänotyp von *ZAG2* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. In a und b sind Blütenaufnahmen zu sehen, die von Wildtypblüten nicht zu unterscheiden sind. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (c-e) zeigen keine vom Wildtyp abweichenden Merkmale in den äußeren beiden Blütenwirteln. c: Außenwand einer Sepale mit unverzweigtem Trichom (Pfeil), e und d gleichmäßige runde Petalenzellen.

3.2.3.3.5 35S::*ZAG1*

ZAG1 vertritt (zusammen mit den nachfolgend beschriebenen Genen *ZMM23* und *ZMM2*) die Klade der *ZAG1*-ähnlichen Gene (Abb.5). Abbildung 15 zeigt die Überexpressionsphänotypen, die *ZAG1* in der Blüte bewirkt, sowie das entsprechende ABC-Modell. Die Blüten von 35S::*ZAG1* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind besonders klein verglichen mit wildtypischen Blüten von *Arabidopsis thaliana* und bilden besonders häufig eine terminale Blüte aus. Diese Pflanzen unterscheiden sich zu Beginn der Blütenentwicklung vom Wildtyp durch eine relativ zu den ersten beiden Wirteln schnellere Entwicklung des 3. und 4. Blütenwirtels (Abb.15a und 15b), wie es schon für 35S::*PLE* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen beschrieben wurde. Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung entstehen kaum erkennbare Petalen und stark veränderte Sepalen (Abb.15c). Die Sepalen sind eher gelblich als grün. Im 1. Wirtel bilden sich karpelloide Strukturen mit zum Teil sichtbaren Ovula an den Sepalenrändern aus. Die Stamina und die Karpelle sind kleiner und schwächer als in wildtypischen *Arabidopsis*-Blüten. Untersuchungen unter dem Rasterelektronenmikroskop zeigen sehr deutlich, daß zu großen Teilen homöotische Transformationen der Sepalen und Petalen durch die Überexpression von *ZAG1* erzielt werden. So bildet sich an den Rändern der Sepalen stigmatisches Gewebe und Ovula (Abb.15e-g) und die Petalen sind stark staminoid (Abb.15d). *ZAG1* erzielt in den Sepalen und Petalen die gleiche Entwicklungstendenz wie *AG*, wenn es dort überexprimiert wird. Im 3. und 4. Wirtel der 35S::*ZAG1* *Arabidopsis*-Pflanzen waren auch unter dem Rasterelektronenmikroskop keine homöotischen Veränderungen zu erkennen.

3.2.3.3.6 35S::*ZMM23*

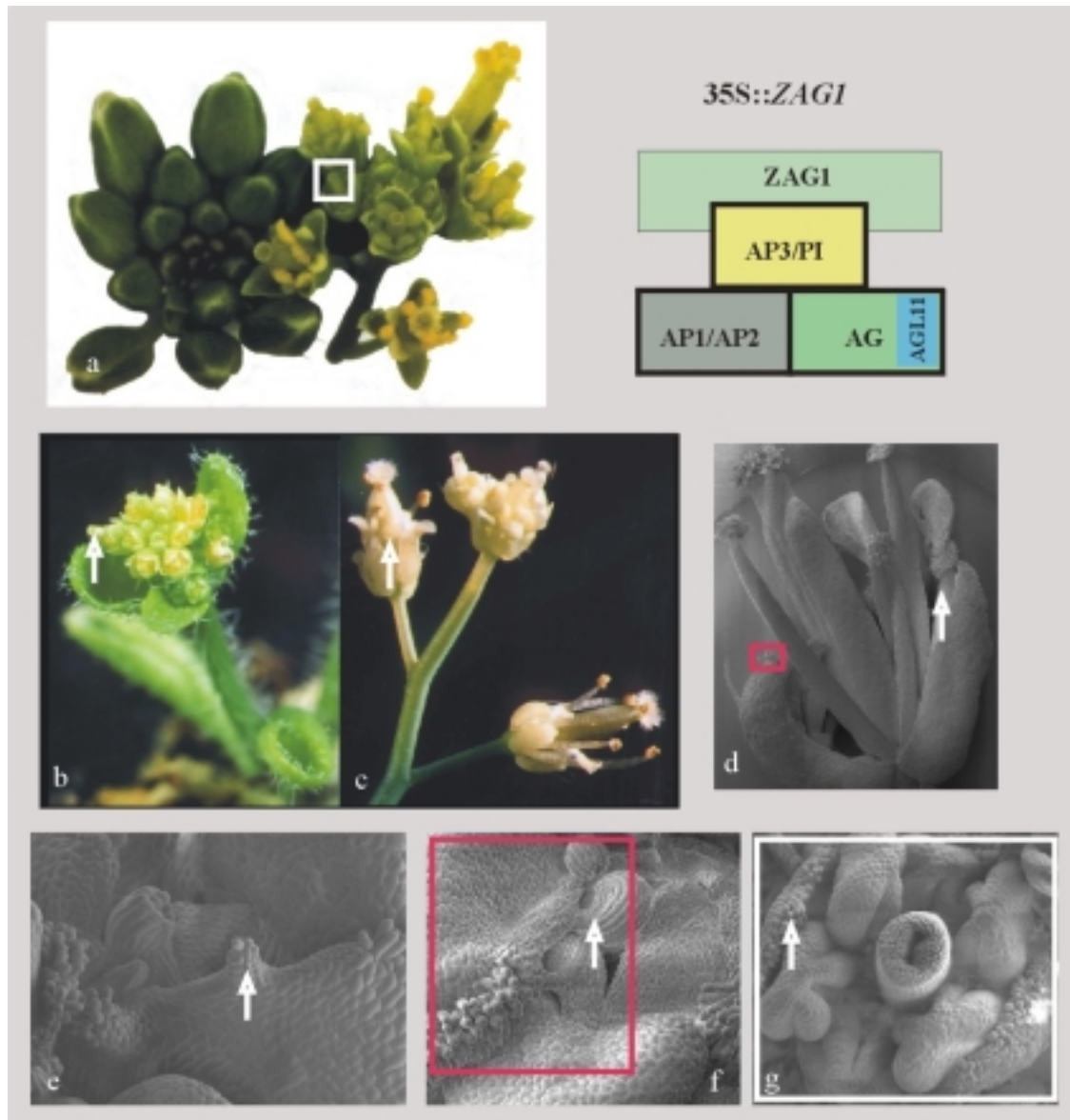
In Abbildung 16 werden die Überexpressionsphänotypen von *ZMM23* in der Blüte mit dem entsprechenden ABC-Modell gezeigt. Die Blüten von 35S::*ZMM23* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Schon sehr früh unterscheiden sich auch die 35S::*ZMM23* *Arabidopsis*-Pflanzen vom Wildtyp (wie es auch schon bei 35S::*ZAG1* und 35S::*PLE* *Arabidopsis*-Pflanzen beschrieben wurde) durch eine relativ zu den ersten beiden Blütenwirteln schnellere Entwicklung des 3. und 4. Blütenwirtels. Karpelle und Stamina wachsen verglichen mit Blütenblättern und Kelchblättern so schnell aus, daß das typische Stadium einer Wildtyp-Infloreszenz nicht auftritt, deren Blüten noch vollkommen von den grünen Sepalen umhüllt ist (Abb.16a vergl. mit Abb.15a). Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung entstehen in den äußeren beiden Wirteln nur sehr schwer erkennbare Petalen und Sepalen (Abb.16a). Im 2. Wirtel bilden sich staubblattähnliche Blütenorgane, im ersten Wirtel karpelloide Strukturen aus. Die Stamina und die Karpelle sind

kleiner und schwächer als in Wildtyp-*Arabidopsis*-Blüten. Untersuchungen unter dem Rasterelektronenmikroskop zeigen sehr deutlich, daß partielle homöotische Transformationen der Sepalen und der Petalen durch die Überexpression von *ZMM23* erzielt werden (Abb.16b-h). So bildet sich an den Rändern der Sepalen stigmatisches Gewebe (Abb.16f) und Ovula (Abb.16f im Hintergrund), sowie Ovulainitiationen (Abb.16e und 16h). Die Zellen der Außenwand des 1. Wirtels sind stark karpelloid (Abb.16b und 16g). Anstelle von Petalen wachsen im 2. Wirtel staubblattähnliche Organe (Abb.16b, Pfeil). *ZMM23* erzielt in den äußeren beiden Blütenwirteln die gleiche Entwicklungstendenz wie *AG*, wenn es dort überexprimiert wird. Der Phänotyp, den die ektopische Expression von *ZMM23* im 1. und 2. Wirtel verursacht, ist mit den Phänotypen vergleichbar, die die ektopische Expression von *PLE* verursacht. Im 3. und 4. Wirtel der *35S::ZMM23 Arabidopsis*-Pflanzen waren auch unter dem Rasterelektronenmikroskop keine homöotischen Veränderungen zu erkennen.

3.2.3.3.7 *35S::ZMM2*

In Abbildung 17 werden die Überexpressionsphänotypen von *ZMM2* in der Blüte mit dem dazu passenden ABC-Modell dargestellt. Die Blüten von *35S::ZMM2* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind etwas kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Zu Beginn der Blütenentwicklung unterscheiden sich auch *35S::ZMM2 Arabidopsis*-Pflanzen vom Wildtyp durch eine relativ zu den ersten beiden Wirteln schnellere Entwicklung und schnelleres Wachstum des 3. und 4. Blütenwirtels (Abb.17a vergleiche mit Abb.15a). Die Stamina und Karpelle sind kleiner und schwächer als in Wildtyp-*Arabidopsis*-Blüten. Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung entstehen zwar wildtypisch aussehende Sepalen (Abb.17b) aber stark veränderte Petalen (Abb. 17c und 17d). Der 2. Wirtel bildet staubblattähnliche Blütenorgane aus (Abb.17c und 17d). In den ausgewachsenen Organen des 2. Blütenwirtels der *35S::ZMM2 Arabidopsis*-Pflanzen sind die unteren 2/3 sehr langgestreckt und ähneln Filamenten der Staubblätter, während das obere 1/3 tellerförmig antheroid ausgebildet ist. Diese staubblattähnlichen Organe sind jedoch viel kleiner als die Staubblätter im 3. Blütenwirtel (Abb.17d). Diese Entwicklung im 3. Wirtel entspricht der Erwartung, daß ein zu *AG* ähnliches Gen, wenn es im 2. Wirtel exprimiert wird, zu einer Umwandlung von Petalen zu Sepalen führt. Die Erwartung für den 4. Wirtel, nämlich, daß sich die Sepalen zu zumindest zugunsten einiger karpelloiden Strukturen verändern, wird nicht erfüllt. *ZMM2* scheint sich auf die Entwicklung der Sepalen nicht auszuwirken. Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop bestätigen, daß die partiellen homöotischen Transformationen auf die Petalen durch die Überexpression von *ZMM2* beschränkt sind, und sich der 1. Wirtel in

Abbildung 15: Blütenphänotypen von *ZAG1* überexprimierenden Arabidopsis-Pflanzen.



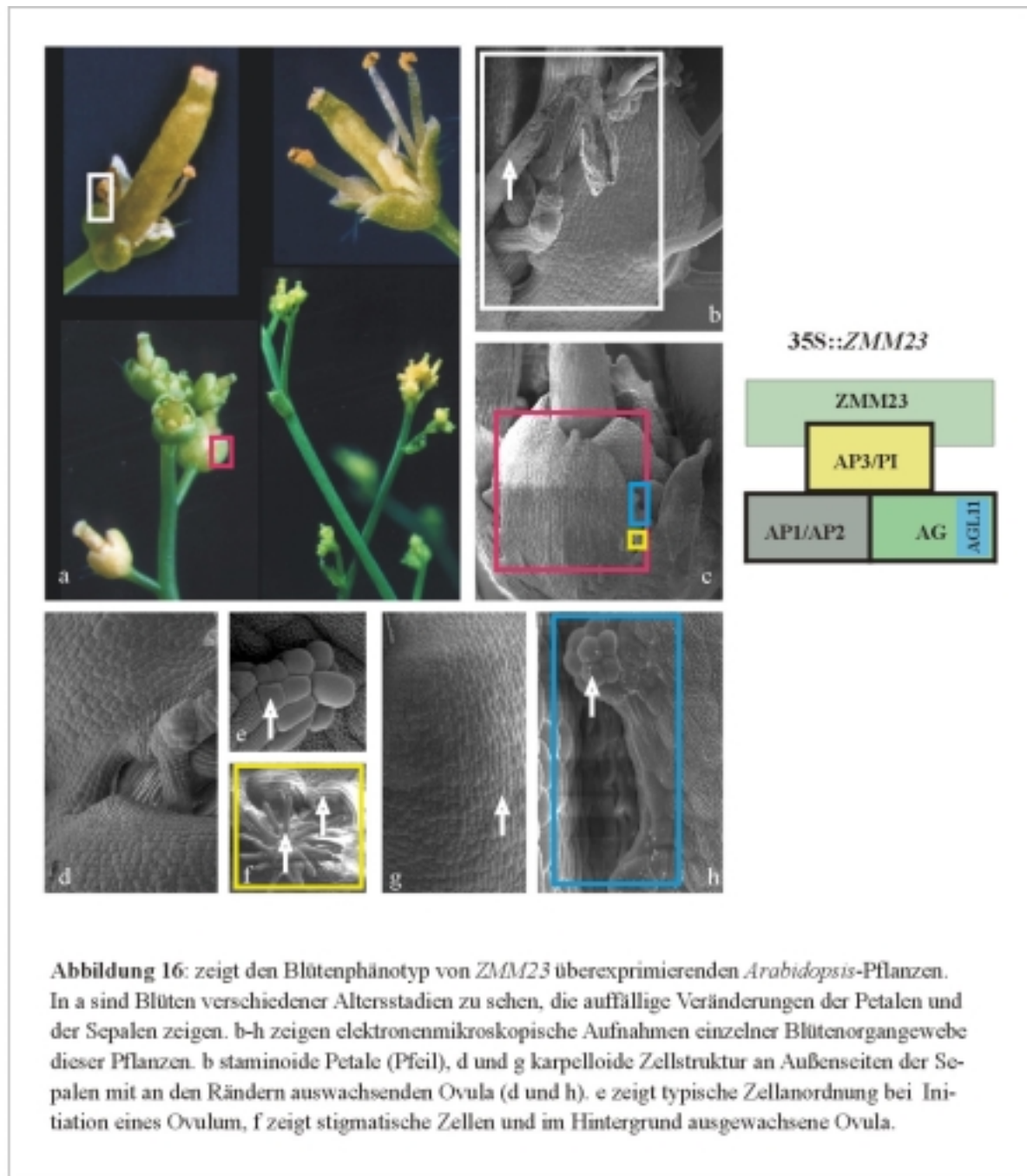


Abbildung 16: zeigt den Blütenphänotyp von *ZMM23* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. In a sind Blüten verschiedener Altersstadien zu sehen, die auffällige Veränderungen der Petalen und der Sepalen zeigen. b-h zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen einzelner Blütenorgangewebe dieser Pflanzen. b staminoide Petale (Pfeil), d und g karpelloide Zellstruktur an Außenseiten der Sepalen mit an den Rändern auswachsenden Ovula (d und h). e zeigt typische Zellanordnung bei Initiation eines Ovulum, f zeigt stigmatische Zellen und im Hintergrund ausgewachsene Ovula.

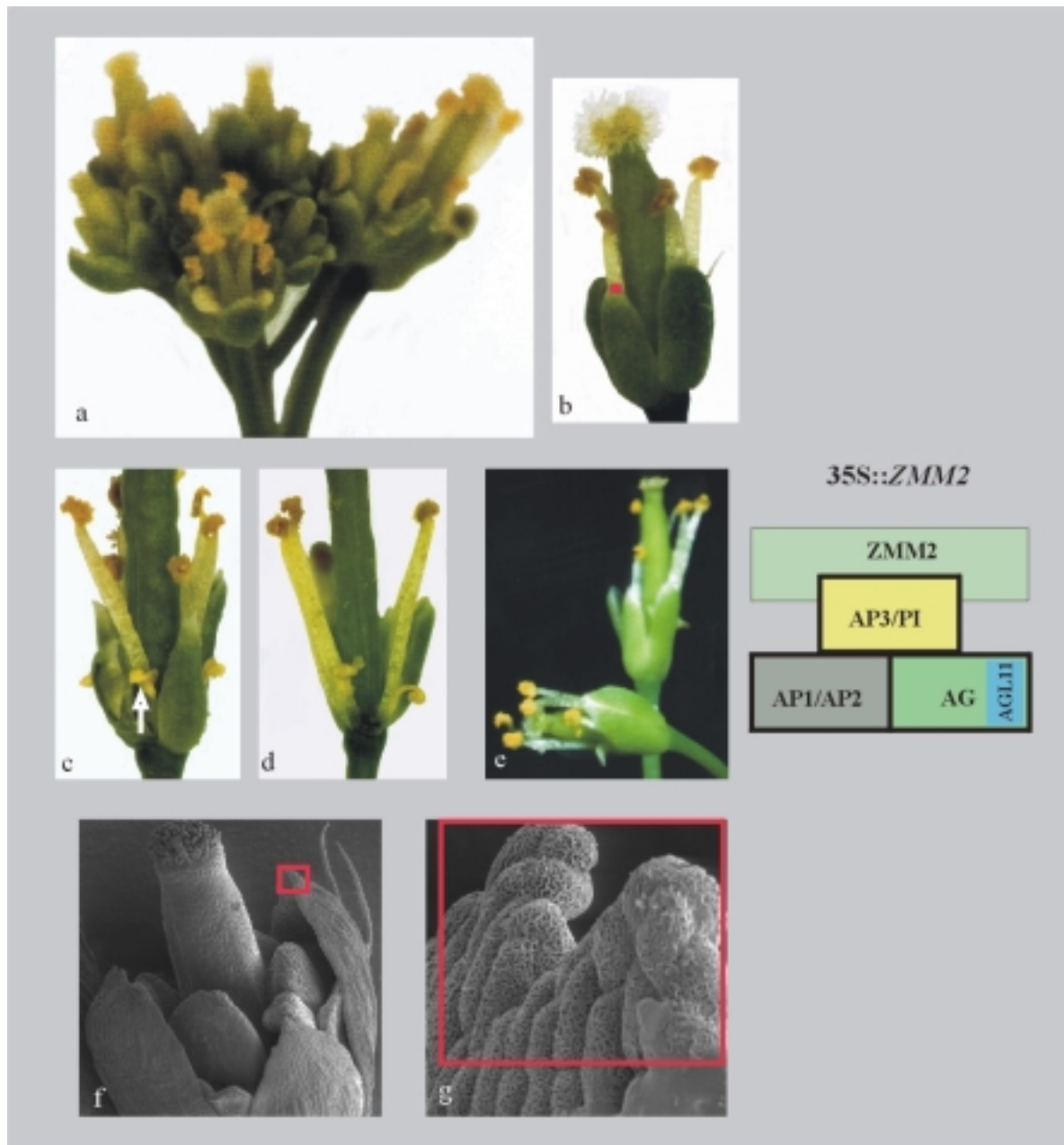


Abbildung 17: zeigt den Blütenphänotyp von *ZMM2* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. a: Infloreszenz ohne erkennbare Petalen, b, c und d Blüten ohne erkennbare Veränderungen an Sepalen, aber mit deutlich staminoiden Petalen (Pfeil). f und g zeigen Sepalenrand in starker Vergrößerung, g zeigt typische Sepalenzellen mit starker Wachsbeschichtung.

seiner Zellstruktur nicht von wildtypischen Sepalenzellen unterscheidet. Auch an etwas zerfrantzt erscheinenden Sepalenrändern, an denen stigmatisches Gewebe oder Ovula erwartet werden könnten, sind ausschließlich für Sepalen typische, stark mit Wachs überzogene Zellen zu finden (Abb.17g). Im 3. und 4. Wirtel der 35S::*ZMM2 Arabidopsis*-Pflanzen waren auch unter dem Rasterelektronenmikroskop keine homöotischen Veränderungen zu erkennen. Die Überexpression von *ZMM2* hat also nur im 2. Blütenwirtel zu homöotischen Transformationen geführt.

3.2.3.3.8 35S::*MAG*

MAG aus *Magnolia stellata* vertritt die Gruppe der basalen Angiospermen und fällt innerhalb der *AGAMOUS*-Genfamilie in eine eigene Genklade (Abb.5). In Abbildung 18 werden die Überexpressionsphänotypen von *MAG* in der Blüte und die entsprechende Darstellung des ABC-Modells gezeigt. Die Blüten von transgenen 35S::*MAG Arabidopsis*-Pflanzen sind etwas kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Untersuchungen unter dem Binokular zeigen keine sichtbaren Veränderungen der vier Blütenwirtel (Abb.18a). Zu beobachten sind aber eine geringere Dichte von Trichomen auf den Außenseiten der Sepalen und in einigen Fällen leicht nach innen eingerollte Petalen, wie sie auch bei 35S::*GGM3 Arabidopsis*-Pflanzen zu beobachten sind. Die Sepalen sind verglichen mit wildtypischen Sepalen etwas blasser. Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigen, daß partielle homöotische Transformationen der Sepalen durch die Überexpression von *MAG* erzielt werden. So bildet sich an den Rändern der Sepalen stigmatisches Gewebe (Abb.18b und 18c). Somit hat sich der 1.Wirtel der 35S::*MAG Arabidopsis*-Pflanzen in der Tendenz der Entwicklung des 4. Wirtels (Karpelle) vom Wildtyp angenähert. Im 2. Wirtel, den Petalen, sowie im 3. und 4. Wirtel der 35S::*MAG Arabidopsis*-Pflanzen sind auch unter dem Rasterelektronenmikroskop keine homöotischen Veränderungen zu erkennen gewesen. Somit hat die Überexpression von *MAG* nur im 1. Blütenwirtel zu einer partiellen homöotischen Veränderung geführt.

3.2.3.3.9 35S::*GGM3*

GGM3 wurde als Vertreter eines Gymnospermengens ausgewählt und ist von allen ausgewählten Vertretern der *AGAMOUS*-Genfamilie das am entferntesten verwandte Gen zu *AG* (Abb.5). In Abbildung 19 werden die Überexpressionsphänotypen von *GGM3* in der Blüte und wieder das entsprechende ABC-Modell dargestellt. Die Blüten von 35S::*GGM3* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind etwas kleiner als wildtypische Blüten von *Arabidopsis thaliana*. Untersuchungen unter dem Binokular zeigen, daß die inneren beiden Wirtel,

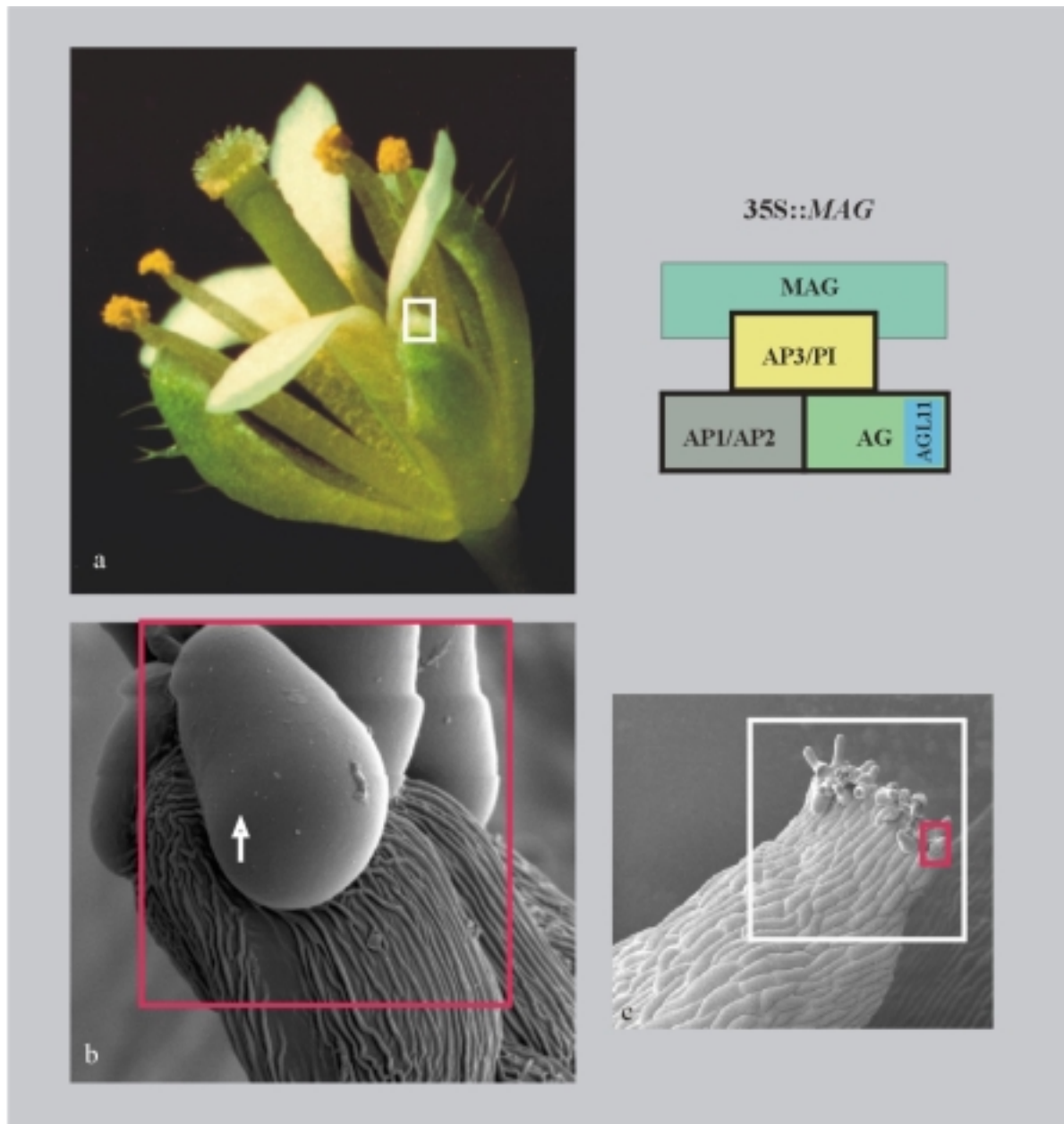


Abbildung 18: zeigt den Blütenphänotyp von *MAG* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. In **a** sind keine auffälligen Veränderungen zu beobachten. **b** und **c** zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von stigmatischen Zellen am Rand von Sepalen.

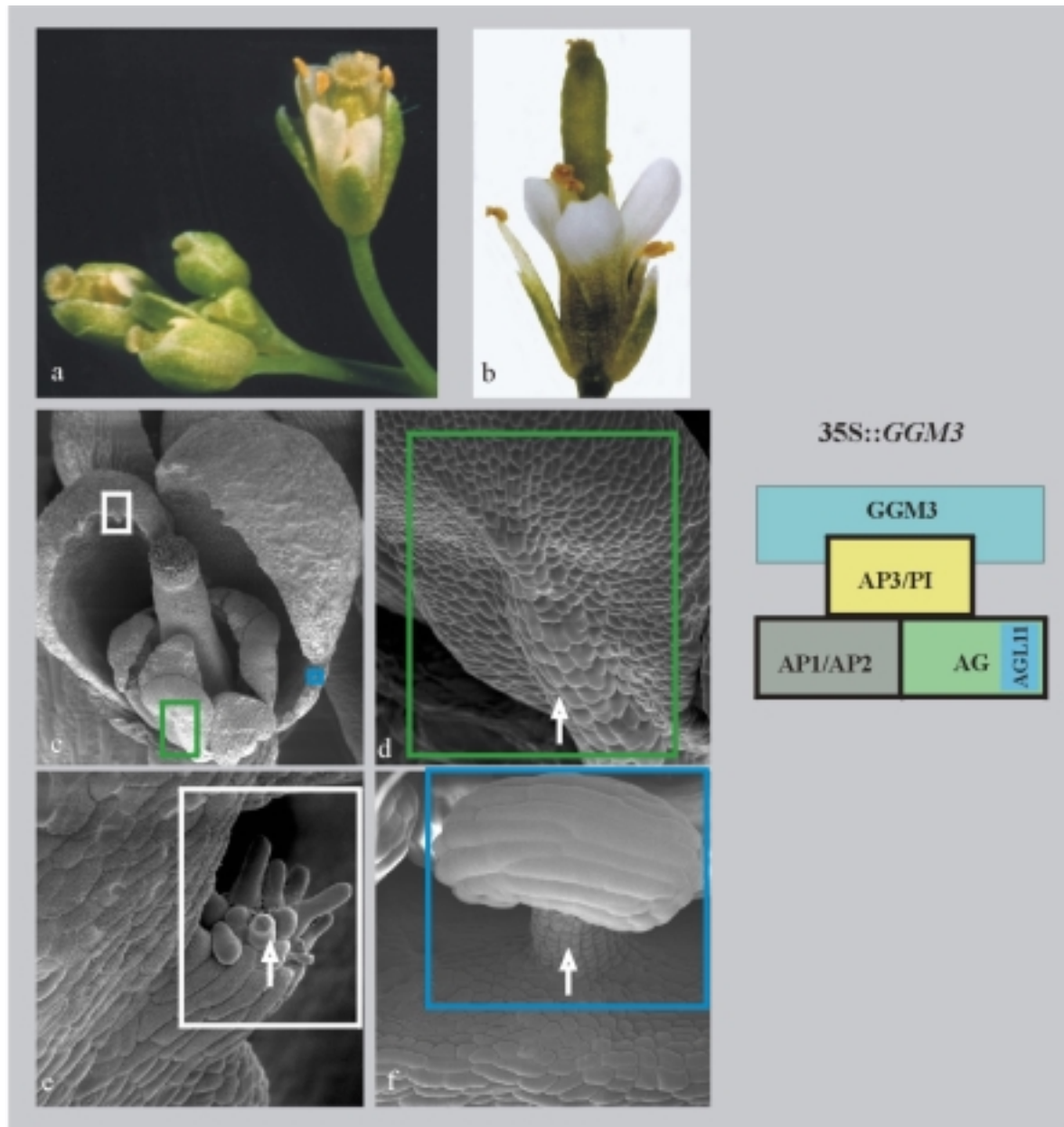


Abbildung 19: zeigt den Blütenphänotyp von *GGM3* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen. In a und b sind reduzierte Petalen zu beobachten. C zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme, in der mit drei farbigen Kästchen Stellen markiert sind, die in d, e und f vergrößert dargestellt sind. Das grüne Kästchen in d zeigt eine junge Petale mit filamentartigen Veränderungen (Pfeil), das weiße Kästchen zeigt stigmatische Zellen am Rand einer Sepale, und das blaue Kästchen zeigt ein Ovulum, das an der Seite einer Sepale wächst.

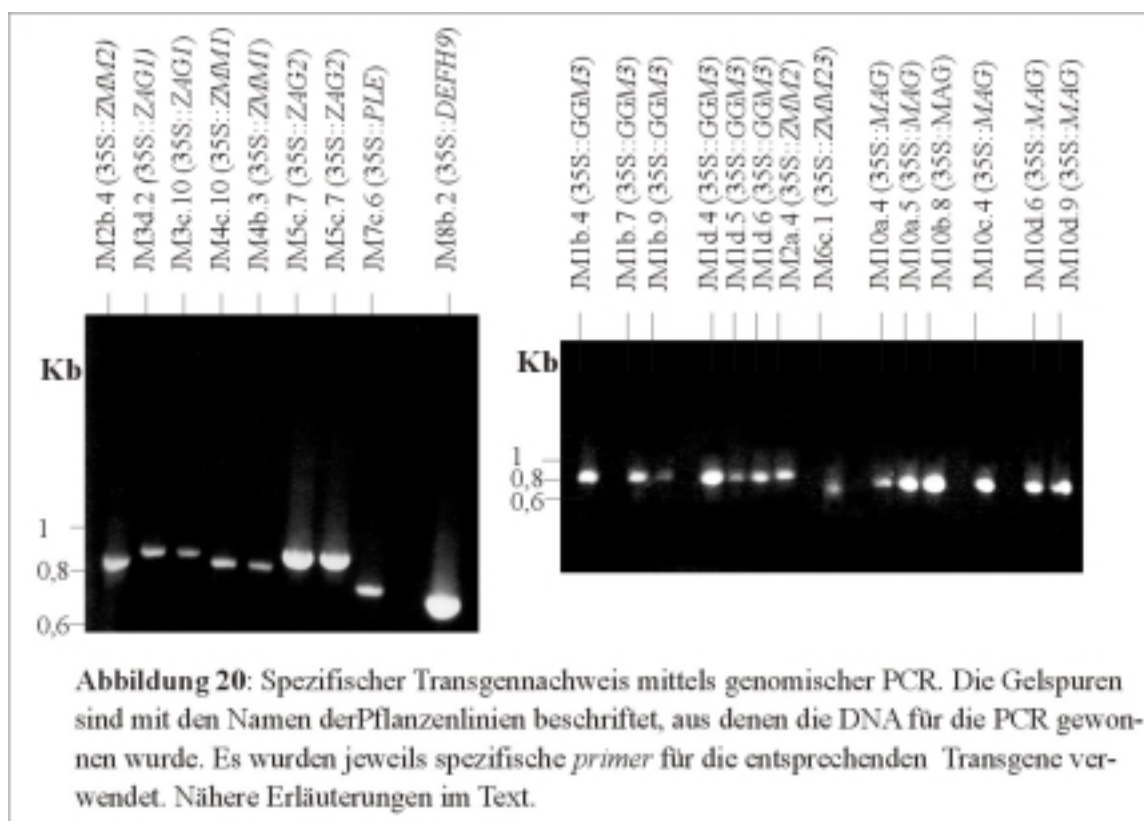
Karpelle und Stamina, nahezu unverändert zum Wildtyp ausgeprägt sind (Abb.19a und 19b), während der 3. Wirtel, die Petalen, im Verhältnis zu den anderen Blütenorganen kleiner, deutlich länglicher und zum Teil leicht eingerollt sind (Abb.19a und 19b). Die Farbe der Petalen ist weiß, wie im Wildtyp. Die Sepalen der 35S::*GGM3* transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen sind häufig nicht so kräftig grün wie im Wildtyp und sehen an den Rändern häufig leicht zerfranzt aus. Die Zellstruktur auf den Sepalen ist etwas geordneter, und die einzelnen Zellen sind kleiner als in Wildtypsepalen (Abb.19e). Zu beobachten ist außerdem eine geringere Dichte von Trichomen auf den Außenseiten der Sepalen im Vergleich zu Wildtypsepalen. Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigen, daß partielle homöotische Transformationen der Sepalen und der Petalen durch die Überexpression von *GGM3* erzielt werden. So bildet sich an den Rändern der Sepalen stigmatisches Gewebe, das durch seine sehr charakteristischen glatten und langgestreckten Zellen eindeutig zu erkennen ist (Abb.19e). In einigen Fällen sind an den Sepalenrändern sogar ektopische Ovula entstanden (Abb.19f). Somit hat sich der erste Wirtel der 35S::*GGM3* *Arabidopsis*-Pflanzen in der Tendenz der Entwicklung des 4. Wirtels angenähert. Diese Entwicklungsrichtung entspricht der Erwartung, dass ein zu *AG* ähnliches Gen, wie *GGM3*, einen ähnlichen Entwicklungsprozess in Gang bringen könnte wie *AG*, wenn es ektopisch im 1. Wirtel exprimiert wird. Wird *AG* im 1. Wirtel exprimiert, so kann es die Bildung funktionstüchtiger Karpelle einschließlich Ovula anstelle der Kelchblätter bewirken. Auch in den Petalen der 35S::*GGM3* *Arabidopsis*-Pflanzen sind unter dem Rasterelektronenmikroskop partielle homöotische Transformationen zu erkennen. In der Mitte der Längsachse eines jeden Petales bilden sich filamentähnliche Zellen, die in einer wildtypischen Blüte von *Arabidopsis thaliana* ausschließlich in den Stamina vorkommen (Abb.19c und 19d). Auch diese Entwicklungsrichtung entspricht der Erwartung, daß ein zu *AG* ähnliches Gen, wenn es im 2. Wirtel exprimiert wird, zu einer Umwandlung von Petalen zu Stamina führt. Im 3. und 4. Wirtel der 35S::*GGM3* *Arabidopsis*-Pflanzen waren auch unter dem Rasterelektronenmikroskop keine homöotischen Veränderungen zu erkennen. Die ektopische Expression von *GGM3* hat also nur in den äußeren beiden Wirteln erkennbare homöotische Veränderungen bewirkt.

3.2.4 Molekulare Analyse

In den folgenden Abschnitten werden die molekularen Analysen der Überexpressionspflanzen bezüglich der Kopienzahl der Transgene und ihrer Expression dargestellt.

3.2.4.1 Transgennachweis auf genomischer Ebene

Als Schnelltest für den Transgennachweis in den Pflanzen, die phänotypisch untersucht wurden, wurde eine jeweils Transgen-spezifische PCR durchgeführt. Das jeweilige Transgen konnte in den untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden (Abb.20). Dabei wurden Transgen-spezifische *primer* verwendet (siehe Anhang). Die genomische DNA der transgenen Pflanzen sollte auch daraufhin untersucht werden, wie oft das Transgen bei der *in planta*-Transformation in das Genom integriert worden ist. Dieser Nachweis wurde mit einer DNA-Gelblotanalyse geführt, die auch als zusätzliche Kontrolle dient, daß die entsprechenden Pflanzen das gewünschte Transgen enthalten. Mit der CTAB-Methode (siehe 2.5.2) wurde DNA verschiedener transgener Pflanzen isoliert, diese dann mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach einem Transfer dieser aufgetrennten DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran mit Hilfe eines Kapillarblottes wurde die DNA mit einer BASTA-Resistenzgen-spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Es wird davon ausgegangen, daß die Anzahl der Integrationen



des BASTA-Resistenzgens eine obere Grenze der Anzahl der Transgenintegrationen darstellt.

Abbildung 21: DNA-Gelblotybridisierungen auf genomische DNA einzelner transgener Pflanzen (Pflanzennomenklatur siehe S 19). Als Hybridisierungssonde wurde ein 300 bp-Fragment des BASTA-Resistenzgens eingesetzt. Die DNA wurde jeweils mit EcoRI und HindIII geschnitten, bei der Beschriftung mit (E) und (H) gekennzeichnet.

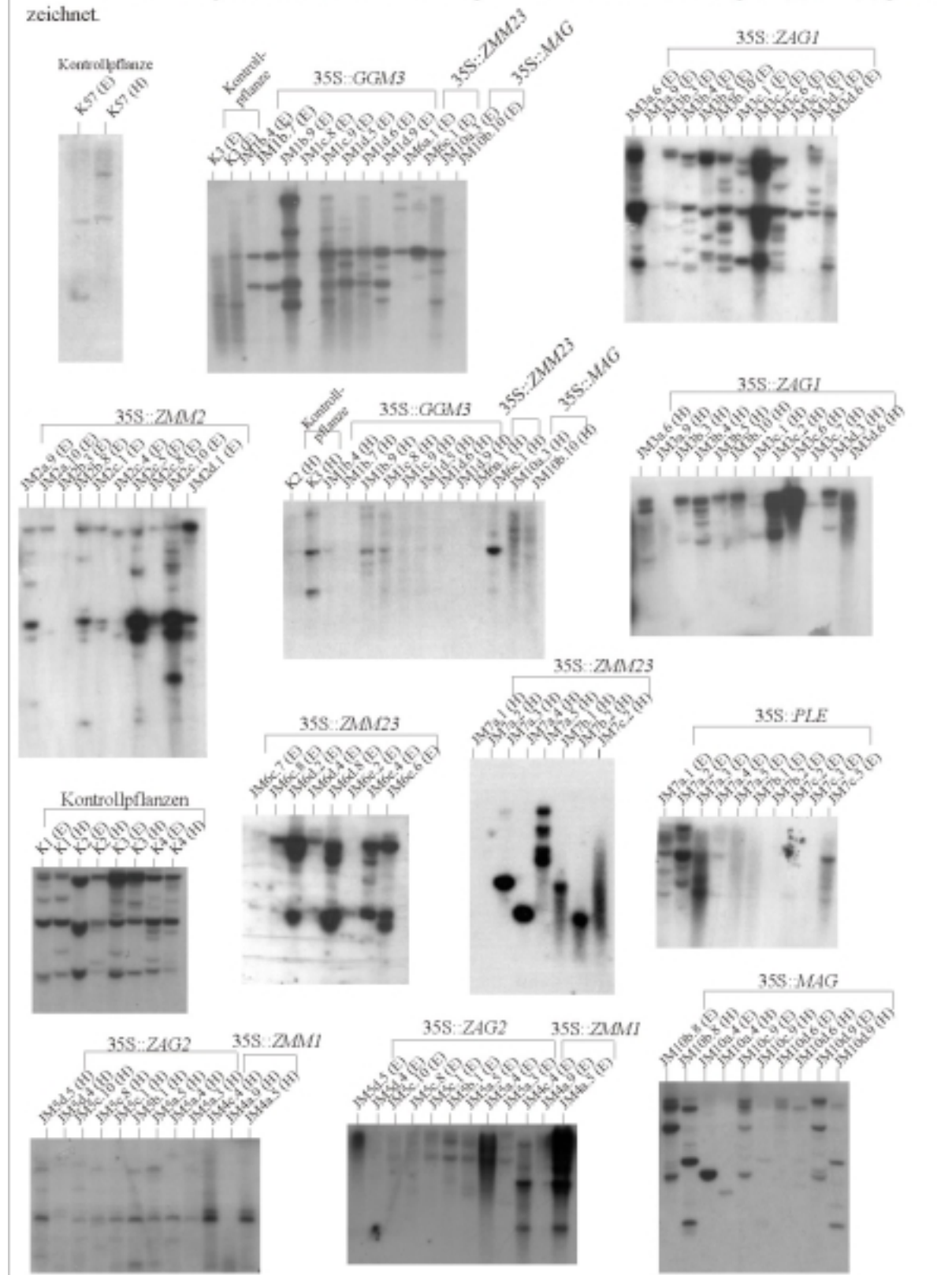


Abbildung 21 zeigt, daß das Transgen in den meisten Fällen wahrscheinlich in drei und mehr Kopien in das Genom von *Arabidopsis thaliana* integriert worden ist. Eine hohe Kopienzahl des Transgens im Genom führt auch zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, daß ein anderes Gen im Genom von *Arabidopsis thaliana* beschädigt sein könnte. So könnte durch die Integration eines Fremdgens ein endogenes Gen beschädigt werden und auf diese Weise eine phänotypische Veränderung verursachen. Um die Analyse von Phänotypen solcher Effekte möglichst auszuschließen, wurden keine Pflanzenlinien mit nur einmal auftretenden veränderten Merkmalen analysiert. Die Wahrscheinlichkeit, daß mehrere unabhängige Fremdgen-Integrationen die gleichen Positionen im Genom betreffen, wurde als sehr gering eingeschätzt. Die Wahrscheinlichkeit, eventuell solche Artefakte zu analysieren, minimiert sich weiter, wenn in Betracht gezogen wird, daß es sich bei den Überexpressionsphänotypen der verschiedenen Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie immer um ähnliche Phänotypen handelt.

3.2.4.2 Transkriptionsnachweis der Transgene

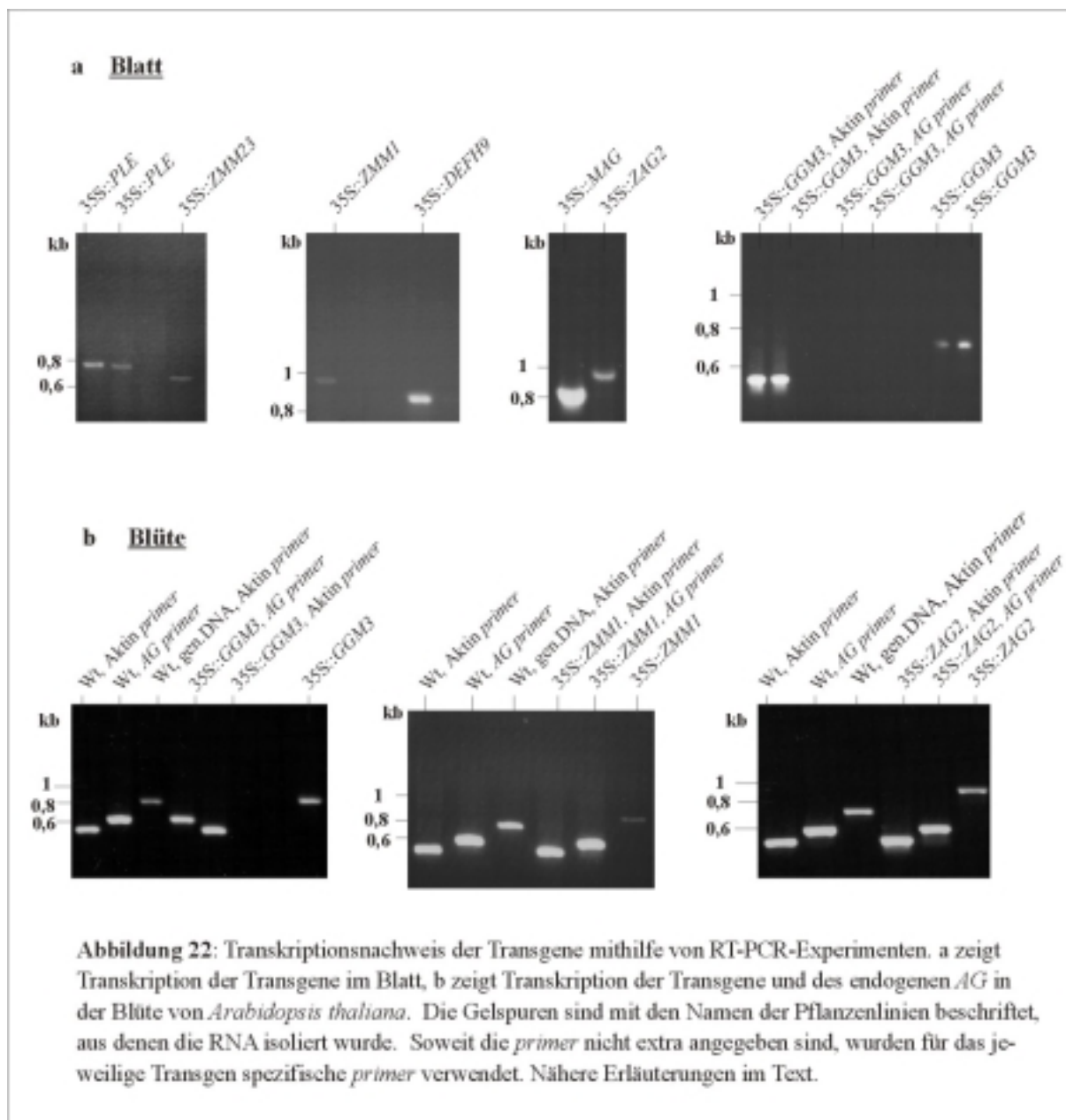
Die erfolgreiche Integration eines Fremdgens in das Genom einer Pflanze bedeutet noch nicht, daß dieses Gen auch transkribiert wird. An ausgewählten Pflanzen wurde deshalb mit Hilfe der RT-PCR Technik ermittelt, ob auch Transgentranskript in der jeweiligen Pflanze gebildet wird (Abb.22). Dafür wurde RNA aus Blättern bzw. Blüten der Pflanzenlinien isoliert, die auch phänotypisch genau untersucht worden waren. Die isolierte RNA muss DNA-frei sein, um sicherzustellen, daß bei der RT-PCR nicht die jeweilige integrierte Fremd-cDNA auf genomischer Ebene amplifiziert wird. Deshalb wurden für die cDNA-Synthese nur RNA-Präparationen verwendet, die mit einer PCR mit Intron-umspannenden Aktin-*primern* kein Amplifikat ergeben hatten und somit DNA-frei waren. DNA-freie RNA wurde in eine cDNA geschrieben, mit der dann mit den für das jeweilige Transgen spezifischen *primern* (Anhang 8.2, genspezifische *primer*) die RT-PCR vorgenommen wurde. Abbildung 22a zeigt, daß die Transgene in Blättern nachgewiesen werden konnten. Für eine Linie der 35S::*GGM3* (JM1b.4) wurde auch getestet, ob das endogene *AG* in Blättern durch die Anwesenheit von *GGM3*-Transkript ebenfalls ektopisch transkribiert wird (Abb.23a, rechtes Bild). Eine Hochregulation von *AG*-Transkript in Blättern konnte nicht nachgewiesen werden. Am Beispiel von transgenen Pflanzen für 35S::*GGM3*, 35S::*ZMM1* und 35S::*ZAG2* (dabei wurden extra auch Blüten getestet, die keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zeigten) wurde geprüft, ob ein entsprechendes Transgentranskript in der Blüte nachgewiesen werden kann. Aus jeweils einer cDNA-Präparation wurde eine RT-PCR mit Aktin-*primern*, *AG-primern* und den spezifischen Transgen-*primern* durchgeführt. Die Aktin-*primer* sind so ausgewählt,

daß sich ein Amplifikat von cDNA und genomischer DNA durch einen Größenunterschied von 400 bp unterscheiden lässt, aufgrund eines in der genomischen DNA liegendes Intron. In jedem abgebildeten Gel in Abbildung 22b ist zur Orientierung ein genomisches Aktinfragment mitaufgetragen, das in einer anderen PCR auf genomische DNA aber mit denselben *primern* amplifiziert wurde wie das Aktinfragment aus der RT-PCR. Aus Abbildung 22b geht hervor, daß in den transgenen Blüten sowohl das jeweilige Transgen als auch das endogene *AG* transkribiert wird. Eine quantitative Aussage über die verschiedenen Transkripte lässt sich nicht treffen, weil die Bindequalität der verschiedenen *primer* unterschiedlich ist. Jedoch ist trotzdem zu beachten, daß das endogene *AG* immer weitaus stärker amplifiziert wurde als das jeweilige Transgen. In dieser Arbeit wurde in einem weiteren Experiment getestet, ob eine Hochregulierung des endogenen *AG* die Überexpressionsphänotypen verursacht.

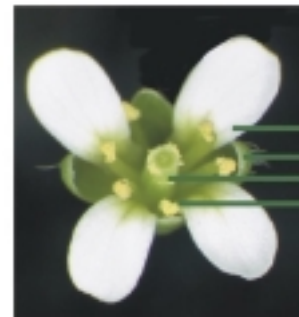
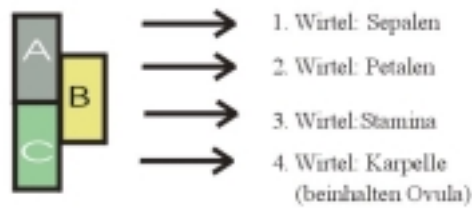
3.3 Komplementationsversuch von *agamous* durch 35S::*GGM3*

Alle homöotischen Veränderungen der Blütenorgane durch die Überexpression von Genen der *AGAGMOUS*-Genfamilie im genotypisch wildtypischen Hintergrund von *Arabidopsis thaliana* könnten auch durch eine veränderte Regulierung des endogenen *AG*-Proteins verursacht werden. Aufgründessen wurde 35S::*GGM3* (Linie JM1b.4), in die Funktionsverlustmutante (Abb.23) von *Arabidopsis thaliana* gekreuzt. An dem Beispiel des putativ *AG*-orthologen Gens *GGM3* aus der Gymnospermengruppe *Gnetum gnemon*, soll getestet werden, ob die Überexpressionseffekte wie sie im vorangegangenen Kapitel beschrieben worden sind, unabhängig von endogenem *AG* verursacht werden konnten. Das Aussehen der *agamous*-Blüte sowie das ihr zugrunde liegende ABC-Modell im Vergleich zur Wildtypkonstellation ist in Abbildung 23 dargestellt. Durch einen vollständigen Verlust von *AG* breitet sich die A-Funktionsgene *AP1* und *AP2* auch im 3. und 4. Wirtel aus, so daß im 3. Wirtel A-Funktionsgene mit B-Funktionsgenen zusammenwirken und zur Bildung von Petalen führen, während sich im 4. Wirtel erneut ein Organkreis Sepalen (wie im 1. Wirtel) bildet. Außerdem wird die Determinierung der Blüte derart aufgehoben, daß sich bis zu 20 Blütenkreise bilden, in denen sich immer zwei Blütenkreise Petalen und ein Blütenkreis Sepalen abwechseln (Abb.23). Die Fragestellung ist also erstens, ob und wenn ja, in welchem Maße 35S::*GGM3* in der Lage ist, *agamous* zu komplementieren sowie zweitens, welche Überexpressionseffekte in *agamous* verglichen mit Überexpressionseffekten im Wildtyp

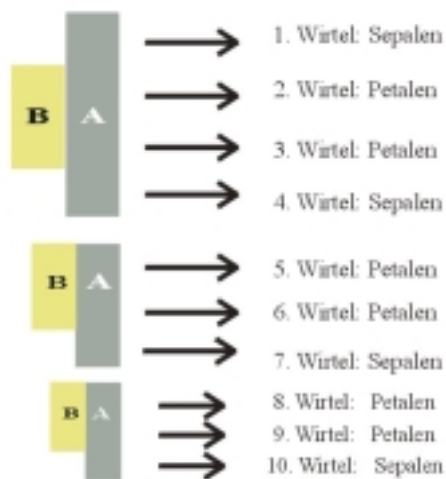
aufzutreten. *GGM3* ist aus dieser Überexpressionsstudie das zu *AG* am entferntesten verwandte Gen und das putativ *AG*-orthologe Gen. *GGM3* ist in seinem Ursprungsorganismus an der Bildung weiblicher und männlicher Sporophylle beteiligt (Winter *et al.*, 1999), allerdings kann man diese Strukturen nicht leicht mit Stamina, Karpellen und Ovulen aus *Arabidopsis thaliana* homologisieren. Bisher garnicht lässt sich das Karpell mit einer Struktur aus Gymnospermen analogisieren, weil das Vorhandensein eines Karpells genau eines der Hauptkriterien ist, das Gymnosperme von Angiospermen unterscheidet. Bei Gymnospermen



a Wildtypblütenorgananordnung



b Blütenorgananordnung in *agamous*



Indeterminierte Blüte,
bis über 20 Wirtel

Abbildung 23: In a ist eine Wildtypblüte von *Arabidopsis thaliana* in Aufsicht zu sehen mit der entsprechenden schematischen Darstellung der Blütenorganidentitätsgene des ABC-Modells. b zeigt den Phänotyp einer *agamous* Funktionsverlustmutante mit der entsprechenden schematischen Darstellung der Blütenorganidentitätsgene des ABC-Modells.

liegen die Samenanlagen ohne eine geschlossene Hüllstruktur vor, bei Angiospermen liegen die Samenanlagen in eine geschlossene Hüllstruktur, im Karpell, eingebettet. Somit zielt das folgende Experiment auch auf die Frage ab, ob die Verwandtschaft von *AG* und *GGM3* in der Weise ausreicht, daß *GGM3* *AG*-spezifische Entwicklungsprozesse, wie z.B. Karpellentwicklung, in *Arabidopsis thaliana* steuern und ausführen kann, die es in seinem Ursprungsorganismus, *Gnetum gnemon*, nicht gibt. Kann *GGM3* mit Genen aus *Arabidopsis thaliana* interagieren, für die es keine entsprechenden homologen Gene in *Gnetum gnemon* gibt?

3.3.1 Kreuzung von 35S::*GGM3* mit *agamous*

Da die rezessive *agamous*-Mutation im homozygot mutanten Zustand weder Stamina noch Karpelle ausbildet, musste 35S::*GGM3* in heterozygote *agamous*-Pflanzen eingekreuzt werden. Als Empfängerpflanze diente *ag-3*, eine *splicing*-Mutante (Yanofsky *et al.*, 1990), als Spenderpflanze 35S::*GGM3* (JM1b.4), in der 35S::*GGM3* in zwei Kopien vorliegt. Die Empfängerpflanze musste im heterozygoten Zustand vorliegen, weil die homozygote Mutation ja keine Karpelle und Stamina besitzt. Die *ag-3*-Population segregiert im Verhältnis 1:2:1 für *ag/ag*: *ag/AG*: *AG/AG*, von denen $\frac{3}{4}$ (nämlich *ag/AG* und *AG/AG*) wildtypischen Phänotyp haben, und $\frac{1}{4}$ (nämlich *ag/ag*) den mutanten Phänotyp (Abb.23). Als Elterngeneration dienten:

	Spenderpflanze:		Empfängerpflanze
Genotyp:	<u>35S::<i>GGM3</i>/35S::<i>GGM3</i>; <i>AG/AG</i></u>	x	<u><i>AG/ag</i></u>
Phänotyp:	Überexpression (Abb.19)		Wildtyp (Abb.10)

Diese Kreuzung wurde mit fünf verschiedenen wildtypisch aussehenden *Arabidopsis*-Pflanzen der heterozygoten *ag-3*-Population, die als Empfängerpflanzen dienten, durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein 35S::*GGM3/AG* mit *ag* rekombiniert berechnet sich wie folgt: $1-(2/3)^5 = 0,86$, das entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 86%, weil

- die Empfängerpflanzen unter den wildtypisch aussehenden Pflanzen der *ag-3*-Population zu $\frac{2}{3}$ *AG/ag* und zu $\frac{1}{3}$ *AG/AG* vorliegen, und
- sich zu 50% ein 35S::*GGM3/AG* mit dem *ag*-Allel einer *ag/AG*-Empfängerpflanze rekombiniert.

Die Samen aus den auswachsenden Schoten der fünf Kreuzungen (F1-Pflanzen) wurden ausgesät. In den F1-Generationen der 5 Ursprungskreuzungen hatten ausschließlich alle Nachkommen, die 35S::*GGM3* positiv waren, mindestens ein endogenes *AG*-Allel, das von der Spenderpflanze (35S::*GGM3/AG*) stammte. Der Phänotyp einer solchen Pflanze aus der F1-Generation ist in Abbildung 24 dargestellt. Erst nach der Selbstung der F1-Generation, kann auch das *AG* aus der Spenderpflanze ausgekreuzt werden. In der F2-Generation ist dann wieder eine für *agamous* segregierende Population zu erwarten.

F1-Generation, nicht segregierend (Abb.24):

Kr1	Kr2:	Kr3	Kr4	Kr5
35S:: <i>GGM3/AG</i>	35S:: <i>GGM3/AG</i>	35S:: <i>GGM3/AG</i>	35S:: <i>GGM3/AG</i>	35S:: <i>GGM3/AG</i>
<i>AG</i>	<i>ag</i>	<i>AG</i>	<i>AG</i>	<i>AG</i>

F2-Generation, nach Selbstung der F1-Generation, segregierend, (Abb.25):

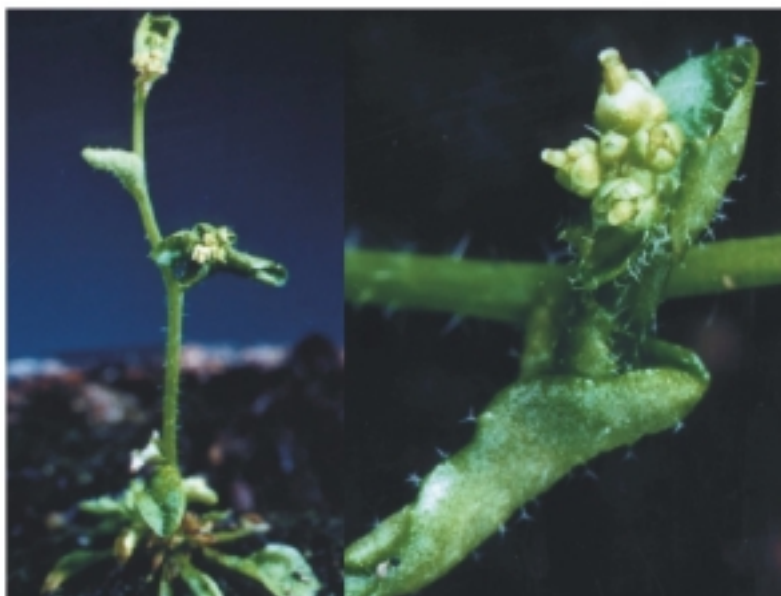


Abbildung 24: Phänotyp der Pflanze aus der F1-Generation der Kreuzung *ag/AG* x 35S::*GGM3/35S::GGM3*; *AG/AG*, aus der in der F2-Generation *ag/ag*; 35S::*GGM3/35S::GGM3*- Pflanzen hervorgingen.

Kr1	Kr2:	Kr3	Kr4	Kr5
-	+	-	-	-
	<i>ag/ag</i>			

Nur aus Kreuzung 2 hatte sich *AG* in der folgenden Generation ausgekreuzt, und es wurden wieder phänotypische *agamous*-Mutanten in der segregierenden Population gefunden. Deshalb wird nur die Folgegeneration von Kreuzung 2 weiter beschrieben, in der Kandidatenpflanzen für 35S::*GGM3*;ag/ag (Abb.25, Abb.26) zu finden waren. Vermutung aufgrund phänotypischer Merkmale). Aus den fünf angesetzten Kreuzungen, hat sich nur in einem Fall, der Kreuzung 2, 35S::*GGM3* mit dem mutanten *ag*-Allel gekreuzt. Der Erfolg der Ursprungskreuzung für die Komplementation wurde also erst durch die Phänotypen der F₂-Generation selektiert. Die Nachkommen der Kreuzung 2 wurden daraufhin phänotypisch und molekular genauer untersucht.

Theoretisch können drei mögliche grundsätzlich unterschiedliche Phänotypen für 35S::*GGM3*;ag/ag- Pflanzen erwartet werden:

- entweder komplementiert 35S::*GGM3* *agamous* erfolgreich, so daß es zur Bildung von Stamina und Karpellen im 3. bzw. 4. Wirtel kommt,
- oder 35S::*GGM3* kann *agamous* nicht komplementieren, so daß die Blüten wie *agamous*-Blüten aussehen,
- oder 35S::*GGM3* kann *agamous* teilweise komplementieren, so daß weder *agamous*-Blüten noch komplett komplementierte Blüten entstehen, sondern ein intermediärer Phänotyp.

Die F₂-Generation aus Kreuzung 2, segregiert für den *ag* Locus 3:1, d.h. ¼ der Pflanzen zeigen einen *agamous* mutanten, wenn auch z.T. etwas verändert (Abb.25 und Abb.26) Blütenphänotyp. Die Stielchen der neu auswachsenden Blüten innerhalb der Blüten sind oft deutlich länger als in *agamous*-Blüten (vergl. Abb.25 und Abb.26 mit Abb.23). Das Vorhandensein von 35S::*GGM3* wurde durch BASTA vorselektiert, war zusätzlich durch eingerollte Blätter zu erkennen und wurde mit Hilfe der PCR-Technik spezifisch nachgewiesen (Abb.28). Nachfolgend wird das Segregationsverhältnis von *AG* dargestellt. Die Segregation von 35S::*GGM3* verläuft dagegen nicht im Verhältnis ¼ sondern 1/16, da die verwendete 35S::*GGM3*-Pflanze in zwei Kopien des Transgens enthält. Nach der Selbstung von 35S::*GGM3*;AG/ag segregieren die Nachkommen bei einer ungekoppelten Vererbung wie folgt:

<i>AG/AG</i> Pflanze 1	<i>AG/AG</i> Pflanze 2	<i>AG/AG</i> Pflanze 3	<i>AG/AG</i> Pflanze 4
<i>AG/ag</i> Pflanze 5	<i>AG/ag</i> Pflanze 6	<i>AG/ag</i> Pflanze 7	<i>AG/ag</i> Pflanze 8
<i>ag/AG</i> Pflanze 9	<i>ag/AG</i> Pflanze 10	<i>ag/AG</i> Pflanze 11	<i>ag/AG</i> Pflanze 12
<i>ag/ag</i> Pflanze 13	<i>ag/ag</i> Pflanze 14	<i>ag/ag</i> Pflanze 15	<i>ag/ag</i> Pflanze 16

So wären 4/16 der Population (in der Tabelle fett hervorgehobenen) Kandidaten für die Komplementation von *agamous* mit 35S::*GGM3*. Von 16 Pflanzen sind 15 Pflanzen für 35S::*GGM3* positiv, weil 35S::*GGM3* homozygot in zwei Kopien als Spenderpflanze für die Kreuzung vorlag. Nur eine von 16 Pflanzen ist für beide Loci 35S::*GGM3* in beiden Kopien negativ. Das heißt, daß theoretisch $15/16 \times \frac{1}{4}$, das sind $15/64=0,23$, das entspricht 23% der segregierenden Population die gewünschte genotypische Konstellation 35S::*GGM3*;*ag/ag* haben.

3.3.2 Phänotypische Analyse

Unter den Nachkommen der Kreuzung 2 gibt es die folgenden vier Hauptgruppen, die sich phänotypisch mit dem Auge gut unterscheiden lassen :

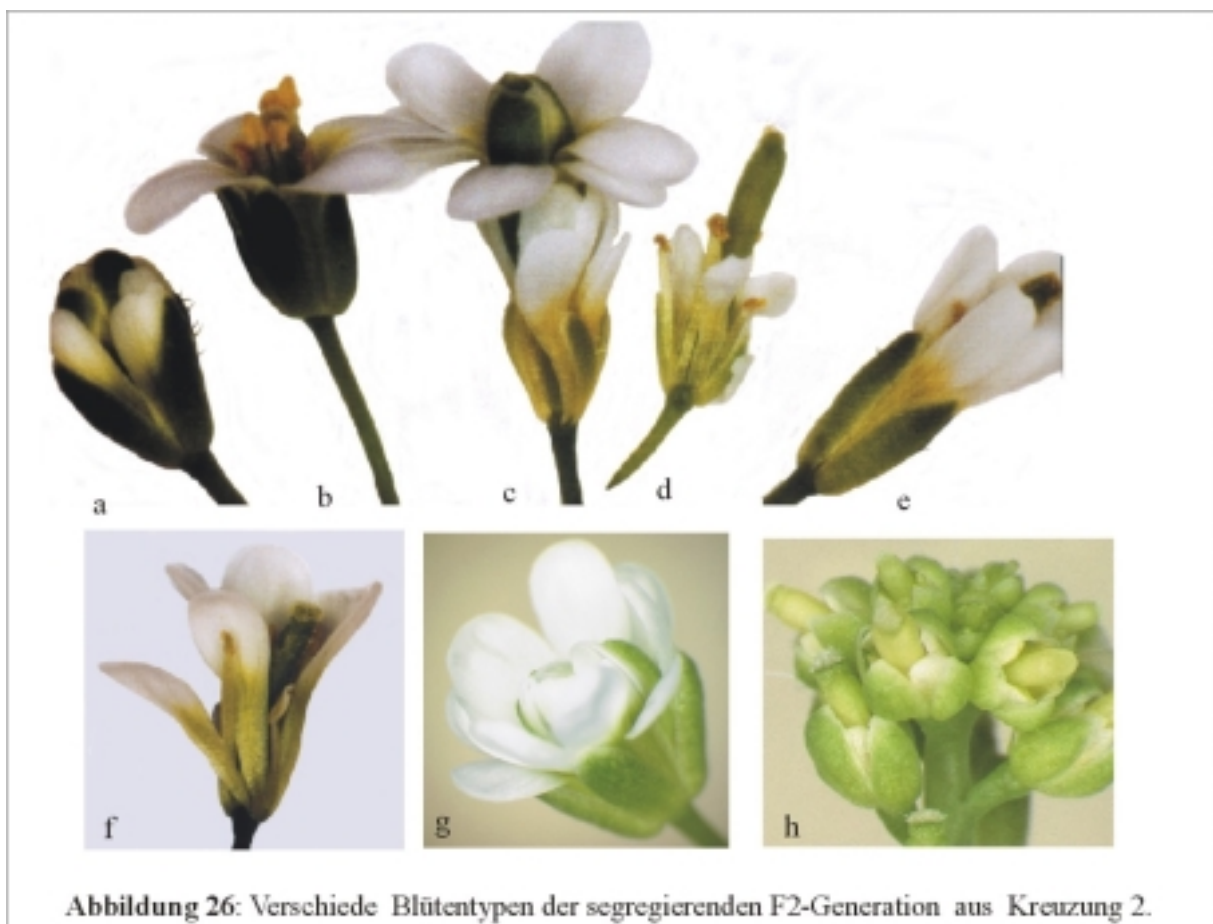
- 1) Wildtypblüte und Wildtypblätter (nicht BASTA resistent)
- 2) 35S::*GGM3*-Blüte und eingerollte Blätter (BASTA resistent)
- 3) *agamous*-Blüte und Wildtypblätter (nicht BASTA resistent)
- 4) veränderte *agamous*-Blüte und eingerollte Blätter (BASTA resistent)

von denen aber die Gruppe 2 und danach Gruppe 4 quantitativ den größten Anteil ausmachen, was mit den zwei Kopien an 35S::*GGM3*, die in der Spenderpflanze waren, zu erklären ist. In Abbildung 26 sind die verschiedenen Blütenphänotypen dieser segregierenden Population der F2-Generation der Kreuzung 2 dargestellt. Abbildung 26a, c und g zeigt Blüten ohne Stamina und Karpelle, von denen 26c aber eine ungewöhnlich langgestreckte Blüte hat. Abbildung 26 d und h zeigt Blüten, die den Überexpressionsphänotypen (siehe auch Abb.19) ähneln, Abbildung 26f zeigt eine Blüte mit fünf statt vier Petalen und einem petaloiden Stamen, Abb.26 b und e zeigt wildtypisch aussehende Blüten.

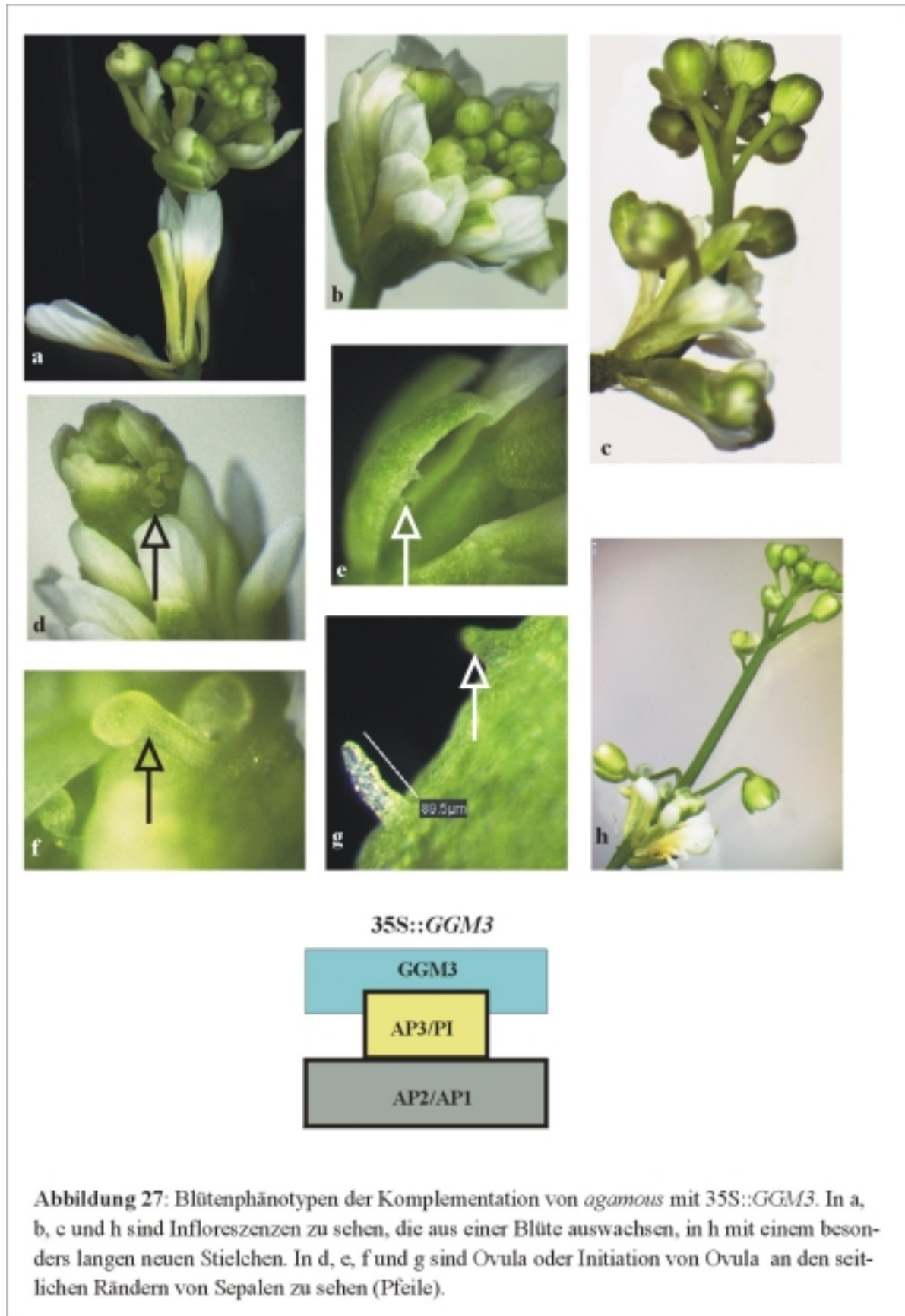
Abbildung 25: Pflanze der F2-Generation, die aus Kreuzung 2 hervorgegangen ist (nähere Erläuterungen im Text).



In dieser Population sollte nun nach Pflanzen gesucht werden, die genotypisch *ag/ag;35S::GGM3* sind. Die besten Kandidaten dafür sind solche Pflanzen, die erstens eingerollte Blätter haben und BASTA-resistent sind, als Indizien für das Vorhandensein der *35S::GGM3*-Kassette, und die zweitens Blüten ohne erkennbare Stamina und Karpelle haben, sondern vielmehr *agamous*-Blüten ähneln, als Indiz für die Abwesenheit eines wildtypischen *AG*-Allels. Pflanzen, die diese beiden Kriterien erfüllen, wurden phänotypisch genauer betrachtet und zeigten verschiedene auffällige Merkmale: die Blüten beginnen mit einem Blütenkreis Sepalen, danach 2-3 Blütenkreise Petalen, dann wieder ein Kreis Sepalen gefolgt von wiederum 2-3 Blütenkreisen Petalen, und dieses Schema wiederholt sich mehrfach bis in der Mitte eine ganz neue Infloreszenz auswächst (Abb.27a, b und c). Jede neu beginnende Infloreszenz in der Blüte sitzt auf einem sehr langen Stielchen (Abb.27c und h). Unter dem Binokular ist zu erkennen, daß auf den inneren Kelchblättern gehäuft Ovula und weniger



häufig stigmatisches Gewebe wachsen (Abb.27d, e, f und g). Unter dem Binokular zeigen außerdem die Petalen wieder einen leicht eingerollten langgezogenen Phänotyp, der dem staminoiden Phänotyp der 35S::*GGM3*-Überexpressionspflanzen ähnelt (Abb.27a und h) In Abbildung 27 wurden Blüten der Pflanze 77 (siehe nachfolgende Tabelle in 3.3.3) genauer

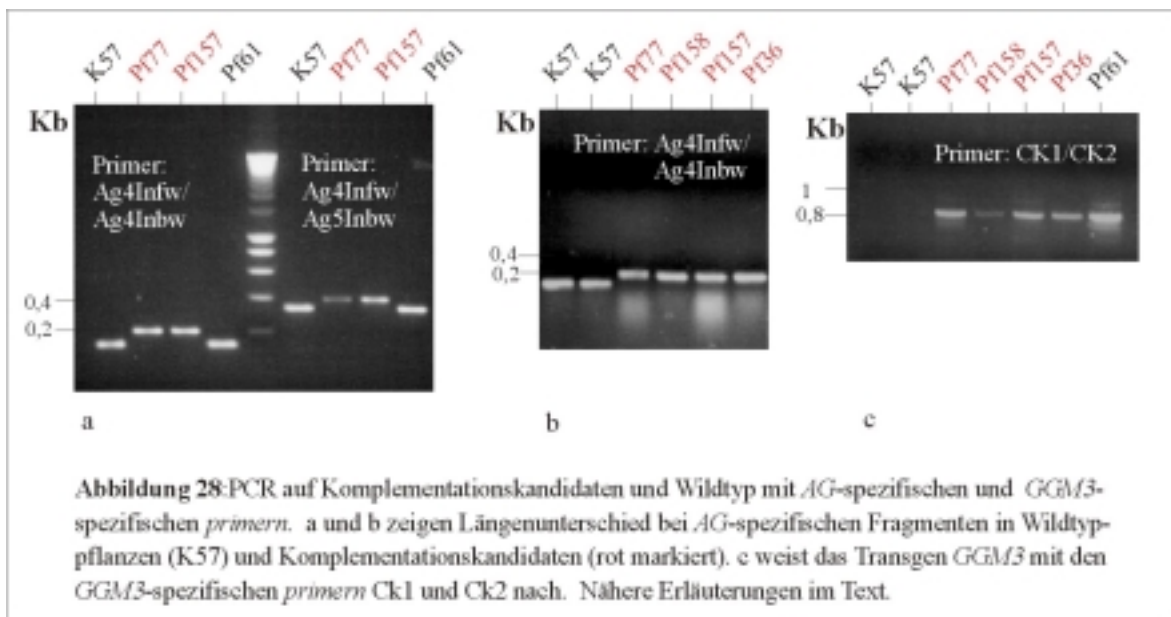


untersucht. Von dieser Pflanze wurde dann das Fragment des *AG*-Gens amplifiziert, in dem die Mutation liegt, um sicherzustellen, daß diese beiden oben beschriebenen Merkmale auf die Komplementation von *agamous* durch *35S::GGM3* zurückzuführen sind. Von der segregierenden F2-Population, die die Komplementationskandidaten enthalten, wurden die Pflanzen 77, 71, 158, 157, 36, 61 und K57, die in der folgenden Tabelle fett hervorgehoben sind, auch molekular untersucht.

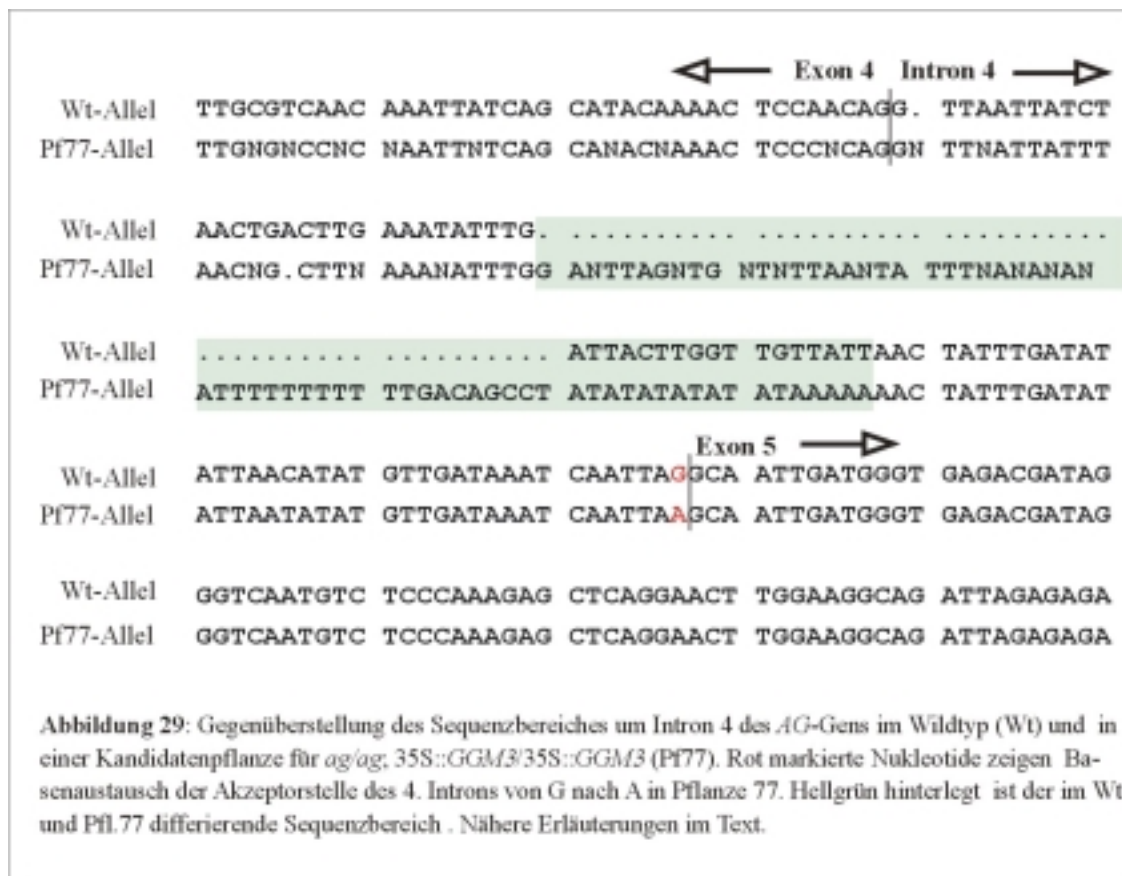
Pflanzennummer	Allgemeiner Wachstumshabitus	Blattphänotyp	Blütenphänotyp
57	schwach -	curly leaves ++	<i>35S::GGM3</i>
77	kräftig +	curly leaves +	<i>ag-ähnlich</i>
61	kräftig +	curly leaves ++	<i>35S::GGM3</i>
63	schwach -	curly leaves ++	<i>35S::GGM3</i>
103	schwach -	curly leaves +	<i>35S::GGM3</i>
70	kräftig +	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
71	kräftig +	curly leaves +	<i>ag-ähnlich</i>
100	kräftig +	curly leaves +	<i>ag-ähnlich</i>
53	schwach -	curly leaves ++	<i>35S::GGM3</i>
36	kräftig +	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
158	schwach -	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
157	schwach -	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
155	schwach -	curly leaves ++	<i>35S::GGM3</i>
140	kräftig +	curly leaves +	<i>ag-ähnlich</i>
138	kräftig +	curly leaves +	<i>ag-ähnlich</i>
151	schwach -	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
129	kräftig +	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
141	schwach -	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
41	kräftig +	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
37	schwach -	curly leaves ++	<i>ag-ähnlich</i>
K57	wt +++	wt	wt

3.3.3 Molekulare Analyse

Mit der EDWARDS-Methode (Edwards *et al.*, 1991) wurde DNA von den oben aufgelisteten und angegebenen Pflanzen isoliert und eine PCR durchgeführt, um ein Fragment aus dem *AG*-Gen zu amplifizieren, das die Mutation umfasst. Die Mutation ist an der Akzeptorspleißstelle des 4. Introns lokalisiert, wo in der *ag-3*-Mutation ein G zu A Basenaustausch stattgefunden hat. Es wurden zwei *primer*-Kombinationen verwendet: AgIn4fw und AgIn4bw (diese *primer* liegen unmittelbar stromaufwärts und stromabwärts des 4. Introns (Anhang, 8.2), und AgIn4fw und AgIn5bw (AgIn5bw liegt unmittelbar stromabwärts des 5. Introns). Zusätzlich wurde mit den *primern* CK1 und CK2 ein spezifischer Nachweis für *GGM3* durchgeführt. Abbildung 28 zeigt die Amplifikate der verschiedenen *primer*-Kombinationen auf die verschiedenen DNA-Präparationen.



Dabei fällt auf, daß mit den *AG*-spezifischen *primer*-Kombinationen zwei verschieden große Fragmente amplifiziert wurden. Neben der Punktmutation unterscheiden sich die Intronbereiche der Ökotypen Landsberg erecta, in der die *ag-3*-Mutante vorliegt und Columbia, in der *35S::GGM3* vorliegt. Der *GGM3*-spezifische Nachweis ist für alle Pflanzen, die den „*curly leaf*“-Phänotypen zeigen, positiv verlaufen (Abb.28). Die Fragmente, die mit der *primer*-Kombination *AgIn4fw* und *AgIn5bw* aus den DNA-Präparationen der Pflanze-77 und Pflanze-K57 amplifiziert worden waren, wurden sequenziert. In Abbildung 29 ist das Sequenzergebnis dargestellt. Sowohl der differierende Intronbereich der zwei Pflanzen 77 und K57, als auch die Punktmutation an der Akzeptorspleißstelle am 4. Intron können bestätigt werden. Das bedeutet, daß die Pflanze 77 genotypisch *35S::GGM3;ag/ag* ist und die Ergebnisse der phänotypischen Analysen als Teilkomplementation von *agamous* durch *35S::GGM3* gewertet werden können.



4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene verschiedener phylogenetisch informativer Taxa aus der *AGAMOUS*-Genfamilie funktionell untersucht. Diese Genfamilie spielt eine Schlüsselrolle bei der Blütenentwicklung und der Entwicklung reproduktiver Organe in Gymnospermen (Theißen *et al.*, 2000; Winter, 1997). Die Blütenentwicklung der Angiospermen ist ihrerseits eines der am besten verstandenen Beispiele pflanzlicher Entwicklungsprozesse (Theißen und Saedler, 1999). Mit der Untersuchung der Funktion von *AGAMOUS*-Genen aus Angiospermen und Gymnospermen soll die Evolution der Blüte besser verstanden werden.

4.1 Phylogenetische Unterteilungen der *AGAMOUS*-Genfamilie

Im ersten Kapitel des Ergebnisteils dieser Arbeit wurden die Genverwandtschaftsverhältnisse innerhalb der *AGAMOUS*-Genfamilie mithilfe phylogenetischer Rekonstruktionen und von Strukturmotiven in der Aminosäuresequenz ermittelt.

4.1.1 D-Funktionsgene sind älter als C-Funktionsgene, und deren gemeinsamer Vorfahre besaß spezifische Merkmale beider Gengruppen

Aus den detaillierten Phylogenierekonstruktionen der *AGAMOUS*-Genfamilie (Abb.5 und Abb.6) geht erwartungsgemäß hervor, daß die *DAL2*-Klade, die die Gymnospermengene beinhaltet, basal zu den Angiospermengenen liegt. Die in den Abbildungen 5 und 6 markierten Kladen korrelieren einerseits mit der Herkunft der Gene aus den jeweils unterschiedlichen Organismen und andererseits wahrscheinlich größtenteils mit der Funktion der Gene: Die Kladen enthalten jeweils ausschließlich Vertreter von Gymnospermen, Monokotylen oder Dikotylen, (das Gen aus der basalen Angiospermen *Magnolia stellata* läßt sich in keine der anderen Kladen einordnen), und zweitens korrelieren die *FBP7*-Klade und die *AG*-Klade (beides Dikotylenkladen) sowie die *ZAG2*-Klade und die *ZMM2*-Klade (beides Monokotylenkladen) mit C-Funktionsgengruppen (*AG*-Klade und *ZMM2*-Klade) und D-Funktionsgengruppen (*FBP7*-Klade und *ZAG2*-Klade). C- und D-Funktionsgengruppen werden bei fehlenden Daten von Funktionsverlustmutanten-Analysen aufgrund des Expressionsmusters der bisher untersuchten Gene postuliert. Die bisher untersuchten Gene der C-Funktionsgengruppen sind in Stamina und Karpellen exprimiert, die bisher untersuchten Gene der D-Funktionsgengruppen in Ovula. *MAG* liegt basal zu den Kladen der C-Funktionsgruppen. Die *FBP7*-Klade und die *ZAG2*-Klade, also die Kladen die

die D-Funktionsgene enthalten, liegen basal vor *MAG*, der *ZMM2*-Klade und der *AG*-Klade. Aus den Topologien der Abbildungen 5 und 6 lässt sich zusammenfassend schließen,

- daß die *DAL2*-ähnlichen Gene die phylogenetisch ältesten Gene sind
- daß die *AGL11*-ähnlichen Gene und die *ZAG2*-ähnlichen Gene phylogenetisch älter sind als *MAG*, die *AG*-ähnlichen und *ZAG1*-ähnlichen Gene
- und somit zu erwarten ist, daß es ein *AGL11*-ähnliches Gen auch in *Magnolia stellata* gibt, weil die Aufspaltung von Monokotylen und Eudikotylen nach der Evolution basaler Angiospermer stattgefunden hat
- daß mit der Evolution der *AGL11*-ähnlichen und *ZAG2*-ähnlichen Gene, also in Angiospermen, eine Genduplikation stattgefunden hat (Genpaare: *FBP7* und *FBP11* aus *Petunia hybrida*, *ZAG2* und *ZMM1* aus *Zea mays*)
- daß *MAG* das nächste verwandte Gen zu der *AG/ZAG1*-Superklade ist, innerhalb derer sich vermutlich weitere Genduplikationen ereignet haben (siehe *AG*, *SHP1*, *SHP2* aus *Arabidopsis thaliana* oder *PLE*, *FAR* aus *Antirrhinum majus*)

Das Wissen über die Genfunktionen, erstens die D-Funktion, die mit den *AGL11*-ähnlichen Genen und den *ZAG2*-ähnlichen Genen in Verbindung gebracht wird, und zweitens die C-Funktion, die mit den *AG*-ähnlichen und *ZMM2*-ähnlichen Genen in Verbindung gebracht wird, deutet darauf hin, daß die Funktion, Ovula zu bilden, älter ist, als die Funktion, Stamina und Karpelle zu bilden. Das passt zu paläontologischen Daten, nach denen der gemeinsame Vorfahre der Angiospermen und Gymnospermen, zwar Samenanlagen, also Ovula, nicht aber Karpelle besaß. Interessant ist weiterhin, daß die D-Funktionsgene ja ihren Wirkungsort ausschließlich auf einen Teil der weiblichen Reproduktionsanlagen spezialisiert sind, während die C-Funktionsgene für männliche und weibliche Identitätsgebung verantwortlich sind. Die Vorläufergene der C- und D-Funktionsgene aus Gymnospermen sind einerseits ebenfalls wie die C-Funktionsgene in männlichen und weiblichen Reproduktionsorganen exprimiert, weisen aber andererseits wie die D-Funktionsgene keine N-terminale Extension vor der MADS-Box auf.

4.1.2 N-terminale Extension ist eine Synapomorphie der *AG/ZAG1*-Superklade

Ausschließlich die Mitglieder der *AG/ZMM2*-Superklade weisen ein besonderes Strukturmerkmal, die N-terminale Extension vor der MADS-Box, auf. Nach Hasebe *et al.* (1998) wird angenommen, daß die N-terminale Extension ein Merkmal für Gene ist, die in die *AGAMOUS*-Genfamilie fallen. Aufgrund dessen wird es sogar für wahrscheinlich gehalten, daß die *CRM6*-Genklade (eine Klade, die ausschließlich Farngene enthält) und die

AGAMOUS-Genklade in einem Schwestergruppenverhältnis (Hasebe *et al.*, 1998; Hasebe und Banks, 1997). Wie bereits erwähnt beinhaltet die *CRM6*-Klade ausschließlich Farn Gene, also Nichtsamenpflanzengene. Daß das Vorhandensein einer N-terminalen Extension vor der MADS-Box allerdings nicht ausreichend für die Einordnung eines Gens in die *AGAMOUS*-Genfamilie ist, und daß es insbesondere unzulässig ist, dieses Merkmal für Gene heranzuziehen, die nicht in die *AG/ZAG1*-Superklade innerhalb der *AGAMOUS*-Genfamilie fallen, erklären folgende Argumente:

- 1.) Es gibt MADS-Box-Gene mit einer N-terminalen Extension vor der MADS-Box, die nicht in die *AGAMOUS*-Genfamilie fallen, deshalb ist die Korrelation des Vorhandenseins einer N-terminalen Extension vor der MADS-Box und die Zugehörigkeit zur *AGAMOUS*-Genfamilie empirisch nicht abgesichert.
- 2.) Die MADS-Box-Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie, ausgenommen der *AG/ZAG1*-Superklade, besitzen keine N-terminale Extension vor der MADS-Box, das heißt die Gene aller anderen Kladen der *AGAMOUS*-Genfamilie, *DAL2*-Klade, *AGL11*-Klade, *MAG* und die *ZAG2*-Klade starten die Translation direkt mit der MADS-Box.
- 3.) Der Zustand ohne N-terminale Extension vor der MADS-Box ist wahrscheinlich ursprünglich, es sei denn es hätte mehrere unabhängige Verluste der N-terminalen Extension in den Genen der *DAL2*-Klade, *FBP7*-Klade, *MAG* und der *ZAG2*-Klade gegeben. Demgegenüber ist der einmal unabhängige Gewinn der N-terminalen Extension in der *AG/ZAG1*-Superklade wahrscheinlicher.
- 4.) Die N-terminale Extension vor der MADS-Box des Farn Gens *CRM6* und die N-terminalen Extensionen von der MADS-Box der Gene der *AG/ZAG1*-Superklade sind also nicht synapomorph, weil sie sind kein abgeleitetes Merkmal einer monophyletischen Gruppe sind.
- 5.) Das Farn Gen *CRM6* besitzt außer dem Strukturmerkmal der N-terminalen Extension in keiner Domäne der NMIKC-Aufteilung Sequenzähnlichkeit, die zur Einordnung in die *AGAMOUS*-Genfamilie führt.

Somit kann die Annahme, *CRM6* sei ein zu *AG* ähnliches Gen, nicht gehalten werden. Es ist sogar fraglich, ob die N-terminale Extension vor der MADS-Box als Synapomorphie der *AG/ZAG1*-Superklade zu werten ist, weil die N-terminalen Bereiche der Gene der *AG/ZAG1*-Superklade sehr unterschiedliche Längen und Sequenzen aufweisen (Abb.7). Dennoch ist es beachtlich, daß ausschließlich alle Mitglieder dieser Klade eine solche N-terminale Extension besitzen. Ob es wahrscheinlicher ist, daß die verschiedenen N-terminalen Extensionen drei oder vier mal unabhängig in der *AG/ZAG1*-Superklade entstanden sind, oder ob es wahrscheinlicher ist, daß die N-terminale Extension einmal in der *AG/ZAG1*-Superklade

entstanden ist und dann verschieden abgeleitet wurde, lässt sich schwer bestimmen, weil es weder ein Maß dafür gibt, wie wahrscheinlich welche Art von Sequenzableitungen sind (Punktmutation/Deletion/Insertion/Domänenaustausche), noch gibt es ein Maß dafür, mit welcher Wahrscheinlichkeit N-terminale Extensionen vor der MADS-Box entstehen. Die hier aufgelisteten Argumente führen zu der Annahme, daß es am wahrscheinlichsten ist, daß die N-terminale Extension eine Synapomorphie der *AG/ZAG1*-Superklade ist.

4.2 Vergleichende heterologe Überexpression phylogenetisch informativer Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*

Im zweiten Teil des Ergebnisteils dieser Arbeit sollte die funktionelle Substituierbarkeit von *AG* durch ausgewählte Gene der *AGAMOUS*-Genfamilie mithilfe der heterologen ektopischen Überexpression in *Arabidopsis thaliana* getestet werden.

4.2.1 Die Stärke der Überexpressionsphänotypen hängt von vielen schwer kontrollierbaren Faktoren ab

Bevor die Ergebnisse der Überexpressionsexperimente in den Kontext der anderen Ergebnisse gebracht wird und bevor die möglichen Schlußfolgerungen dargestellt werden, sollen die Aspekte diskutiert werden, die zu falschen Schlußfolgerungen der Ergebnisse führen können. In dieser Arbeit wurden die möglichen Auswirkungen durch Positionseffekte, durch Unterschiede in der Kopienzahl des Transgens, durch *Silencing* oder Cosuppression durch die Analyse mehrerer unabhängiger Transformanten überprüft. Auch ein konstitutiv exprimierender Promotor, wie der 35S-Promotor kann indirekt unspezifische Effekte auf z.B. die Auswirkung der Transgene auf die Blütenorgane haben, indem das gesamte Wachstum der Pflanze verändert wird. Alle aufgezählten Effekte können die Expression des zu überexprimierenden Transgens erheblich verändern. Von qualitativen und spezifischen homöotischen Veränderungen kann im Fall der homöotischen Veränderungen in den Blütenorganen aber ausgegangen werden, weil genügend unabhängige Linien ein großes Spektrum der gleichen Art von Blütenphänotypen zeigten. Wie stark sich aber eine homöotische Veränderung in den einzelnen transgenen Pflanzen auswirkt, hängt vorwiegend von den oben aufgezählten Faktoren ab. Zu beachten ist aber jeweils die Obergrenze der funktionellen Substituierbarkeit von *AG* durch die einzelnen überexprimierten Gene. So gibt es z.B. viele 35S::*PLE* Linien, die nur schwache homöotische Veränderungen in der Blüte zeigen aber auch viele 35S::*PLE* Linien, die sehr starke homöotische Veränderungen in der Blüte zeigen während 35S::*GGM3* immer nur schwache Effekte in der Blüte bewirkt und z.B. 35S::*ZAG2* nie, weder starke noch schwache, Veränderungen in der Blüte bewirkt.

4.2.2 Eine „*curly-leaf*“-Phänokopie verursachen auch einige Nicht-AG-ähnliche MADS-Box-Gene, wenn sie in *Arabidopsis thaliana* ektopisch überexprimiert werden

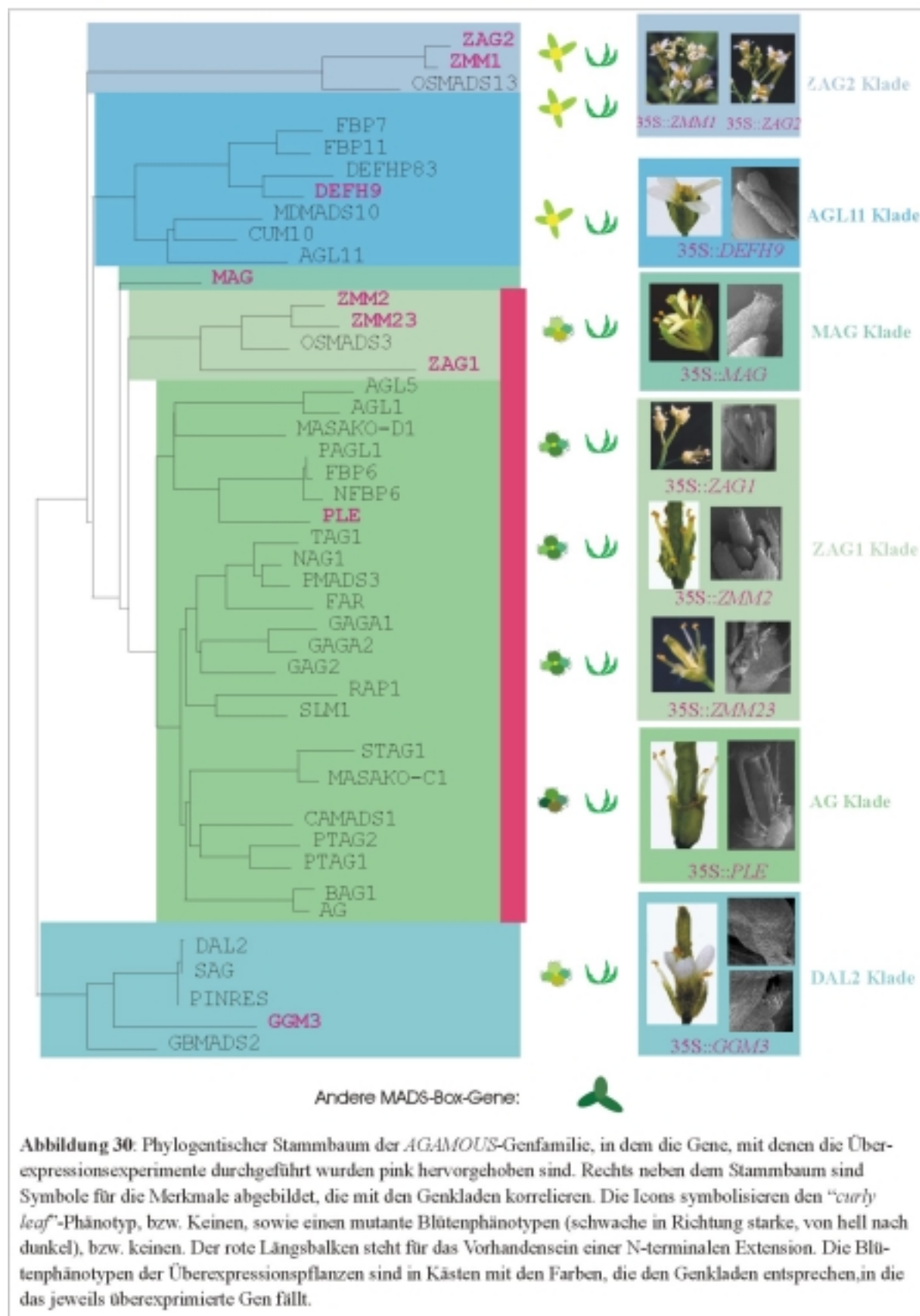
Abgesehen von den homöotischen Veränderungen in der Blüte hat die Überexpression der AG-ähnlichen Gene zur Phänokopie des „*curly leaf*“-Phänotypes geführt. *CURLY LEAF* (*CLF*) ist ein Gen der Polycomb-Gengruppe und die *curly leaf*-Mutante zeichnet sich durch eingerollte Blätter und eine frühe, oft terminale Blüte aus. Es wurde ein Zusammenhang mit einer in diesen Mutanten veränderten AG-Expression festgestellt. In *curly leaf*-Pflanzen wird AG konstitutiv, also so auch in Blättern, exprimiert. Deshalb wird angenommen, daß *CLF* im Wildtyp indirekt die AG-Expression im Blatt von *Arabidopsis thaliana* inhibiert (Goodrich *et al.*, 1997). So könnte die Phänokopie von *clf* durch die ektopische Überexpression AG-ähnlicher Gene im Wildtyphintergrund von *Arabidopsis thaliana* zweierlei erklärt werden. Entweder verursacht die ektopische Überexpression der AG-ähnlichen Gene auch die Hochregulierung des endogenen AG, oder die AG-ähnlichen Gene interagieren mit den gleichen Genen im Blatt wie AG und verursachen selbst den *clf*-Phänotyp. Die Expressionsanalysen von 35S::*GGM3* (Abb.22) geben jedoch einen Hinweis darauf, daß AG im Blatt von 35S::*GGM3* nicht hochreguliert wird, dafür ist aber die *GGM3*-Expression in den Blättern von 35S::*GGM3* nachweisbar. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß *GGM3* die Phänokopie von *clf* direkt verursacht. Für die Interpretation dieser Ergebnisse muß aber in Betracht gezogen werden, daß auch einige andere MADS-Box-Gene *clf* phänokopieren, wenn sie ektopisch überexprimiert werden. Es scheint sich deshalb nicht unbedingt um einen spezifischen Phänotyp AG-ähnlicher Gene zu handeln. Vielmehr scheint ein anderes Merkmal, das sowohl die AG-ähnlichen Gene als auch einige andere MADS-Box-Gene auszeichnet, die Ursache für die *clf*-Phänokopie zu sein. Eine naheliegende Erklärung wäre, daß die *clf*-Phänokopie nur dann entsteht, wenn das überexprimierte Gen ein Homodimer bilden kann. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß AP3 und Pi, (die einzeln nicht homodimerisieren können sondern nur ein AP3/Pi-Heterodimer bilden können), keinen *clf*-Phänotyp verursachen, wenn sie einzeln im Blatt überexprimiert werden (Krizek und Meyerowitz, 1996). Von vielen AG-ähnlichen wird angenommen, daß sie zumindest *in vitro* Homodimere bilden können (Weiser, 1999).

4.2.3 Unterschiede der Überexpressionsphänotypen korrelieren mit Unterschieden in der Genverwandtschaft

Die Phänotypen aus den Überexpressionsstudien im Wildtyp-Hintergrund von *Arabidopsis thaliana* können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Erstens transgene Pflanzen mit verändertem Blattphänotyp und ohne veränderten Blütenphänotyp, dazu gehören 35S::*DEFH9*, 35S::*ZAG2* und 35S::*ZMM1*, und zweitens transgene Pflanzen mit verändertem Blattphänotyp und mit verändertem Blütenphänotyp, dazu gehören 35S::*PLE*, 35S::*ZAG1*, 35S::*ZMM1*, 35S::*ZMM23*, 35S::*MAG* und 35S::*GGM3*. Diese Unterteilung korreliert mit den D-Funktion assoziierten Kladen (*FBP7*-Klade und *ZAG2*-Klade) einerseits und den C-Funktion assoziierten und dem wahrscheinlich gemeinsamen Vorläufer der C- und D-Funktions-assoziierten Kladen (*DAL2*-Klade, *ZMM2*-Klade, *AG*-Klade und *MAG*) andererseits. Dabei zeigen die Vertreter der D-Funktion assoziierten Kladen, also die erste Gruppe, bei Überexpression keinen zum Wildtyp veränderten Blütenphänotyp, die zweite Gruppe zeigt einen zum Wildtyp veränderten Blütenphänotyp. Bei den ausgewählten Genen, die durch ihr Ergebnis der ektopischen Überexpression in die zweite Gruppe fallen, ist folgende Korrelation zu beobachten. Je näher das entsprechende *AG*-ähnliche Gen mit *AG* verwandt ist, desto stärker sind die homöotischen Veränderungen in den äußeren zwei Blütenkreisen, Sepalen und Petalen, in Richtung Karpelle und Stamina. Das bedeutet auch, je näher das entsprechende *AG*-ähnliche Gen mit *AG* verwandt ist, desto stärker ähneln diese Blüten den *ap2*-mutanten Blüten, in der sich durch den Ausfall des A-Funktionsgens *AP2* das endogene C-Funktionsgen *AG* auf alle vier Blütenkreise ausweitet und es zu der Anordnung Karpelle, Stamina, Stamina, Karpelle in den vier Blütenkreisen kommt. Die Ergebnisse zeigen also einerseits eine graduelle Substituierbarkeit entsprechend des Grads der Genverwandtschaft, andererseits aber auch einen Entweder/Oder-Unterschied bei der Einteilung der oben genannten zwei Hauptgruppen (Blütenphänotyp/Kein Blütenphänotyp) (Abb.30). Das ist insbesondere beachtlich, weil die Konservierung der gesamten *AGAMOUS*-Genfamilie, alle Kladen eingeschlossen, verglichen mit anderen MADS-Box-Gen-Unterfamilien noch sehr hoch ist. Dies verdeutlicht eine wichtige Tatsache, nämlich, daß einerseits wenige Veränderungen in der Aminosäuresequenz bei Beibehalt des Gesamtstrukturgerüsts einerseits auch oft in ihrer Wirkungsweise nur kleine Veränderungen bewirken (graduelle Veränderungen der funktionellen Substituierbarkeit), andererseits aber in einigen Fällen ein Austausch einer einzigen Aminosäure zu einer großen funktionellen Veränderung führen kann. Das unterstreicht, daß man im Einzelfall niemals, von der Aminosäuresequenz auf die Genfunktion schließen kann, dennoch aber die phylogenetischen

Genkladen eine große Bedeutung haben (Abb.30). In Abbildung 30 sind die Blattphänotypen und Blütenphänotypen aus den Überexpressionsexperimenten sowie das Vorhandensein des Strukturmerkmals, die N-terminale Extension, übersichtlich neben den phylogenetischen Stammbaum entsprechend projiziert.

Die wichtige Frage, ob die homöotischen Veränderungen der heterologen ektopischen Überexpressionen im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* nicht auch durch eine veränderte Regulierung und Wirkung des endogenen *AG* bewirkt worden sein könnten, muss im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Komplementation $35S::GGM3;ag/ag$ mit „zum Teil“ beantwortet werden. Die homöotischen Veränderungen in der Wildtypblüte und der *agamous*-Blüte bei der ektopischen Überexpression mit $35S::GGM3$ überschneiden sich zwar in Bezug auf die ektopische Ovulainitiierung und Ovulabildung an Sepalen, sind aber bei weitem nicht deckungsgleich: Es konnten zum Beispiel keine staminoiden Petalen, nur viel weniger stigmatisches (karpellspezifisches) Gewebe dafür aber erheblich mehr Ovula an den Blüten $35S::GGM3;ag/ag$ beobachtet werden als in $35S::GGM3;AG/AG$. Das bedeutet, daß es sich erst durch diesen direkten Vergleich auseinanderdividieren lässt, wie die endogene *AG*-Funktion durch die Anwesenheit der heterologen Gene anders reguliert wird. Durch diesen Vergleich wird klar, daß das endogene *AG* an den Überexpressionsphänotypen beteiligt ist, und daß die Überexpressionsexperimente im Wildtyphintergrund Aufschluß darüber geben, welche heterologen Gene in der Lage sind, *AG* direkt oder indirekt anders zu regulieren.



4.2.4 *ZMM2* und *ZAG1* weichen bei ektoischer Überexpression in *Arabidopsis thaliana* vom Wirkungsschema der anderen C-Funktionsgene ab

Wie in 4.2.3 erklärt wurde, fallen *ZMM2* und *ZAG1* in die Gruppe der C-Funktions-assoziierten Gene. Aus den Ergebnissen der heterologen Überexpressionen in *Arabidopsis thaliana* (siehe Abb.15 und Abb.17), lässt sich aber ein wichtiger Unterschied bezüglich ihres Funktionspotentials feststellen: Die Überexpression von *ZMM2* kann die Sepalen nicht in Richtung Karpell homöotisch verändern (Abb.17), die Überexpression von *ZAG1* kann Sepalen viel stärker in Karpelle homöotisch verändern als Petale in Richtung von Stamina (Abb.15). Dieses Ergebnis kann im Zusammenhang mit den Expressionsdaten dieser Gene in *Zea mays* als spezifisch aussagekräftig gewertet werden. Mena *et al.* (1996) haben herausgefunden, daß *ZAG1* und *ZMM2* wahrscheinlich nur jeweils einen Teil der C-Funktion ausüben: Die *zag1*-Funktionsverlustmutante bildet wildtypische Pollen-bildende Stamina und auch karpelloide Merkmale in den innersten Blütenwirteln, die Determinierung der Blüte ist jedoch aufgehoben. Das bedeutet, daß zumindest für die Ausbildung der Stamina eine vollständige Redundanz für *ZAG1* vorliegen muß, *ZAG1* aber für die Ausbildung funktionstüchtiger Karpelle von entscheidender Bedeutung ist. Das korrespondiert mit dem Überexpressionsbild von *ZAG1* in der Arabidopsisblüte. Dort ist der Karpelle bildende Effekt stärker als der Stamina bildende. Mena *et al.* (1996) haben auch die Expression von *ZAG1* und *ZMM2* im Vergleich untersucht und stellen fest, daß *ZMM2*-Transkripte zwar in Karpellen und Stamina, aber weitaus stärker in Stamina vertreten sind, *ZAG1* dagegen in Karpellen und Stamina vergleichbar stark. Das Expressionsbild für *ZMM2* in *Zea mays* korrespondiert wieder mit dem Überexpressionsbild von *ZMM2* in der Arabidopsisblüte. Dort wirkt *ZMM2* zwar Stamina bildend (die Petalen werden stark in Richtung Stamina verändert), aber nicht Karpell bildend (die Sepalen bleiben homöotisch unverändert). Da die Maisblüte viel komplexer als die Arabidopsisblüte ist, und es wahrscheinlich aufgrund einer relativ jungen Verdopplung von Teilen des Maisgenoms (Theißen *et al.*, 1995) doppelt so viele AG-ähnliche Gene in Mais gibt als in *Arabidopsis* ist eine höhere Redundanz und teilweise Funktionsaufteilung der AG-ähnlichen Gene in Mais nicht unwahrscheinlich.

4.3 35S::*GGM3* kann *agamous* teilweise komplementieren

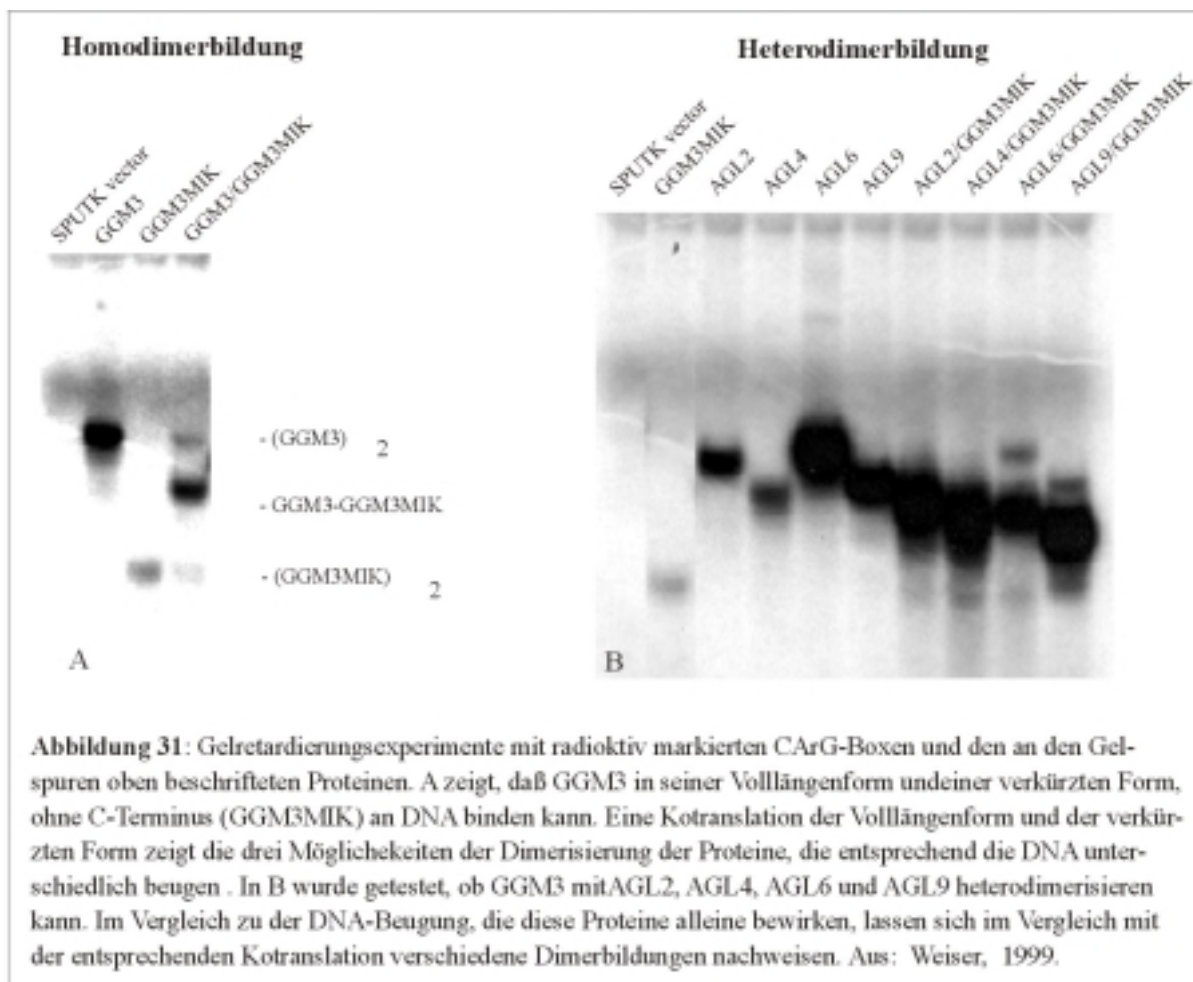
Im dritten Teil des Ergebnisteils dieser Arbeit sollte an einem Beispiel versucht werden, die Funktionsverlustmutante *agamous* heterolog zu komplementieren, um die Bedeutung des Einflusses des endogenen *AG* in den heterologen Überexpressionsstudien im Wildtyphintergrund einordnen zu können. Die Komplementation von *agamous* durch

35S::*GGM3* hat zu folgenden Ergebnissen geführt: Einerseits wurden weder Stamina und Karpelle restauriert, noch wurde die Indeterminiertheit aufgehoben. Andererseits hat 35S::*GGM3* in hohem Ausmaß Ovulabildung an Sepalen der inneren Wirtel zu Folge gehabt und die Indeterminiertheit vor allem aber die Meristemidentität verändert. Anstelle immer neuer Blütenkreise und innen eines Blütenmeristems bildet sich häufig eine neues Infloreszenzmeristem sowie eine neue Infloreszenz aus. Diese Ergebnisse sollen unter zwei Gesichtspunkten diskutiert werden. Erstens sollen die bereits erforschten biochemischen Interaktionsmöglichkeiten von *GGM3* mit einigen Arabidopsisproteinen erläutert werden, zweitens sollen diese phänotypischen Ergebnisse in einen Gesamtkontext gestellt werden. Ähnliche Arabidopsisphänotypen wie dieser Komplementationsphänotyp sowie Erklärungen aus dem evolutionsbiologischen Hintergrund sollen diskutiert werden.

4.3.1 *GGM3* kann *in vitro* als Homodimer und als Heteromer mit MADS-Domänen-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* an CArG-Boxen binden

Eine wichtige Frage ist, wie 35S::*GGM3* in *agamous* die beschriebenen Veränderungen bewirkt. Wirkt es als unspezifischer Faktor oder kann es teilweise spezifisch *AG* substituieren? Wenn *GGM3* *AG* zum Teil substituieren kann, bleibt die Frage, welche Teile der *AG*-Funktion *GGM3* ersetzen kann, und welche nicht. Dieser Frage wurde bereits nachgegangen, indem getestet wurde, ob *GGM3* an *Arabidopsis*-CArG-Boxen binden kann und ob *GGM3* mit spezifischen Interaktionspartnern von *AG* Heterodimere bilden kann (Weiser, 1999). Mit DNA-Retardierungsexperimenten wurde nachgewiesen, daß *GGM3* zumindest *in vitro* Homodimere bilden kann (Abb.30a). Da nach heutigem Kenntnisstand davon ausgegangen wird, daß Transkriptionsfaktoren wie z.B. die MADS-Domänen-Proteine nur als Dimere (Homodimere oder Heterodimere) DNA binden können, erhöht dieses Ergebnis die Wahrscheinlichkeit, daß *GGM3* im heterologen System auch wirken könnte, wenn es keine Möglichkeiten der Heterodimerisierung mit endogenen Proteinen hätte. Eine weitere Untersuchung für die Wirkungsweise von *GGM3* in *agamous* wurde mit dem folgenden Gelretardierungsexperiment geführt (Weiser, 1999, Abb.31). Fan *et al.* haben im Hefe-Zweihybridsystem nachgewiesen, daß *AG* mit *AGL2*, *AGL4*, *AGL6* und *AGL9* Heterodimere *in vivo* bildet (Fan *et al.*, 1997). Nun wurde *GGM3* jeweils mit einem der *AG*-Interaktionspartnern *AGL2*, *AGL4*, *AGL6* und *AGL9* kotranslatiert, und auf Heterodimerbildung getestet. Dabei bilden sich *in vitro* Heterodimere, die DNA binden können, das bedeutet, daß *GGM3* mit spezifischen Interaktionspartnern von *AG* reagieren kann, also die entsprechenden Interaktionsdomänen hoch konserviert sind (Abb.30b). Dieses

ungewöhnlich hohe Ausmaß an Konservierung war bereits in den *alignments* der Aminosäuresequenz der AG-ähnlichen Gene zu erkennen (siehe *alignment* zu Abb. 6). Gerade die in anderen MADS-Box-Proteinen nicht oder nur sehr schwach konservierten C-Termini und K-Regionen, sind in der gesamten *AGAMOUS*-Genfamilie einzigartig hoch konserviert. Gerade die C-Termini und die K-Boxen spielen auch bei der Dimerisierung und der Protein-Protein-Interaktion eine herausragende Rolle (Fan *et al.*, 1997).



Wie vor kurzer Zeit herausgefunden wurde haben *AGL2*, *AGL4* und *AGL9* eine bisher übersehene sehr wichtige Schlüsselrolle in der Blütenentwicklung. In Pelaz *et al.* wird die Funktion dieser Gene beschrieben. Diese Gene, *SEPALLATA1 (SEP1)*, *SEP2* und *SEP3*, vorher als *AGL2*, *AGL4* und *AGL9* bekannt, sind zu den C- und B-Funktionsgenen *AG*, *AP3* und *PI* in hohem Ausmaß redundant. Die Tripelmutante *sep1/sep2/sep3* besteht aus einer Blüte, die nur noch aus Kelchblättern besteht, ebenso wie die *ag/ap3* oder *ag/pi* Doppelmutanten. Die Sepallata-Gene scheinen mit den C- und B-Funktionsgenen zu interagieren. Wahrscheinlich wirken die Sepallata-Gene parallel mit den B- und C-Funktionsgenen und bilden zusammen ternäre Komplexe (Theissen und Saedler, 2001). Ob es für die Sepallata-Gene orthologe Gene aus Gymnospermen gibt, ist noch unklar. Deshalb kann die eventuell entsprechende homologe Interaktion in Gymnospermen auch nicht überprüft werden. Sollte es keine Sepallata-ähnlichen Gene in Gymnospermen geben, wäre es aber umso bemerkenswerter, daß die heterologe Interaktion zwischen *GGM3* und den Sepallata-Genen und *AGL6* so gut funktioniert. Sollte es doch Sepallata-ähnliche Gene in Gymnospermen geben, wäre diese Interaktion, die bei der Identitätsgebung der reproduktiven Organe in Samenpflanzen eine Schlüsselrolle zu spielen scheint, über 300 Millionen Jahre konserviert geblieben. Wahrscheinlich ist das bereits vielfach aus Gymnospermen isolierte *AGL6*-orthologe Gen ein Vorläufergen der Sepallatagene und der *Squamosa (SQUA)*-ähnlichen Gene (*SQUA*-ähnliche bzw. *AGL2*-ähnliche Gene konnten bisher nicht aus Gymnospermen isoliert werden). *AGL6*-ähnliche Gene, *AGL2*-ähnliche Gene (wie die Sepallatagene) und *SQUA*-ähnliche Gene bilden aber zusammen eine sehr gut unterstützte Superklade (Münster *et al.*, 1997), sind demnach also relativ nah verwandt.

4.3.2 Der Komplementationsphänotyp 35S::*GGM3*; *ag/ag* ähnelt schwachen *ag*-Allelen

Was die Umkehrung eines Blütenmeristems zurück in ein Infloreszenzmeristem betrifft, sind bereits einige Beispiele aus *Arabidopsis thaliana* untersucht worden. *AG* ein entscheidender Faktor, der die Identitätsgebung des Blütenmeristems bestimmt. Konstitutive *AG*-Funktion kann unabhängig von *AP2* und *LFY* den determinierten Zustand des Blütenmeristems in der Mitte der reproduktiven Organe der Arabidopsisblüte bewirken, während die Funktionsverlustmutante *agamous* beim Wechsel der Lichtperiode vom Langtag in den Kurztag vom Blütenmeristem in ein Infloreszenzmeristem wechseln kann. Einen ähnlichen Phänotyp zeigen *ag-4* und *AG-Met205*, zwei *ag*-Allele, die im C-Terminus bzw. in der K-Domäne verändert sind und noch geringe *AG*-Aktivität besitzen (Sieburth *et al.*, 1995). Umgekehrt zeigen 35S::*AG*-Pflanzen eine frühe und häufig eine terminale Blüte. Ähnliche

Phänotypen zeigten auch Doppelmutanten für *lfy* und *ap2*, die das 35S::AG-Transgen tragen. Diese Ergebnisse geben den Hinweis, daß *AG* eine Schaltstelle in der Entwicklung von indeterminierter Meristemaktivität zu determinierter Entwicklung steuert (Mizukami und Ma, 1997). Im Fall von *ag/ag; lfy/LFY* kann es beim Wechsel der Licht/Dunkelperiode von Langtag, was Blütenmeristembildung induziert, zu Kurztag zur Umkehrung von Blütenmeristem in Infloreszenzmeristem kommen (Okamuro *et al.*, 1996). *LFY* wird bei der Aufrechterhaltung des Blütenmeristems als ein entscheidender Interaktionspartner von *AG* angesehen (Okamuro *et al.*, 1996). Okamuro *et al.* (1996) beschreiben *AG* bei der Rolle der Blütenmeristemidentitätserhaltung als haploinsuffizient, das bedeutet, daß *AG* in einer Kopie nicht ausreicht, um bei schlechten Bedingungen für die Induktion der Blütenmeristembildung (z.B. Kurztag) das Blütenmeristem aufrecht zu erhalten, und es so zu einer Umschaltung zurück zu einem Infloreszenzmeristem kommt. Aus den Analysen dieser Mutanten, kann der Schluß gezogen werden, daß 35S::*GGM3;ag/ag* einer Mutante mit schwacher *AG*-Aktivität ähnelt und somit Teilfunktionen komplementiert.

5. Zusammenfassung

AGAMOUS(*AG*)-ähnliche MADS-Box-Gene sind die Träger der floralen C-Funktion und D-Funktion. C-Funktionsgene spezifizieren, zusammen mit B-Funktionsgenen die Identität von Stamina, während C-Funktionsgene alleine die Identität von Karpellen spezifizieren. D-Funktionsgene spezifizieren die Identität von Ovula. Aufgrund detaillierter Phylogenierekonstruktionen aller bisher bekannten *AG*-ähnlichen Gene, wird angenommen, daß die ancestrale C-Funktion und D-Funktion von nur einem *AG*-ähnlichen Gentyp ausgeführt wird. In dieser Arbeit wurde mit heterologen ektopischen Überexpressionsstudien in *Arabidopsis thaliana* die funktionelle Äquivalenz *AG*-ähnlicher Gene aus Samenpflanzen systematisch untersucht. Als Vertreter phylogenetisch informativer Taxa wurden die *AG*-ähnliche Gene *GGM3* aus *Gnetum gnemon*, *MAG* aus *Magnolia stellata*, *ZAG1*, *ZMM2*, *ZMM23*, *ZAG2* und *ZMM1* aus *Zea mays* sowie *PLE* und *DEFH9* aus *Antirrhinum majus* ausgewählt. Die Überexpressionsphänotypen, die diese Gene verursachen, wurden mit den Blüten verglichen, die *AG*, das endogene C-Funktionsgen aus *A. thaliana*, ektopisch überexprimieren. In diesem Fall werden Sepalen in Karpelle und Petalen in Stamina transformiert. Die phänotypischen und molekularen Analysen zeigen, daß die Auswirkung, die die heterologen *AG*-ähnlichen Gene auf die Arabidopsisblüte haben, ihre jeweilige Position im phylogenetischen Stammbaum widerspiegelt. Gemäß der Dichotomy der D-Funktionsgene und der C-Funktionsgene im Stammbaum verursachen die putativen D-Funktionsgene aus *A. majus* und *Z. mays* im Gegensatz zu den putativen C-Funktionsgenen aus *A. majus*, *Z. mays*, *M.* und *G. gnemon* keinen sichtbaren Effekt auf die Blütenentwicklung. Unter den putativen C-Funktionsgenen folgende Korrelation beobachtet werden: Je näher das untersuchte Gen mit *AG* verwandt ist, desto stärker ist der Grad der homöotischen Veränderung der äußeren beiden Wirtel von Sepalen und Petalen zu Karpellen bzw. Stamina. Diese Abstufungen reichen von nur unter dem Elektronenmikroskop sichtbaren Zellveränderungen an den Sepalenrändern zu stigmatischen Zellen und leichten Transformationen der runden Petalenzellen in länglich staminoide Zellen (*GGM3*, *G. gnemon* und *MAG*, *M. stellata*) über deutliche Ovulainitiation und Ovulabildung an den Sepalenrändern (*ZAG1*, *ZMM23*, *Z. mays*) sowie auffällig staminoiden Petalen (*ZMM2*, *ZMM23*, *Z. mays*) zu fast vollständig transformierten Sepalen in Karpelle und Petalen in Stamina (*PLE*, *A. majus*). Mit der ektopischen Überexpression des zu *AG* entferntesten verwandten *AG*-ähnlichen Gens, *GGM3*, wurde versucht, die C-Funktionsverlustmutante *agamous* von *A. thaliana* zu komplementieren. 35S::*GGM3* kann *agamous* partiell komplementieren. Es werden zwar weder Stamina noch Karpelle restauriert, es bilden sich aber Ovula auf den Sepalen. Die Blütenmeristemidentität wird nach einigen Blütenwirteln in eine Infloreszenzmeristemidentität umgewandelt. Dieser Phänotyp ähnelt schwachen *ag*-Allelen. Somit kann *GGM3* eine Teilfunktion von *AG* substituieren.

6. English abstract

AGAMOUS (*AG*)-related MADS box genes execute the floral homeotic C and D function in flowering plants. C function genes specify, together with B function genes, stamen identity during flower development; expression of C function genes alone leads to carpel identity; and D function genes specify ovule identity. Based on phylogeny reconstructions of all so far known *AG*-related MADS box genes we assume that the ancestral homeotic C and D functions were carried out by only one type of *AG* related gene. We examine in a systematic approach the functional conservation of the *AG*-related MADS box genes in seed plants. As genes from phylogenetically informative taxa we use putative *AG* orthologs from the gymnosperm *Gnetum gnemon*, the basal angiosperm *Magnolia stellata*, the monocot *Zea mays*, and the two higher eudicots *Antirrhinum majus* and *Arabidopsis thaliana*. These genes were used to perform overexpression studies with the CaMV-35S promoter in *A. thaliana*, in order to compare the phenotypes of these flowers with the 35S::*AG* flowers, which sepals are transformed into carpels, and which petals are transformed into stamens. Detailed phenotypic and molecular analyses show that the impact of overexpression of the selected genes on the *Arabidopsis* flower reflects the position of the genes in a phylogenetic tree. Firstly, as there is a dichotomy between C and D function genes, expression of the putative D genes of *Z. mays*, *A. majus*, and *A. thaliana* do not cause any visible effect on flower development. Secondly, the following correlation can be observed: the closer a gene is related to *AG*, the stronger is its effect on organ identity in the outer two whorls. The gradation reaches from slight stigmatic tissue on the sepal margins and cellular changes of petals towards filamentous structures, visible only by scanning electronic microscopy (35S::*GGM3*, *G. gnemon*), via ovule initiation on sepal margins (35S::*ZAG1*, *Z. mays*), and clearer staminoid petals (35S::*ZMM2*, *Z. mays*), to almost complete transformation of sepals into carpels, containing ovules, and transformation from petals into stamens (35S::*PLE*, *A. majus*). In further studies we focused on the gymnosperm *AG*-related gene *GGM3* of *G. gnemon*, the gene that is evolutionary most distant from *AG*. We want to find out to what extent *GGM3* is really able to substitute the C and D function in *A. thaliana*., rather than just to interfere with the endogenous *AG*. We have attempted to complement the *agamous* loss-of-function mutant of *A. thaliana* with 35S::*GGM3*. Phenotypic observations lead to the assumption, that a partial complementation is possible, especially with respect to ovule restoration of the *agamous* mutant flower and the floral meristem reversion, which resembles weak *ag*-alleles. Our results show where important sequence changes have occurred that might have led to changes at the level of floral homeotic function.

7. Literaturverzeichnis

Albert, V.A., Gustafsson, M.H.G. und Di Laurenzio, L. (1998). Ontogenetic systematics, molecular developmental genetics and the angiosperm petal, in Soltis und Doyle (Hrsg.), *Molecular Systematics of Plants II*, Chapman and Hall, New York.

Angenent, G.C. und Colombo, L. (1996). Molecular control of ovule development. *Trends in plant science* **1**, 228-232.

Angenent, G.C., Franken, F., Busscher, M., van Dijken, A., van Went, J., Dons, H.J.M., van Tunen, A.J. (1995). A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in *Petunia*. *Plant Cell* **7**, 1569-1582.

Barnabas, S., Krishan, S. und Barnabas, J. (1995). The branching pattern of major groups of land plants inferred from parsimony analysis of ribosomal RNA sequences. *Biosci.* **20**, 259-272.

Baum, D.A. (1998). The evolution of plant development. *Curr.Opin. Plant Biol.* **1**, 79-86

Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad. Sci. Paris/Life Sciences* **316**, 1194-1199.

Beck, C.B. und Wight, D.C. (1988). Progymnosperms, in Beck (Hrsg), Origin and evolution of gymnosperms, Columbia University Press, New York.

Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. und Theißen G. (2000). MADS-Box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1425-1434.

Bowman, J.L., Smyth, D.R. und Meyerowitz, E.M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.

Bowman, J.L., Drews, G.N. und Meyerowitz, E.M. (1991). Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell* **3**, 749-758.

Bowman, J.L., Smyth, D.R. und Meyerowitz, E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.

Brunner, A.M., Rottmann, W.H., Sheppard, L.A., Krutovskii, K., DiFazio, S.P., Leonardi, S. und Strauss, S.H. (2000). Structure and expression of duplicate *AGAMOUS* orthologues in poplar. *Plant Mol. Biol.* **44**, 619-634.

Busch, M.A., Bomblies, K. und Weigel D. (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 585-587.

Byzova, M.V., Franken, J., Aarts, M.G.M., Almeida-Engler, de J., Engler, G., Mariani, C., Van Lookeren Campagne und Angenent, G.C. (1999). *Arabidopsis* STERILE APETALA a multifunctional gene regulating inflorescence, flower, and ovule development. *Genes & Development* **13**, 1002-1014.

Chaw, S.-M., Zharkikh, A., Sung, H.-M., Lau, T.-C. und Li, W.-H. (1997). Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 56-78.

Chaw, S.-M., Parkinson, C.L., Cheng, Y., Vincent, T.M. und Palmer, J.D. (2000). Seed plant phylogeny inferred from all plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of gnetales from conifers. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **97**, 4086-4091.

Chen, X. und Meyerowitz, E.M. (1999). *HUA1* and *HUA2* are two members of the floral homeotic *AGAMOUS* pathway. *Mol. Cell* **3**, 349-360.

Chuang, S.-E., Chen, A.-L. und Chao, C.-C. (1995). Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1641.

Coen, E.S. und Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.

Colombo, L., Franken, F., Koetje, E., van Went, J., Dons, H.J.M., Angenent, G.C. und van Tunen, A.J. (1995). The *Petunia* MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell* **7**, 1859-1868.

Colombo, L., Franken, F., Van der Krol, A.R., Wittich, P.E., Dons, H.J.M. und Angenent, G.C. (1997). Downregulation of ovule-specific MADS box genes from *Petunia* results in maternally controlled defects in seed development. *Plant Cell* **9**, 703-715.

Conner, J. und Liu, Z. (2000). *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *PNAS* **97**, 12902-12907.

Coupland, G., Dash, S., Goodrich, J., Lee, K., Long, D., Martin, M., Puangsomlee, P., Puterill, J., Robson, F., Sundberg, E. und Wilson, K. (1993). Molecular and Genetic analysis of the control of flowering time in response to daylength in *Arabidopsis thaliana*. *FNL* **16**, 27-32.

Crane, P.R., Friis, E.M. und Pedersen, K. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**, 27-33.

Crepet, W.L. (1998). The abominable mystery. *Science* **282**, 1653-1654.

Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. und Sommer, H. (1999). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO* **15**, 4330-4343.

Davies, B., Motte, P., Keck, E. Saedler, H., Sommer, H. und Schwarz-Sommer, Zs. (1999). *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO* **18**, 4023-4034.

Doyle, J.A. (1994). Origin of the angiosperm flower: a phylogenetic perspective. *Pl. Syst. Evol.* **8**, 7-29.

Edwards, K., Johnstone, C. und Thomson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1641.

Egea-Cortines, M., Saedler H. und Sommer, H. (1999). Ternary complex formation between the MADS box proteins SQAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO* **18**, 5370-5379.

Endress, P.K. (1994). Floral structure and evolution of primitive angiosperms: recent advances. *Pl.Syst.Evol.* **192**, 79-97.

Endress, P.K. (1997). Evolutionary biology of flowers: prospects for the next century, in Iwatsuki und Raven (Hrsg.). *Evolution and diversification of land plants*. Springer Verlag, Tokyo.

Fan, H.-Y., Hu, Y., Tudor, M. und Ma, H. (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, member of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant Journal* **12**, 999-1010.

Filipecki, M.K., Sommer, H. und Malepszy, S. (1997). The MADS box gene CUS1 is expressed during cucumber somatic embryogenesis. *Plant Science* **125**, 63-74.

Friis, E.M. und Endress P.K. (1996). Flower evolution. *Progress in Bot.* **57**, 253-280.

Friis, E.M., Crane, P.R. und Pedersen, K.R. (1997). Fossil history of magnolid angiosperms, in Iwatsuki und Raven (Hrsg.). *Evolution and diversification of land plants*. Springer Verlag, Tokyo.

Frohlich, M.W. und Meyerowitz, E.M. (1997). The search for flower homeotic gene homologs in basal angiosperms and Gnetales: a potential new source of data on the evolutionary origin of flowers. *Int. J. Plant Sci.* **158**, 131-142.

Frohlich, M.W. und Parker, D.S. (2000). The mostly male theory of flower origins: from genes to fossils. *Syt. Bot.* **25**, 155-170.

Gasser, C.S., Broadhvest, J. und Hauser, B.A. (1998). Genetic analysis of ovule development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 1-24

Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Meyerowitz, E.M. und Coupland, G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**, 44-51

Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A. und Martin, W. (1996). Non coding sequences from the slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to *rbcL* data do not support gnetalean affinities of angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 383-396.

Hasebe, M. (1999). Evolution of reproductive organs in land plants. *J. Plat Res.* **112**, 463-474.

Haughn, G.W., Schultz, E.A. und Martinez-Zapater, J.M. (1995). The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Meristems, Morphogenesis, and mutants. *Can. J. Bot.* **73**, 959-981.

Ishida, B.K., Jenkins, S.M. und Say, B (1998). Induction of *AGAMOUS* gene expression plays a key role in ripening of tomato sepals in vitro. *Plant Mol. Biol.* **36**, 733-739.

-
- Ito, T.,** Takahashi, N., Shimura, Y. und Okada, K. (1997). A serin/threonine protein kinase gene isolated by an in vivo binding procedure using the Arabidopsis floral homeotic gene product, AGAMOUS. *Plant Cell Physiol.* **38**, 248-258.
- Jack, T.,** Sieburth, L. und Meyerowitz E. (1997). Targeted misexpression of AGAMOUS in whorl 2 of Arabidopsis flowers. *Plant Journal* **11**, 825-839.
- Kang, H.-G.,** Noh, Y.-S., Chung, Y.-Y., Costa, M.A., An, K. und An, G. (1995). Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1-10.
- Kater, M.M.,** Colombo, L., Franken, J., Buscher, M., Masiero, S., Van Lookeren Campagne, M.M. und Angenent, G. (1998). Multiple AGAMOUS homologs from Cucumber and Petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. *Plant Cell* **10**, 171-182.
- Kim, G.T.,** Tsukaya, H. und Uchimiya, H. (1998). The *CURLY LEAF* gene controls both division and elongation of cells during the expansion of the leaf blade in Arabidopsis thaliana. *Planta* **206**, 175-183.
- Kitahara, K.** und Matsumoto, S. (2000). Rose MADS-box genes „MASAKO C1 and D1“ homologous to class C floral identity genes. *Plant Science* **151**, 121-134.
- Kramer, E.M.,** Irish, V.F. (1999). Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* **399**, 144-148.
- Krassilov, V.A.** (1991). The origin of angiosperms: new and old problems. *TREE* **6**, 215-220.
- Krizek, B.A.** und Meyerowitz, E.M. (1996). The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**, 11-22.
- Krizek, B.A.,** Riechmann, J.L. und Meyerowitz, E.M. (1999). Use of the APETALA1 promoter to assay the in vivo function of chimeric MADS box genes. *Sex. Plant Reprod.* **12**, 14-26.
- Kunst, L.,** Klenz, J.E., Martinez-Zapater, J. und Haughn, G.W. (1989). AP2 gene determines the identity of perianth organs in flowers of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **1**, 1131-1135
- Liljegren, S.J.,** Ferrandiz, C., Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S. und Yanofsky, M.F. (1998). Arabidopsis MADS box genes involved in fruit dehiscence. *FNL* **25**, 9-19.
- Ma, H.,** Huang H. und Mizukami, Y. (1995). Functional analysis of the floral homeotic gene AGAMOUS and its product. *FNL* **20**, 23-30.
- Ma, H.** und de Pamphilis, C. (2000). The ABCs of floral evolution. *Cell* **101**, 5-8.
- Mandel, M.A.,** Bowman, J.L., Kempin, S.A., Ma, H., Meyerowitz, E.M. und Yanofsky, M.F. (1992). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell* **71**, 133-143.
- Martin, W.,** Gierl, A. und Saedler, H. (1989). Molecular evidence for pre-cretaceous angiosperm origins. *Nature* **339**

Mena, M., Ambrose, B.A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Yanofsky, M.F. und Schmidt, R.J. (1996). Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science* **274**, 1537-1540.

Meyerowitz, E.M. (1994). Flower development and evolution: new answers and new questions. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **91**, 5735-5737.

Mizukami, Y., Huang, M., Tudor, M., Hu, Y. und Ma, H. (1996). Functional domains of the floral regulator AGAMOUS: characterization of the DNA binding domain and analysis of dominant negative mutations. *Plant Cell* **8**, 831-845.

Mizukami, Y. und Ma, H. (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene AGAMOUS in transgenic Arabidopsis plants alters floral organ identity. *Cell* **71**, 119-131.

Mizukami, Y. und Ma, H. (1995). Separation of AG function in floral meristem determinacy from that in reproductive organ identity by expressing antisense AG RNA. *Plant Molecular Biology* **28**, 767-784.

Mizukami, Y. und Ma, H. (1997). Determination of Arabidopsis floral meristem identity by AGAMOUS. *Plant Cell* **9**, 393-408.

Mouradov, A., Glassick, T.V., Hamdorf, B.A., Murphy, L.C., Marla, S.S., Yang, Y. und Teasdale, R. (1998). NEEDLY, a Pinus radiata ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **95**, 6537-6542.

Münster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J.T., Martin, W., Saedler, H. und Theißen, G. (1997). Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **94**, 2415-2420.

Okamoto, J.K., Den Boer, B.G.W., Lotys-Prass, C., Szeto, W. und Jofuku, K.D. (1996). Flowers into shoots: Photo and hormonal control of a meristem identity switch in Arabidopsis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **93**, 13831-13836.

Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. und Weigel, D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-566.

Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wismann, E. und Yanofsky, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS box genes. *Nature* **405**, 200-203.

Perl-Treves, R., Kahana, A., Rosenman, N., Xiang, Y. und Silberstein, L. (1999). Expression of multiple AGAMOUS-like genes in male and female flowers of Cucumber (Cucumis sativus L.). *Plant Cell Physiol.* **39**, 701-710.

Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schmidt, R.J. und Yanofsky, M.F. (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS box regulatory gene family. *Genetics* **140**, 345-356.

Purugganan, M.D. (1997). The MADS-Box floral homeotic gene lineages predate the origin of seed plants: phylogenetic and molecular clock estimates. *J. mol. Evol.* **45**, 392-396.

Qiu, Y.-L., Lee, L., Bernasconi-Quadroni, D.E., Soltis, P.S., Soltis, M., Zanis, E.A., Zimmer, Z., Chen, Z., Savolainen, V. und Chase, M.W. (1999). The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* **402**, 404-407.

Regal, P.J. (1977). Ecology and evolution of flowering plant dominance. *Science* **196**, 622-629.

Riechmann, J.L., Ito, T. und Meyerowitz, E.M. (1999). Non-AUG initiation of *AGAMOUS* mRNA translation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell.Biol.* **19**, 8505-8512.

Rigola, D., Pe, M.E., Mizzi, L., Ciampolini, F. und Sari-Gorla, M. (2001). CaMADS1, an *AGAMOUS* homologue from hazelnut, produces floral homeotic conversion when expressed in *Arabidopsis*. *Sex Plant Reprod.* **13**, 185-191.

Rounsley, S.D., Ditta, G.S. und Yanofsky, M.F. (1995). Diverse Roles of MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **7**, 1259-1269.

Rutledge, R., Regan, S., Nicolas, O., Fobert, P., Cote, C., Bosnich, W., Kauffeldt, C., Sunohara, G., Seguin, A. und Stewart, D. (1998). Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **15**, 625-634.

Saitou, N. und Nei, M. (1987). The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.

Samach, A., Onouchi, H., Glod, S.E., Ditta, D.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. und Coupland, G. (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**, 1600-1613.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Samigullin, T.K., Martin, W., Troitsky, A.V. und Antonov, A.S. (1999). Molecular data from chloroplast *rpoC1* gene suggest a deep and distinct dichotomy of contemporary spermatophytes into two monophyla: gymnosperms (including gnetales) and angiosperms. *J. Mol. Evol.* **49**, 310-315.

Schmidt, R. J., Veit, B., Mandel, A.M., Mena, M., Hake, S. und Yanofsky, M.F. (1993). Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the Maize homolog of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Plant Cell* **5**, 729-737.

Schneitz, K., Baker, S.C., Gasser, C.S. und Redweik, A. (1998). Pattern formation and growth during floral organogenesis: *HUELLENLOS* and *AINTEGUMENTA* are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 2555-2563.

Schwarz-Sommer, Z., Hujser, P., Nacken, W., Saedler, H. und Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**, 931-936.

Sessions, A. (1999). Piecing together the *Arabidopsis* gynoecium. *Trends in Plant Science* **4**, 296-298.

Shore, P. und Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-Box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **229**, 1-13.

Sieburth, L.E., Runnind, M.P. und Meyerowitz, E.M. (1995). Genetic separation of third and fourth whorl functions of *AGAMOUS*. *Plant Cell* **7**, 1249-1258.

Sieburth, L.E., Drews, G.N. und Meyerowitz E.M. (1998). Non-autonomy of *AGAMOUS* function in flower development: use of a Cre/loxP method for mosaic analysis in Arabidopsis. *Development* **125**, 4303-4312.

Soltis, P.S., Soltis, D.E. und Chase, M.W. (1999a). Angiosperm Phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* **402**, 402-404

Soltis, P.S., Soltis, D.E., Wolf, P.G., Nickrent, D.L., Chaw, S.-M. und Chapman, R.L. (1999b). The phylogeny of land plants inferred from 18S rDNA sequences: pushing the limits of rDNA signal? *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1774-1784.

Summerton, J., Atkins, T. und Bestwick, R. (1983). Rapid methods of preparation of bacterial plasmids. *Annal. Biochem.* **103**, 79.

Sun, G., Dilcher, D.L., Zheng, S. und Zhou, Z. (1998). In search of the first flower: a jurassic angiosperm *archaeofructus*, from northeast China. *Science* **282**, 1692-1694.

Tandre, K., Albert, V.A., Sundas, A. und Engström, P. (1995). Conifer homologs to genes that control floral development in Angiosperms. *Plant Molecular Biology* **27**, 69-78.

Tandre, K., Svenson, M., Svensson, M.E. und Engström, P. (1998). Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant Journal* **15**, 615-623.

Theißen, G. (2000). Plant Breeding: *FLO*-like meristem identity genes: from basic science to crop plant design. *Progress in Botany* **61**, 167-183.

Theißen, G. (2000). Shattering developments. *Nature* **404**, 711-713.

Theißen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanna, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.-U. und Saedler, H. (2000). A short history of MADS-Box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **42**, 115-149.

Theißen, G., Kim, J.T. und Saedler, H. (1996). Classification and phylogeny of the MADS box multigene family suggests defined roles of MADS box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J.Mol.Evol.* **43**, 484-516.

Theißen, G. und Saedler, H. (1995). MADS box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's „bioenergetic law“ revised. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **5**, 628-639.

Theißen, G. und Saedler, H. (1998). Molecular architects of plant body plans. *Prog. Bot.* **59**, 227-256.

Theißen, G. und Saedler, H. (2001). Floral quartets. *Nature* **409**, 469-471.

Theißen, G., Strater, T., Fischer, A. und Saedler, H. (1995). Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of *AGAMOUS*-like MADS-box genes from maize. *Gene* **156**, 155-166.

Villanueva, J.M., Broadhvest, J., Hauser, B.A., Meister, R.J., Schneitz, K. und Gasser, C.S. (1999). INNER NO OUTER regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes & Development* **13**, 3160-3169.

Weigel, D. und Meyerowitz, E.M. (1994). The ABC's of floral homeotic genes. *Cell* **78**, 203-209.

Weiser, C. (1999). *In-vitro* Bindestudien zweier MADS-Domäne Proteine der Gymnospermen *Gnetum gnemon*. Diplomarbeit, Universität Köln, Germany.

Western, T.L. und Haughn, G.W. (1999). *BELL1* and *AGAMOUS* genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **18**, 329-336.

Wilmzig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Genet.* **1**, 158

Winter, K.-U. (1997). Charakterisierung von MADS-Box Genen der Gymnosperme *Gnetum gnemon* L., Diplomarbeit, Universität Bonn.

Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. und Theißen, G. (1999). MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* **96**, 7342-7347.

Wittich, P.E., de Heer, R.F., Cheng, X.-F., Kieft, H., Colombo, L., Angenent, G.C. und van Lammeren, A.A.M. (1999). Immunolocalization of the petunia FLORAL BINDING PROTEINS 7 and 1 during seed development in wildtype and expression mutants of *Petunia hybrida*. *Protoplasma* **208**, 224-229.

Yanisch-Perron, C., Viera, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains-nucleotide sequences of the M13MP18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103

Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. und Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-41??

8. ANHANG

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
p.A.	zur Analyse
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Nomenklatur

Wildtypgen:	Großbuchstaben, kursiv	Beispiel: <i>AGAMOUS</i> (AG)
Protein:	Großbuchstaben	Beispiel: AGAMOUS (AG)
Mutante:	Kleinbuchstaben, kursiv	Beispiel: <i>agamous</i> (ag)

8.2 Oligonukleotide

BASTA-Resistenzgen-spezifische *primer*:

555 5'-ACCTGCTGAAGTCCCTGGAGG-3'
557 3'-AAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAG-5'

pRT100-Vektor-spezifische *primer*:

CMVI 5'-CTTGCATGCCTGCAGGTCAACATGG-3'
TM07 3'-CACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAG-5'

Aktinspezifische *primer* für *Arabidopsis thaliana*:

AT258fw: 5'-TGCGACAATGGAAGTGAATG-3'
AT258bw: 3'-GGATAGCATGTGGAAGTCATACC-5'

Das vierte Intron von *AGAMOUS* umspannende Oligonukleotide:

AGIn4fw GCGTCAACAAATTATCAGCATAAC 5'-3'
AGIn4bw CATTGACCCTATCGTCTCACC 3'-5'

Das fünfte Intron von *AGAMOUS* umspannende Oligonukleotide:

AGIn5fw GAGAAGTATTACCCGAATCCG 5'-3'
AGIn5bw TCGATTCAGAAAATAAGAGCTC 3'-5'

Oligonukleotide zum Erzeugen künstlicher Schnittstellen:

Die hochgestellten Nukleotide sind verändert, um die entsprechende Schnittstelle künstlich zu erzeugen, fett ist das Start-ATG gekennzeichnet.

GGM3-cDNA:

ck1 5'-AGCTTGTTTCAG ^{NcoI} ^{CC}ATGG GACGC-3'

BamHI
ck2 3'-TGAAATCAT GG^{ATC} TTAGGTCTG-5'

ZMM2-cDNA:

ck3 5'-CACACCA ^{NcoI} ^{CC}ATG^G GCCCATGCTC-3'

BamHI
ck4 3'-AGGTATAGCT ^GGA^{TC} ATCATCCG-5'

ZAG1-cDNA:

ck5 5'-GAACAAGA ^{NcoI} ^CCATG^G ACATCCGAG-3'

BamHI
ck6 3'-AAGCTTGAG GGA^{TC} AATATTTATC-5'

ZMM1-cDNA:

ck7 5'-TTTCAGCTGAG ^{Apal} ^{GGGC}CC AGCATGG-3'

ck8	BamHI	3'-CTTTCTCAT GGA ^{TC} C AGTTTAG-5'
<u>ZAG2-cDNA:</u>		
ck9	NcoI	5'-GTCGCCA ^C CATGG GTAGAGG-3'
ck10	BamHI	3'-CACAAAA GGAT ^C C AACAATACACAC-5'
<u>ZMM23-cDNA:</u>		
ck11	ApaI	5'-ACACCACCACG ^{GGG} CCC ATGC-3'
ck12	BamHI	3'-TATCTGAATT G ^{GA} TCC ATGATTTAC-5'
<u>PLE-cDNA:</u>		
ck13	NcoI	5'-CAGCTTTTGTCA CCATGG AATTTCC-3'
ck14	BamHI	3'-GCTTTCCC G ^{GAT} CC TCAAACAAGC-5'
<u>DEFH9-cDNA:</u>		
ck15	NcoI	5'-TTTCTG ^{CC} ATGG GAGAGGAAAG-3'
ck16	BamHI	3'-CAG G ^{GA} TC ^C TGATTACCCAAGATG-5'
<u>AG-cDNA:</u>		
ck17	NcoI	5'-CTC CC ^A TG ^G GGAAAT ^A TGGGGAGAG-3'
ck18	BamHI	3'-TCCT GG ^A T ^{CC} AATATTACACTAAGT-5'
<u>MAG-cDNA:</u>		
ck21	NcoI	5'-GAAGAAG C ^C ATGG GCCGTGGC-3'
ck22	BamHI	3'-CATTGGA GGAT ^{CC} A CGACATTACC-5'

Genspezifische unveränderte Oligonukleotide:

ck40AG	5'-TTCTGAAATCGACTACATGCA-3'
ck41AG	3'-GCGGTTCTGGTTTGGCGAGA-5'
ck46MAG	5'-CAGGCATTTGATGGGTGAGGC-3'
ck47MAG	3'-GCCTTGAAGGATGTTTCATTTA-5'
ck44PLE	5'-GATATGCTAACAAACAGTGTTAGG-3'
ck45PLE	3'-GCCTTGAAGGAAGGTTACTTGG-5'
ck48DEFH9	5'-CAACAAGAGTCCAAGAAGCTGCG-3'
ck49DEFH9	3'-GCATTATACGACTTATACTACCTG-5'
ck50ZAG1	5'-CTGCGGAGAGGAACAACGGC-3'
ck51ZAG1	3'-GACCCGACTCCGTCCGTCTAG-5'
ck52ZMM2	5'-GCTGCTATATGCTGAAGTTGAC-3'

```

ck53ZMM2      3'-CGTTGGATGTTGGGAGGTCG-5'
ck54ZAG2      5'-CGCTCCTAGAGCACAAATGCC-3'
ck55ZAG2      3'-GGAGTCCTGGTTCTAACTCCT-5'
ck56ZMM1      5'-ATGCTGCAAAACACTAACAGGC-3'
ck57ZMM1      3'-GGTGCCGATGGTTGACCGC-5'
ck58M017      5'-CGTCGTCTTCTCCAGCCG-3'
ck59M017      3'-GGTGCCGATGGTTGACCGC-5'
ck42GGM3      5'-GCAGCTGGAGGGTAAACTCG-3'
ck43GGM3      3'-GCTAGGAGTCCGGGTGTTAA-5'

```

8.3. alignment

alignment zu Abbildung 6:

```

                GapWeight: 4
                GapLengthWeight: 1

Name: fbp11      Len: 339  Check: 4407  Weight: 1.00
Name: fbp7       Len: 339  Check: 2187  Weight: 1.00
Name: defh9      Len: 339  Check: 5116  Weight: 1.00
Name: defhp83    Len: 339  Check: 7230  Weight: 1.00
Name: cum10      Len: 339  Check: 9645  Weight: 1.00
Name: mdmads10   Len: 339  Check: 744   Weight: 1.00
Name: agl11      Len: 339  Check: 3359  Weight: 1.00
Name: osmads3    Len: 339  Check: 6591  Weight: 1.00
Name: zmm23      Len: 339  Check: 1732  Weight: 1.00
Name: zmm2       Len: 339  Check: 8475  Weight: 1.00
Name: smads42a   Len: 339  Check: 2719  Weight: 1.00
Name: smads42d   Len: 339  Check: 1057  Weight: 1.00
Name: dal2       Len: 339  Check: 3181  Weight: 1.00
Name: pinres0001 Len: 339  Check: 3007  Weight: 1.00
Name: GBMADS2    Len: 339  Check: 1281  Weight: 1.00
Name: ggm3       Len: 339  Check: 5612  Weight: 1.00
Name: agl1       Len: 339  Check: 5251  Weight: 1.00
Name: agl5       Len: 339  Check: 3432  Weight: 1.00
Name: fbp6       Len: 339  Check: 1865  Weight: 1.00
Name: pagl1      Len: 339  Check: 2032  Weight: 1.00
Name: nfbp6      Len: 339  Check: 2655  Weight: 1.00
Name: ple        Len: 339  Check: 8115  Weight: 1.00
Name: masako_c1  Len: 339  Check: 7811  Weight: 1.00
Name: masako_c2  Len: 339  Check: 7848  Weight: 1.00
Name: masako_c3  Len: 339  Check: 8026  Weight: 1.00
Name: stag1      Len: 339  Check: 5401  Weight: 1.00
Name: mag        Len: 339  Check: 8863  Weight: 1.00
Name: masako_d1  Len: 339  Check: 6     Weight: 1.00
Name: ag         Len: 339  Check: 7405  Weight: 1.00
Name: bag1       Len: 339  Check: 3266  Weight: 1.00
Name: ptag1      Len: 339  Check: 2088  Weight: 1.00
Name: ptag2      Len: 339  Check: 4648  Weight: 1.00
Name: camads1    Len: 339  Check: 320   Weight: 1.00
Name: gaga1      Len: 339  Check: 5680  Weight: 1.00
Name: gaga2      Len: 339  Check: 5605  Weight: 1.00
Name: nag1       Len: 339  Check: 6419  Weight: 1.00
Name: pmads3     Len: 339  Check: 1518  Weight: 1.00
Name: tag1       Len: 339  Check: 8326  Weight: 1.00
Name: gag2       Len: 339  Check: 1350  Weight: 1.00
Name: far        Len: 339  Check: 7191  Weight: 1.00
Name: rap1       Len: 339  Check: 4815  Weight: 1.00
Name: slm1       Len: 339  Check: 9117  Weight: 1.00

fbp11  ~~~~MGRGKI  EIKRIENNTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEIALI
fbp7   ~~~~MGRGKI  EIKRIENNTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEIALI
defh9  ~~~~MGRGKI  EIKRIENNTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI
defhp83 ~~~~MGRGKI  EIKRIENNTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAELALI
cum10  ~~~~MGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI
mdmads10 ~~~~MGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  ILCDAEVALI
agl11  ~~~~MGRGKI  EIKRIENSTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI
osmads3 ~~~~MGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI
zmm23  ~~~~QGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALV
zmm2   ~~~~QGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALV
smads42a ~~~~MGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI
smads42d ~~~~MGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI
dal2   ~~~~MGRGKI  EIKRIENTTN  RQVTFCKRRN  GLLKKAYELS  VLCDAEVALI

```

```

pinres0001 ~~~~MGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
GBMADS2 ~~~~MGRGKI EMKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
ggm3 ~~~~MGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
agl1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALV
agl5 ~~~~IGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALV
fbp6 ~~~~SGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
pagl1 ~~~~SGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
nfbp6 ~~~~SGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
ple ~~~~NGRGKI EIKRIENITN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALV
masako_c1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
masako_c2 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
masako_c3 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
stag1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
mag ~~~~MGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
masako_d1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
ag ~~~~SGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
bag1 ~~~~AGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
ptag1 ~~~~LGRGKV EIKRIENTTN RQVTFCKRRS GLLKKAYELS VLCDAEVALI
ptag2 ~~~~LGRGKV EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
camads1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
gagal ~~~~MGKGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
gaga2 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
nag1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
pmads3 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
tag1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALV
gag2 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
far ~~~~IGRGKI EIKRIENKTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALV
rap1 ~~~~MGRGKI EIKRIENVTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI
slm1 ~~~~LGRGKI EIKRIENTTN RQVTFCKRRN GLLKKAYELS VLCDAEVALI

```

101

150

```

fbp11 VFSTRGRVYE YANNN.IKGT IERYKKATAE TSNACTTQEL NAQFYQQESK
fbp7 VFSTRGRVYE YSNNN.IRAI IDRYKKATVE TSNAFTTQEL NAQFYQQESK
defh9 VFSSRGVYE YSNNN.IRST IDRYKNATAE SSNAFTTQEI NAQFYQQESK
defhp83 VFSSRGVYE YSNNN.IRST IERYKKATSD SSNAFTTQEI NAQFYQQESK
cum10 VFSSRGRLYE YS.NNSIKTT IERYKKACSD SSATSSVTEL NTQYYQQESA
mdmads10 VFSTRGRLYE YSNNNSIRNT IERYKKACSD STGSSSVTEI NAQ.....
agl11 VFSTRGRLYE YANNN.IRST IERYKKACSD STNTSTVQEI NAAYYQQESA
osmads3 VFSSRGRLYE YANN.SVKST VERYKKANSD TSNSGTVAEV NAQHYQQESS
zmm23 VFSSRGRLYE YANN.SVKST IERYKKANSD TSNSGTVAEV NAQHYQQESS
zmm2 VFSSRGRLYE YANN.SVKST IERYKKANSD SSNSGTVAEV NAQYYQQESS
smads42a VFSSRGRLYE FANH.SVKRT IERYKKTCDV NHHGGAISES NSQYWQQEAG
smads42d VFSSRGRLYE FANH.SVKRT IERYKKTCDV NHHGGAISES NSQYWQQEAG
dal2 VFSSRGRLYE FANH.SVKRT IERYKKTCDV NHHGGVISES NSQYWQQEAG
pinres0001 VFSSRGRLYE FANH.SVKRT IERYKKTCDV NHHGGAISES NSQYWQQEAG
GBMADS2 VFSSRGRLYE FANN.SVKRT IDRYKKTCDV NSHGGAISES NSQYWQQEAG
ggm3 VFSSRGRLYE FANN.SVKRT IERYRKTCDV NNQGGAIAS NAQYWQQEAV
agl1 IFSTRGRLYE YANN.SVRGT IERYKKACSD AVNPPSVTEA NTQYYQQEAS
agl5 IFSTRGRLYE YANN.SVRGT IERYKKACSD AVNPPTITEA NTQYYQQEAS
fbp6 VFSSRGRLYE YANN.SVRAT IDRYKKHHD STSTGSVSEA NTQYYQQEAA
pagl1 VFSSRGRLYE YANN.SVRAT IDRYKKHHD STSTGSVSEA NTQYYQQEAA
nfbp6 VFSSRGRLYE YANN.VRAT IDRYKKHHD STSQGSVSEA NTQYYQQETA
ple VFSSRGRLYE YANN.SVRAT IERYKKASAD SSNSVSTSEA NTQFYQQEAN
masako_c1 VFSSNRGRLYE YSNN.SVRET IERYKKACAD SSNNGSVSEA TTQYYQQEAA
masako_c2 VFSSNRGRLYE YSNN.SVRET IERYKKACAD SSNNGSVSEA TTQYYQQEAA
masako_c3 VFSSNRGRLYE YSNN.SVRET IERYKKACAD SSNNGSVSEA TTQYYQQEAA
stag1 VFSSNRGRLYE YSNN.SVRET IERYKKACAD TSNTGSASEA TTQYYQQEAA
mag VFSSRGRLYE YANN.SVRAT IDRYKKACAD SSSLGCVSEA NSQYYQQESS
masako_d1 VFSSRGRLYE YANN.SVRAT IERYKKAC.D SSNTGSVTEI NVQFYQQEAS
ag VFSSRGRLYE YSNN.SVKGT IERYKKAISD NSNTGSVAEI NAQYYQQESA
bag1 VFSSRGRLYE YSNN.SVKGT IERYKKAISD NSNTGSVAEI NAQYYQQESA
ptag1 VFSSRGRLYE YSND.SVKST IERYKKASAD SSNTGSVSEA NAQYYQQEAA
ptag2 VFSSRGRLYE YSNN.SVKST IERYKKACAD SSNNGSVSEA NAQFYQQEAA
camads1 VFSSRGRLYE YANN.SVKGT IERYKKACAD SSNNGSVSEA NTQFYQQEAA
gagal VFSSRGRLYE YANN.SVKGT IDYKKAICLD PPTSGTVAEA NTQYYQQEAA
gaga2 VFSSRGRLYE YANN.SVKGT IDRYKKAICLD PPSSGVAEA NAQFYQQEAA
nag1 VFSSRGRLYE YANN.SVKAT IERYKKACSD SSNTGSISEA NAQYYQQEAS
pmads3 VFSSRGRLYE YANN.SVKAT IERYKKACSD SSNTGSIAEA NAQYYQQEAS
tag1 VFSSNRGRLYE YANN.SVKAT IERYKKACSD SSNTGSVSEA NAQYYQQEAS
gag2 VFSTRGRLYE YANN.SVKGT IERYKKAICD SPNTSSVSEA NAQFYQQEAS
far VFSSRGRLYE YANN.SVKAT IDRYKKASSD SSLNGSISEA NTQYYQQEAS
rap1 VFSSRGRLYE YANH.SVKAT IERYKKTCDV STGVTSVEEA NA...QQEAA
slm1 VFSSRGRLYE YANH.SVKGT IDRYKKASSD NSGASSAAEA NAQYYQQEAA

```

151

200

```

fbp11 KLAQQIQLLQ NTN...RHL VEGLSALNV RELKQLENRL ERGITRIRSK
fbp7 KLRQQIQMLQ NSN...RHL VEGLSLNV RELKQLENRL ERGIARIRSK
defh9 KLRQQIQMLQ NSNSKLHRNL LGEGLGTLNV KEMKQLESRL ERGISRIRSK
defhp83 KLRQQIQVLQ NSN...RQL MGEGLSSLNV KEMKQLETRL ERGIARIRAK

```

cum10	KLRQQIQMLQ	NSNSNLVRL	MGDSLALTV	KELKQLENRL	ERGITRIRSK
mdmads10NSN..RHL	MGDALSTLTV	KELKQVENRL	ERGITRIRSK
agl11	KLRQQIQTIQ	..NSN..RNL	MGDSLSSLSV	KELKQVENRL	EKAISRIRSK
osmads3	KLRQQISSLQ	NAN...SRTI	VGDSINTMSL	RDLKQVENRL	EKGIKIRAR
zmm23	KLRQAIDSLQ	NAN...RTI	VGDSIHTMGL	RELKQMEGKL	EKAINKIRAR
zmm2	KLRQMIHSLQ	NAN...TRNI	VGDSIHTMGL	RDLKQMEGKL	EKAISKIRAR
smads42a	KLRQQIEILQ	NAN...RHL	MGDGLTALNI	KELKQLEVRL	EKGIGRVRSK
smads42d	KLRQQIEILQ	NAN...RHL	MGDGLTALNI	KELKQLEVRL	EKGIGRVRSK
dal2	KLRQQIEILQ	NAN...RHL	MGDGLTALNI	KELKQLEVRL	EKGIGRVRSK
pinres0001	KLRQQIEILQ	NAN...RHL	MGDGLTALNI	KELKQLEVRL	EKGISRVRSK
GBMADS2	KLRQQIDILQ	NAN...RHL	MGDALTSLSV	KELKQLEIRL	ERGISRVRSK
ggm3	KLKQQIDVLN	NQI...RHY	MGECLQSMTI	KELKQLEGKL	EKGLGRVRSK
agl1	KLRRQIRDIQ	NSN...RHI	VGESLGSLSNF	KELKNLEGR	EKGISRVRSK
agl5	KLRRQIRDIQ	NLN...RHI	LGESLGSLSNF	KELKNLESRL	EKGISRVRSK
fbp6	KLRRQIRDIQ	TYN...RQI	VGEALSSLSV	RGLKNLEGR	EKAIGRVRSK
pag11	KLRRQIRDIQ	TYN...RQI	VGEALSSLSV	RDLKNLEGR	EKAIGRVRSK
nfbp6	KLRRQIRDIQ	TYN...RQI	VGEALSSLSV	RDLKNLEGR	EKAIGRVRSK
ple	KLRRQIREIQ	TSN...RQM	LGEVSNMAL	KDLKSTEAKV	EKAISRIRSK
masako_c1	KLRAQITTLQ	NSN...RGY	MAEGLSNMSI	KELKGVETKL	EKAISRIRSK
masako_c2	KLRAQITTLQ	NSN...RGY	MAEGLSNMSI	KELKGVETKL	EKAISRIRSK
masako_c3	KLRAQITTLQ	NSN...RGY	MAEGLSNMSI	KELKGVETKL	EKAISRIRSK
stag1	KLHNQINALQ	NIN...RGY	MAEGLSNKNI	KELKGMERKL	ERAITRIRSK
mag	KLRQQIALLQ	NAN...RHL	MGEALSSMTV	KELKQLENRL	EKGISRIRSK
masako_d1	KLRRQIREIQ	NSN...RHI	LGEALSTLNV	KELKNLEGR	EKGISRIRSK
ag	KLRQQIISIQ	NSN...RQL	MGETIGSMSP	KELRNLEGR	ERSITRIRSK
bag1	KLRQQIISIQ	NSN...RQL	MGETIGSMSP	KELRNLEGR	DRSVNIRSK
ptag1	KLRSQIGNLQ	NSN...RNM	LGEALSSLSV	KELKSLEIRL	EKGISRIRSK
ptag2	KLRSQIGNLQ	NSN...RNM	LGEALSSLSV	KELKSLEIKL	EKGIGRIRSK
camads1	KLRGQIRSVQ	DSN...RHM	LGEALSELNF	KELKNLEKLN	EKGINRIRSK
gaga1	KLRQQIANLQ	NQNRQFYRNI	MGESLGMPV	KDLKNLEGR	EKAISRIRAK
gaga2	KLRQQIANLQ	NQNRQFYRNI	MGESLGNMPA	KDLKNLESKL	EKGIGKIRSK
nag1	KLRAQIGNLQ	NQN...RNM	LGESLAALS	RDLKNLEQKI	EKGISKIRSK
pmads3	KLRAQIGNLQ	NQN...RNF	LGESLAALS	RDLKNLEQKI	EKGISKIRAK
tag1	KLRAQIGNLQ	NQN...RNM	MGEALAGMKL	KELKNLEQRI	EKGISKIRSK
gag2	KLRQEISSIQ	KNN...RNM	MGESLGSLSV	RDLKLETKL	EKGISRIRSK
far	KLRAQISNLQ	NQN...RNM	LGESLGSLSV	RELKNLESRV	ERGISRIRSK
rap1	KLRNQIRTLQ	NQTRNTSRNL	MGEGLTSMNM	KDLKNLETRL	EKGISRVRAK
slm1	KLRNQIRTV.	..TEN.NRHL	MGEGLSSLM	KDLKSLENKL	ERGISRIRSK

201

250

fbp11	KHEMILAEETE	NLQKR.EIQ	EQENTFLRSK	..IAE.NERLQELS
fbp7	KHEMILAESE	DLQKR.EIQ	EQENAFRSK	..IAE.NERLQELS
defh9	KHEMILAEETE	DLQKR.EIQ	EQENACLRK	..IQE.SEKLQELS
defhp83	KHEMILAEIE	DLQKR.EILL	EQENACLRK	..ILE.NEKLQQLS
cum10	KHEMLLAEIE	YLQKR.EIEL	ENENVCIRTK	..IAE.VERVQQAN
mdmads10	KHELLLAEIE	YFQKK.EIEL	ENENVYFRTK	..VSE.VERLQQAN
agl11	KHELLLVEIE	NAQKR.EIEL	DNENIYLRTK	..VAE.VERYQQHH
osmads3	KNELLYAEVE	YMQKR.EVEL	QNDNMYLRSK	..VVE.NERGQQPLN
zmm23	KNELLYAEVE	YMQKR.EMDL	QTDNMYLRSK	..IAENNETGQPPMN
zmm2	KNELLYAEVD	YMQKR.EMDL	QTDNMYLTSK	..IAESNETGQPAMH
smads42a	KNEMLLEEID	IMQRREHI.L	IQENEILRSK	..IAE.CQ..NSHNTN
smads42d	KNEMLLEEID	IMQRREHI.L	IQENEILRSK	..IAE.CQ..NSHNTN
dal2	KNEMLLEEID	IMQRREHI.L	IQENEILRSK	..IAE.CQ..NSHNTN
pinres0001	KNEMLLEEID	IMQRREHI.L	IQENEILRSK	..IAE.CQ..NSHNTN
GBMADS2	KNEMLLEEIE	IMQRREHI.L	LAENQFLRTK	..IAE.CE..SSQAN
ggm3	RNEKLLLEDID	TLQRREDN.L	IRENEYIRNK	..IAE.CQ..SHQHAN
agl1	KNELLVAEIE	YMQKR.EMEL	QHNNMYLRAK	..IAE.GAR.	..LNPDQQESS
agl5	KHEMLVAEIE	YMQKR.EIEL	QNDNMYLRSK	..ITE...R.	..TGLQQQESS
fbp6	KNELLFSEIE	LMQKR.EIEM	QANMYLRAK	..IAE.VERATQQMN
pag11	KNELLFSEIE	LMQKR.EIEM	QANMYLRAK	..IAE.VERATQQMN
nfbp6	KNELLFSEIE	LMQKR.EIEM	QANMYLRAK	..IAE.VERAQQQMN
ple	KNELLFAEIE	HMQR.ELEL	HANMFLRAK	..IAE.GERAQQQMN
masako_c1	KNELLFAEIE	YMQKR.ELDL	HNNNQLLRAK	..IAE.NER.HQQSIN
masako_c2	KNELLFAEIE	YMQKR.ELDL	HNNNQLLRAK	..IAE.NER.HQQSIN
masako_c3	KNELLFAEIE	YMQKR.ELDL	HNNNQLLRAK	GQIAE.NER.HQQSIN
stag1	KNELLFAEIE	YMQKR.ELDL	HNNNQLLRAK	..IAE.NER.QQSII
mag	KNELLFAEIE	YMQKR.EVDL	QNDNMYLRAK	..ITE.NERAQQMG
masako_d1	KNEMLFAEIE	YMQKR.EIEL	QHNNFLRAK	..IAE.NDRAQQQQAN
ag	KNELLFSEID	YMQKR.EVDL	HNDNQILRAK	..IAE.NER.NNPSSIS
bag1	KNELLFAEID	YMQKR.EVDL	HNDNQILRAK	..IAE.NER.NNPSSMS
ptag1	KNELLFAEIE	YMQKR.EVDL	HNNNQLLRAK	..ISE.NER.KRQSMN
ptag2	KNELLFAEIE	YMQKR.EIDL	HNNNQLLRAK	..IAE.NER.KRQHMN
camads1	KNELLLAEIE	YMHKR.EVDL	HNNNQFLRAK	..IAE.NER.NQQNLN
gaga1	KNELLFAEIE	YMQKR.ELEL	HNSNQFLRAK	..IVE.NERAQQHMS
gaga2	KNELLFAEIE	YMQKR.ENEL	HNSNQFLRAK	..IAE.NERAQQ.HMS
nag1	KNELLFAEIE	YMQKR.EIDL	HNNNQYLRAK	..IAE.TERA	..QQQQQQQMN
pmads3	KNELLFAEIE	YMQKR.EIDL	HNNNQYLRAK	..IAE.TERSQQQMN
tag1	KNELLFAEIE	YMQKR.EVDL	HNNNQYLRAK	..IAE.TERA	..QHQQQMN
gag2	KNELLFAEIE	YMQKK.EIDL	HNNNQYLRAK	..IAE.NERAQQHMN

```

far KNELLFAEIE YMQRQEIDL HNNNQYLRAK . . IAE .SERV . . . . QGQHMN
rap1 KNELLFGEIE FMQKK.EIEL HNNNQFLRAK . . IAE .SERS . . . . . QOSMS
slm1 KNELLFAEIE FMQKR .EVEL HNNNQYLRAK . . IAE .NERA . . . . . QOSMS

251 300
fbp11 MMPAT...GQ EYNAF..... . . QQYFA..R NM.LQLNM.. . . . . MEGGV
fbp7 MMPAG...GQ EYNAI..... . . QQYLA..R NM.LQLNM.. . . . . ME.GV
defh9 MMPGT...Q DY.AF..... . . QAYFA..R NM.L..NM.. . . . . MDN.V
defhp83 MMPTGQEAQ DY.AF..... . . QAYLA..R NMHLQCNMQL QSNSDMDT.I
cum10 . . . . . MVSGQ ELNAI..... . . QA.LANSR NFFSP.NIME PA.GP...V.
mdmads10 . . . . . MVSGS EMNAI..... . . QA.LA.SR HFFSQ.NMIE .G.GE...A.
agl11 HQ...MVSGS EINAI..... . . EA.LA.SR NYFAH.SIMT AGSGSGNGG.
osmads3 MMGA.A.STS EYDHMV.... . . NNPY.DSR N.FLQVN.IM QQP..QHYAH
zmm23 MIGL.P.STS EYDHMA.... . . . . PFVDSR N.FLQVN.MQ QQP..QHYSH
zmm2 MMGVPP.PTS EYDHMA.... . . . . PF.DSR N.FLQVS.M. . . P..QHYSH
smads42a MLSAP...E. .YDAL..P.A . . . . . F.DSR N.FLHANLID AA...HHYA.
smads42d MLSAP...E. .YDAL..P.A . . . . . F.DSR N.FLHANLID AA...HHYA.
dal2 MLSAP...E. .YDAL..P.A . . . . . F.DSR N.FLHANLID AA...HHYA.
pinres0001 MLSAP...E. .YDAL..P.A . . . . . F.DSR N.FLHANLID AA...HHYA.
GBMADS2 MLPGP...E. .FDAL..P.G . . . . . F.DSR H.FLHASIMD .A...HHYA.
ggm3 MLTAAA.VE. .YDAI..PAA . . . . . Y.DSR N.FMHANLIE AAAAHHHYA.
agl1 VI.QGT.T.. VYESGV.SSH DQSQHYN..R N.YIPVNLLE . . PN.QQFSG
agl5 VIHQG...T.. VYESGV.TSSH .QSGQYN..R N.YIAVNLLE . . PN.QNSSN
fbp6 LMHGGG.SE. .Y..QQPMS STSQPY.DAR N.FLPVNLLE . . PN.PHYSR
pag11 LMPGGG.SE. .Y..QQPMS STSQPY.DAR N.FLPVNLLE . . PN.PHYSR
nfbp6 LMP.GG.SE. .YHQQQPM. STSQNYNDAR N.FLPVNLLE . . PN.HHYSR
ple LMP..G.SD. .Y....QPM. .TSQSY.DVR N.FLPMNLME . . PNQQQYSR
masako_c1 AIAGG...HG SY.DIMOPTQ . . . . . PFHEAR N.YFQVNALQ . . PNIHQYS.
masako_c2 AIAGG...HG SY.DIMOPTQ . . . . . PFHEAR N.YFQVNALQ . . PNIHQYS.
masako_c3 AIAGG...HG SY.DIMOPTQ . . . . . PFHEAR N.YFQVNALQ . . PNIHQYS.
stag1 AITGG...HG SY.EIVOPTQ . . . . . PFHEAR N.YFQVNALQ . . PNIHQYS.
mag MLPA...P.. EYD.VMP... G...F.DSR N.FLQVN.LM . . DSSHHSYSH
masako_d1 MMPGTL.S.. AYDQSMPPPQ S...Y.D.R S.FLPV..IL . . ESNHHYNR
ag LMPGGS.N.. .YEQLMPPPQ TQSQPF.DSR N.YFQVAALQ . . PNNHHYSS
bag1 LMPGGS.N.. .YEQIMPPPQ TQPQPF.DSR N.YFQVAALQ . . PNNHHYSS
ptag1 LMPGG..AD. .F.EIV.QS. .Q..PY.DSR N.YSQVNLGLQ . . PAS.HYS.
ptag2 LMPGG..VN. .F.EIM.QS. .Q..PF.DSR N.YSQVNLGLP . . PAN.HYP.
camads1 VMPGG..GN. .Y.ELM.QS. .Q..SF.DSR N.YFQVDALQ . . PNH.HYP.
gaga1 LMPG.S.SD. .Y.ELVTPH. .Q..PF.DGR N.YLQTNLDLQ . . PNN.DYS.
gaga2 LMPG.S.SD. .Y.ELVAPH. .Q..PF.DGR N.YLQVNDLQ . . PNN.NYS.
nag1 LMPGSS.S.. .Y.ELVPPP. .H..QF.DTR N.YLQVNLGLQ . . TNN.HYT.
pmaps3 LMPGSS.S.. .Y.DLVPPP. .Q..SF.DAR N.YLQVNLGLQ . . TNN.HYP.
tag1 LMPGSS.SN. .YHELVPPP. .Q..QF.DTR N.YLQVNLGLQ . . TNN.HYP.
gag2 LMPG.S.SD. .Y.ELAPP.. .Q..SF.DGR N.YIQLNLGLQ . . PNN.HYS.
far LMPGGS.SG. .YEQLV.ET. .Q..PF.DAR N.YLQVNLGLQ . . PNN.DYP.
rap1 LMPGSS.SGE QHYELMPQS. .QAGPF.DSR N.FFQVSDLQ . . PDE.RYS.
slm1 LMPGGS.S.E . .YELAPP. .QS..F.DSR N.YFQVNALQ . . PNNTHYS.

301 339
fbp11 PSYDPLPSAH DKK.SLQLE~ ~~~~~
fbp7 PSY.PLPS.. DKK.SLDLE~ ~~~~~
defh9 APYQ.VP... DKKSSLHLG~ ~~~~~
defhp83 TTYA.AP... DKK.TLHLG~ ~~~~~
cum10 .SY...SHQ. DKKM.LHLG~ ~~~~~
mdmads10 .TF...PQQ. DKKN.LHLG~ ~~~~~
agl11 .SY...SDP. DKKI.LHLG~ ~~~~~
osmads3 QLQ....P. T...TLQLG~ ~~~~~
zmm23 LSAATNDPPT RMMKLRIFG~ ~~~~~
zmm2 QLQ....P. T...TLQLG~ ~~~~~
smads42a .HQ..... .EQTTLQLG~ ~~~~~
smads42d .HQ..... .EQTTLQLG~ ~~~~~
dal2 .HQ..... .EQTTLQLG~ ~~~~~
pinres0001 .HQ..... .EQTTLQLG~ ~~~~~
GBMADS2 .QQ..... .DQTALQLG~ ~~~~~
ggm3 .QQ..... .EQTALHLG~ ~~~~~
agl1 .Q..... .DQPPLQLV~ ~~~~~
agl5 .Q..... .DQPPLQLV~ ~~~~~
fbp6 .Q..... .DQTALQLV~ ~~~~~
pag11 .Q..... .DQTALQLV~ ~~~~~
nfbp6 .HD..... .DQTALQLV~ ~~~~~
ple .H..... .DQTALQLV~ ~~~~~
masako_c1 .RH..... .DQISLQLV~ ~~~~~
masako_c2 .RH..... .DQISLQLV~ ~~~~~
masako_c3 .RH..... .DQISLQLV~ ~~~~~
stag1 .CH..... .DQVSLQLV~ ~~~~~
mag .Q..... .EQTALQLG~ ~~~~~
masako_d1 QG.Q..... .NQTPLQLV~ ~~~~~
ag AGRQ..... .DQTALQLV~ ~~~~~
bag1 AGRE..... .DQTALQLV~ ~~~~~

```

```
ptag1 ..HQ..... .DQMALQLV~ ~~~~~ ~~~~~
ptag2 ..HE..... .DQLFS~~~~ ~~~~~ ~~~~~
camads1 ..RQ..... .DQMALQLV~ ~~~~~ ~~~~~
gaga1 ..CQ..... .DQTPQLV~ ~~~~~ ~~~~~
gaga2 ..CQ..... .DQTPQLV~ ~~~~~ ~~~~~
nag1 ..RQ..... .DQPSQLV~ ~~~~~ ~~~~~
pmads3 ..RQ..... .DQPPLQLV~ ~~~~~ ~~~~~
tag1 ..RQ..... .DQPPIQLV~ ~~~~~ ~~~~~
gag2 ..RQ..... .DQTALQLV~ ~~~~~ ~~~~~
far ..RQ..... .DQLPLQLV~ ~~~~~ ~~~~~
rap1 ..CQ..... .NQTPQLV~ ~~~~~ ~~~~~
slm1 ..RP..... .DQTTQLN~ ~~~~~ ~~~~~
```

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit –einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie 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. Heinz Saedler (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung: Molekulare Pflanzengenetik) betreut worden.

8.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heinz Saedler danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die sehr guten Arbeitsbedingungen und die wertvollen Anregungen für diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz danke ich für die Übernahme des Korreferats und das Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Günter Theißen für die Überlassung des Themas, die vielen immer hilfreichen Anregungen und die gute Betreuung während dieser Arbeit.

Christoph Weiser danke ich für die Arbeit an den GGM3-Interaktionen, die er im Rahmen seiner Diplomarbeit und im Zusammenhang mit diesem Doktorarbeitsprojekt gemacht hat.

Dörthe Ahlbory, Sebastian Neubert und Sonja Schmucker danke ich für die konstruktive Mitarbeit an der Arbeit im Rahmen verschiedener Praktika.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen bedanken.

Besonders herzlich danke ich meiner ganzen Familie und meinen Mitbewohnerinnen Chrissy, Pia, Katharina, Judith und Simone, sowie Andrea, Julia, Astrid und Toni, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

8.6 Lebenslauf

Name: Anna Charlotte Kirchner
Adresse: Gereonswall 46, D-50670 Köln
Geburtstag: 22.08.1972
Geburtsort: Heidelberg
Religion: evangelisch
Staatsangehörigkeit: deutsch

1978-1991 Schulausbildung

1978-1982 Grundschule Diemarden
 1982-1984 Bonifatiuschule II Göttingen
 1984-1991 Max-Planck-Gymnasium Göttingen
 24.05.1991 Abitur

1991-1992 Auslandsaufenthalt

Kinderbetreuung in Bologna, Italien

1992-1997 Universitätsausbildung

Biologiestudium (Diplom) an der Georg-August-Universität in Göttingen
 19.12.1997 Diplom

Diplomhauptfach: Entwicklungsbiologie
 Diplomnebenfächer: Immunologie
 Rechtswissenschaften (Öffentliches Recht)

Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie
 Thema: Charakterisierung eines corpus-allata exprimierten Gens aus *Drosophila melanogaster*

Seit 1998

Promotion am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik, Thema: Untersuchungen zum Funktionswandel der *AGAMOUS*-ähnlichen MADS-Box-Gene aus Samenpflanzen im Verlauf der Evolution

Publikationen

Kirchner, Ch., Kraetzner, R. und Welter-Schultes, F (1997). Flying snails: How far can *Truncatellina* (Pulmonata: Vertiginidae) be blown over the sea? *Journal of Molluscan Studies* **63**, 479-487.

Zinke, I., Kirchner Ch., Chao C. L., Tetzlaff M. T. und Pankratz M.J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of *pumpless*, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* **126**, 5275-5284.