

**Identifizierung von direkten Zielgenen des homöotischen  
Transkriptionsfaktors *DEFICIENS* aus *Antirrhinum majus*  
mittels Chromatin Immunopräzipitation**

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

**vorgelegt von**

**Bettina M. Müller  
aus Bochum**

**Köln 2003**

Berichterstatter:

Prof. Dr. Heinz Saedler

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln

Prof. Dr. Klaus Harter

Botanisches Institut der Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Die Blütenorganogenese als Modellbeispiel zur Analyse entwicklungsbiologischer Steuerungsprozesse	2
1.2	MADS-Box Transkriptionsfaktoren übernehmen Schlüsselfunktionen bei der Blütenorganogenese	5
1.3	Die B-Funktion wird durch einen autoregulatorischen Mechanismus kontrolliert	7
1.3.1	Protein-Protein Interaktionen als Modulatoren der B-Funktion	9
1.4	Identifizierung von <i>DEF</i> Zielgenen	12
1.4.1	Die Temperatur-sensitive <i>def-101</i> Mutante ermöglicht die Änderung der <i>DEF</i> Funktion <i>in vivo</i>	12
1.5	Die X-ChIP Technik zur Analyse von Protein-DNA Interaktionen	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	17
2.1	Bezugsquellen	
2.1.1	Chemikalien und sonstige Materialien	17
2.1.2	Enzyme	17
2.1.3	Radioisotope	18
2.1.4	Polyklonale anti-DEF und anti-GLO Seren	18
2.2	Lösungen und Medien	18
2.3	Bakterienstämme	18
2.4	Vektoren	19
2.5	Pflanzenmaterial	19
2.6	Aufreinigung von genomischer <i>Antirrhinum</i> DNA	19
2.7	Aufreinigung von Plasmid-DNA	20
2.8	Aufreinigung sehr geringer DNA-Mengen	20
2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	21

<b>2.10</b>	<b>Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	21
<b>2.11</b>	<b>Extraktion kernlokalisierter Proteine aus pflanzlichem Material</b>	22
<b>2.12</b>	<b>Western Blot und Dot Blot Analysen</b>	23
<b>2.13</b>	<b>Verwendung von rekombinanten pQE Expressionsvektoren zur Herstellung von <i>E. coli</i> exprimierten DEF und GLO Proteinen</b>	24
<b>2.14</b>	<b>Aufreinigung Histidin-markierter Proteine mittels Nickelchelat-Affinitätschromatographie</b>	25
<b>2.15</b>	<b>Herstellung polyklonaler anti-DEF und anti-GLO Seren</b>	25
<b>2.16</b>	<b>Überprüfung der anti-DEF und anti-GLO Seren</b>	26
<b>2.17</b>	<b>Klonierung von <i>DEF</i> und <i>GLO</i> Sequenzen in den pMAL-Vektor</b>	27
<b>2.18</b>	<b>Überexpression von MBP-Fusionsproteinen</b>	28
<b>2.19</b>	<b>Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie</b>	28
<b>2.20</b>	<b>Chromatin Immunopräzipitation aus quervernetztem Pflanzenmaterial</b>	31
2.20.1	Fixierung von Pflanzenmaterial	31
2.20.2	Extraktion von Zellkernen	32
2.20.3	Fragmentierung des Chromatins und Immunopräzipitation	32
2.20.4	Revertierung der Quervernetzungen und Aufreinigung der DNA	34
2.20.5	Bestimmung der eingesetzten Chromatinmenge (Input)	34
<b>2.21</b>	<b>PCR-Analysen</b>	34
<b>2.22</b>	<b>Klonierung von immunopräzipitierter DNA</b>	36
<b>2.23</b>	<b>Herstellung von Bakterienfiltern</b>	38
<b>2.24</b>	<b>Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden</b>	38
<b>2.25</b>	<b>Hybridisierung von Bakterienfiltern</b>	39
<b>2.26</b>	<b>Sequenzanalysen</b>	40
<b>2.27</b>	<b>Computer-gestützte Arbeiten</b>	40
<b>2.28</b>	<b>Sonstiges</b>	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	41
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der X-ChIP Technik in <i>Antirrhinum majus</i></b>	41
<b>3.2</b>	<b>Herstellung von polyklonalen anti-DEF und anti-GLO Seren</b>	44

<b>3.3</b>	<b>Analyse der <i>DEF</i> und <i>GLO</i> Promotoren auf eine <i>in vivo</i></b>	
	<b>Interaktion mit DEF/GLO</b>	47
3.3.1	<i>In vivo</i> Nachweis der Bindung von DEF/GLO an den <i>GLO</i> Promotor	48
3.3.2	Überprüfung einer direkten Interaktion des <i>DEF</i> Promotors mit DEF/GLO	51
<b>3.4</b>	<b>Überprüfung putativer <i>DEF</i> Zielgene auf eine <i>in vivo</i> Bindung</b>	
	<b>von DEF/GLO</b>	52
3.4.1	<i>DEFH125</i> - ein Pollen-spezifisch exprimierter MADS-Box Transkriptionsfaktor unterliegt einer direkten negativen Kontrolle durch DEF/GLO	54
3.4.2	X-ChIP Untersuchungen des <i>DEFH84</i> Promotors	57
3.4.3	X-ChIP Analyse des <i>MIXTA</i> Promotors	58
3.4.4	Identifizierung von direkten <i>DEF</i> Zielgenen mittels Kombination von Expression Profiling Daten und Chromatin Immunopräzipitationen	58
3.4.4.1	Die Expression des Gens <i>DEFTup1</i> unterliegt einer positiven direkten Kontrolle durch DEF/GLO	60
3.4.4.2	Überprüfung der Gene <i>DEFTdown2</i> und <i>DEFTdown3</i> auf eine direkte Interaktion mit DEF/GLO	61
<b>3.5</b>	<b>Herstellung von Bakterien Banken mit immunopräzipitierter</b>	
	<b>DNA zur Isolierung neuer <i>DEF</i> Zielgensequenzen</b>	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	67
<b>4.1</b>	<b>Methoden zur Identifizierung von <i>DEF</i> Zielgenen</b>	67
4.1.1	Die X-ChIP Technik zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen in Pflanzen	69
4.1.2	Die polyklonalen Seren anti-DEF D39/2 und anti-GLO GLO/2 zeigen eine spezifische Antigenerkennung	72
<b>4.2</b>	<b>Überprüfung der autoregulatorischen Mechanismen der späten</b>	
	<b><i>GLO</i> und <i>DEF</i> Expression</b>	72
4.2.1	DEF/GLO wirkt über eine direkte Interaktion mit dem <i>GLO</i> Promotor aktivierend auf die <i>GLO</i> Expression	73
4.2.2	Multimere Proteinkomplexe sind an der Bindung des <i>GLO</i> Promotors beteiligt	74
4.2.3	Diskussion möglicher Kontrollmechanismen der späten <i>DEF</i> Expression	76
4.2.4	Die späte Expression von <i>GLO</i> in <i>Antirrhinum</i> und <i>AP3</i> in <i>Arabidopsis</i> könnte durch ähnliche Regulationsmechanismen gesteuert werden	77

<b>4.3</b>	<b><i>DEFH125</i> wird durch DEF/GLO negativ reguliert</b>	78
<b>4.4</b>	<b>Die Kombination von Macroarray Daten und X-ChIP Technik führten zur Identifizierung eines direkten <i>DEF</i> Zielgens</b>	80
<b>4.5</b>	<b>Limitierungen der X-ChIP Technik</b>	83
4.5.1	Wahl der verwendeten Antikörper	83
4.5.2	Bedeutung von quantitativen Aspekten für die Chromatin Immunopräzipitation	84
4.5.3	Regulatorische Elemente können in Intronsequenzen lokalisiert sein	85
4.5.4	Das „Primer-Problem“	86
4.5.5	Unspezifisch erfasste DNA-Sequenzen behindern die Isolierung neuer <i>DEF</i> Zielgene	87
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	89
4.6.1	Expressionsanalysen zur Ergänzung der X-ChIP Daten	89
4.6.2	Die erfolgreiche Kombination von Expression Profiling Studien und X-ChIP Technik kann auf weitere Stadien und Organe ausgedehnt werden	89
4.6.3	Weiterentwicklungen der X-ChIP Technik zur Isolierung neuer <i>DEF</i> Zielgene	90
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Abstract</b>	92
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	92
<b>5.2</b>	<b>Abstract</b>	93
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	94
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	108
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungen</b>	108
<b>7.2</b>	<b>Verwendete Primer</b>	110
<b>7.3</b>	<b>Nomenklatur</b>	112
<b>7.4</b>	<b>Danksagung</b>	113
<b>7.5</b>	<b>Erklärung</b>	114

## 1 Einleitung

Die moderne Entwicklungsbiologie erforscht auf molekularbiologischer Ebene die Steuerungsprozesse, die der Entwicklung eines höheren Lebewesens zugrunde liegen. Höhere Organismen entwickeln sich aus einer einzelnen Ausgangszelle, der Zygote, zu komplex aufgebauten Individuen. Während dieser Entwicklung durchläuft der Organismus vielfältige Differenzierungsprozesse, wodurch er morphologisch und physiologisch umgestaltet wird. Zellen gleicher Funktion formen Gewebe, verschiedene Gewebe wiederum bilden spezialisierte Organe, die bestimmte Funktionen im Organismus ausüben.

Die für eine Spezies charakteristische Ausprägung von Organen an definierten Positionen innerhalb des Organismus folgt einem festgelegten Bauplan, der in der Zelle in Form der DNA gespeichert wird. Die in der DNA verschlüsselte genetische Information wird während der Zellteilung identisch kopiert und an die Tochterzellen weitergegeben. Daher ist die Entwicklung spezifischer taxonomischer Merkmale abhängig von der differentiellen Umsetzung der genetischen Information, die in allen Zellen eines Organismus gleich ist. Die Realisierung des genetischen Potentials unterliegt vielfältigen Kontrollmechanismen, die ein koordiniertes Zusammenspiel aller in die Entwicklung eines Lebewesens involvierten Faktoren steuern.

Gelegentlich treten Störungen in diesen Entwicklungsprozessen auf und es entwickeln sich Organe an Positionen innerhalb des Organismus, an denen normalerweise andere Organe gebildet werden. Dieses Phänomen wird sowohl an pflanzlichen als auch an tierischen Systemen seit Jahrhunderten beobachtet und Homöosis genannt (Bateson, 1894). Für die Entwicklungsbiologie sind derartige Mutationen von besonderem Interesse, weil auffällige phänotypische Änderungen durch den Verlust einer Genfunktion hervorgerufen werden. Dadurch lassen sich direkte Rückschlüsse auf die Funktion des betreffenden Gens ziehen.

## 1.1 Die Blütenorganogenese als Modellbeispiel zur Analyse entwicklungsbiologischer Steuerungsprozesse

Der Entwicklungszyklus einer angiospermen Pflanze beginnt mit dem Keimling, der aus einem Samenkorn entsteht. Nach einer Periode vegetativen Wachstums folgt die des reproduktiven Wachstums, in der sich der Blütenstand oder eine Blüte bildet. Innerhalb der Blüte erzeugen die reproduktiven Organe männliche und weibliche Keimzellen, durch deren Verschmelzung Zygoten entstehen und neue Samen gebildet werden. Eine geringe Anzahl undifferenzierter Zellen, das apikale Sproßmeristem, gliedert während der gesamten Wachstumsphase Zellen ab, die unterschiedliche Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse durchlaufen. Diese Zellen entwickeln sich während der vegetativen Wachstumsphase zu Blättern und Seitentrieben. Nach der Umschaltung vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum ändert das Apikalmeristem seine Identität und gliedert als florales Meristem Zellen ab, die sich zu Blütenorganen entwickeln.

Die angiosperme Blüte besteht aus morphologisch klar unterscheidbaren Organen, die unterschiedliche Funktionen während des reproduktiven Wachstums ausüben. Die Anordnung der Blütenorgane ist bei angiospermen Pflanzen prinzipiell vergleichbar und wird hier am Beispiel des Löwenmäulchens (*Antirrhinum majus*) beschrieben. Bei *Antirrhinum* werden die Blütenorgane in vier konzentrischen Kreisen (Blütenwirteln) angelegt. Im äußeren Blütenwirtel werden fünf Sepalen gebildet, die die Knospe während der Entwicklung vor äußeren Einflüssen schützen. Alternierend zu den Sepalen entwickeln sich im zweiten Wirtel fünf Petalen, die im basalen Bereich fusioniert sind. Sie wachsen zu der für Rachenblütler charakteristischen und oftmals auffällig gefärbten Blütenröhre aus, die der Insektenanlockung dient. Die sterilen Organe des ersten und zweiten Wirtels bilden den Perianth, der die reproduktiven Organe in den inneren Wirteln umschließt. Im dritten Wirtel werden die männlichen Reproduktionsorgane aus fünf Stamen angelegt, die aus dem Filament und den Pollen-tragenden Antheren aufgebaut sind. Das adaxial gelegene Stamen verkümmert kurz nach der Initiierung und wird als Stamenodium bezeichnet. Im Blütenzentrum, im vierten Wirtel, entwickelt sich das aus zwei verschmolzenen Karpellen bestehende weibliche Reproduktionsorgan, das Gynoeceum. Die Entwicklung derart unterschiedlicher Organe innerhalb eines eng

begrenzten Bereichs setzt eine räumlich und zeitlich exakt aufeinander abgestimmte Kontrolle einzelner Entwicklungsprozesse voraus und eignet sich daher hervorragend für das Studium regulatorischer Prozesse.

*Antirrhinum* bietet als Forschungsobjekt zahlreiche Vorteile im Vergleich zu anderen pflanzlichen Systemen. Die Größe der *Antirrhinum* Blüte erleichtert phänotypische Analysen und ermöglicht Wirtel- und Stadien-spezifisch Blütengewebe zu sammeln und für molekularbiologische Untersuchungen zu verwenden. Zudem hat *Antirrhinum* eine relativ kurze Generationsdauer von ca. drei bis vier Monaten und bietet die Möglichkeit der vegetativen Vermehrung. Jedoch ist die Transformation von *Antirrhinum* immer noch sehr zeit- und arbeitsintensiv.

Für Löwenmäulchen wurden schon Anfang des 20. Jahrhunderts homöotische Blütenmutanten beschrieben, in deren Blüten einzelne Organe veränderte Positionen einnahmen (Baur, 1924). Durch weitere Arbeiten von H. Stubbe wurde eine umfangreiche Kollektion mit über 450 Mutanten angelegt, die bis heute zu großen Teilen erhalten ist und für Forschungszwecke zur Verfügung steht (Stubbe, 1966).

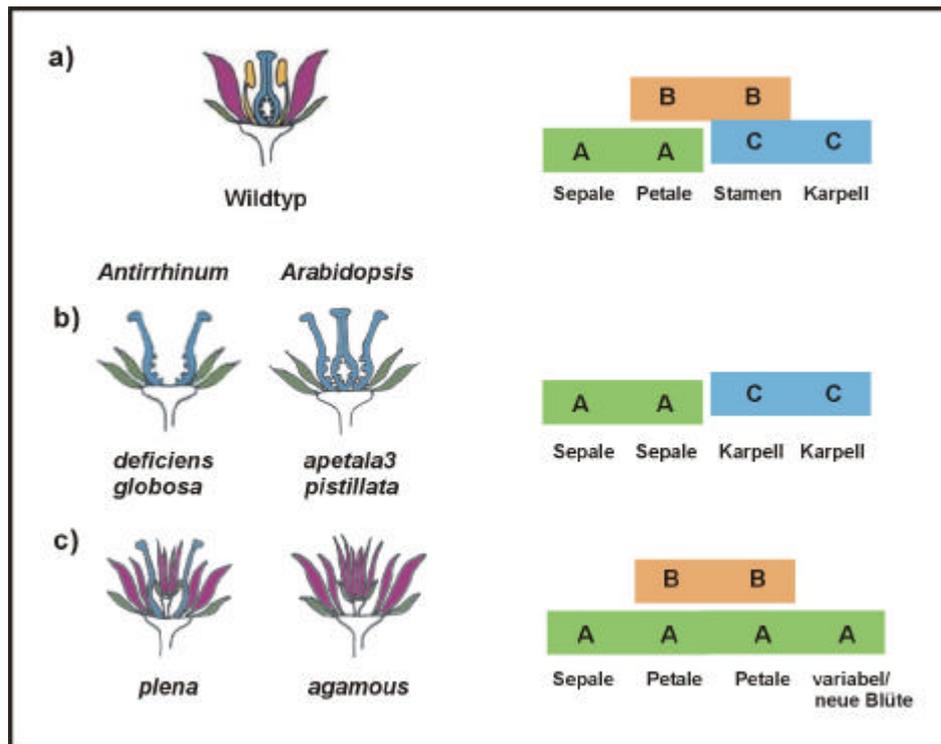
Die Untersuchung verschiedener homöotischer Blütenmutanten zeigte, daß der Funktionsverlust eines Gens häufig die homöotische Transformation von Blütenorganen in zwei benachbarten Wirteln bewirkt. Beispielsweise werden in der *deficiens* Mutante in *Antirrhinum* im zweiten Wirtel Sepalen anstelle von Petalen und im dritten Wirtel Karpelle anstelle von Stamina gebildet (Klemm, 1927). Vergleichende Studien homöotischer Blütenmutanten in *Antirrhinum* und *Arabidopsis* trugen maßgeblich zum Verständnis der genetischen und molekularen Grundlagen der Blütenorganogenese bei und führten zur Formulierung des ABC-Modells (Coen und Meyerowitz, 1991). Diesem Modell zufolge werden Organidentitätsgene in zwei benachbarten Wirteln ausgeprägt und können in drei Klassen (A, B, C) eingeteilt werden. Die Identität eines Blütenorgans wird durch die Aktivität der Gene einer Klasse oder durch die kombinatorische Aktivität von Genen aus zwei Klassen bestimmt. Abbildung 1.1 zeigt eine Illustration des ABC-Modells. Im ersten Wirtel führt die alleinige Ausprägung der Klasse A Gene zur Bildung von Sepalen. Die Entwicklung von Petalen im zweiten Wirtel unterliegt der kombinatorischen Kontrolle der Klasse A und der Klasse B Gene.

Die Kombination der B- und C-Funktionen im dritten Wirtel führt zur Bildung von Stamina. Die Entwicklung der Karpelle im vierten Wirtel wird von der C-Funktion bestimmt.

Jedoch können einige Beobachtungen an homöotischen Mutanten durch das Modell nicht erklärt werden. So führen Mutationen in den C-Funktionsgenen *PLENA (PLE)* in *Antirrhinum* und *AGAMOUS (AG)* in *Arabidopsis* zur Entwicklung weiterer Blütenorgane innerhalb des vierten (*Antirrhinum*) bzw. dritten (*Arabidopsis*) Wirtels (Bowman et al., 1991; Yanofsky et al., 1990; Bradley et al., 1993). Die Entwicklung von Sepalen und Petalen in den inneren Wirteln von *ple* und *ag* Mutanten ist auf eine Ausdehnung der A-Funktion zurückzuführen. Offenbar wird im Wildtyp durch die Ausprägung der Klasse C Gene die Expression der Klasse A Gene im dritten und vierten Wirtel unterdrückt. Somit üben die C-Funktionsgene zusätzlich zur Bestimmung der Organidentität des dritten und vierten Wirtels eine Terminationsfunktion aus, die das unendliche Wachstum des floralen Meristems verhindert (Coen und Meyerowitz, 1991).

Studien an homöotischen Mutanten unterschiedlicher Pflanzenspezies zeigten, daß die grundlegenden Mechanismen der Blütenmorphogenese in verschiedenen Spezies konserviert sind (Davies und Schwarz-Sommer, 1994). Dennoch existieren hinsichtlich der A-Funktion einige Spezies-spezifische Unterschiede. So wurden für *Antirrhinum* (und andere Spezies, z.B. Petunie) keine rezessiven Klasse A Mutanten beschrieben (Maes et al., 2001; Keck et al., 2003; Schwarz-Sommer et al., 1990 und 2003). Auch die Anzahl der B- und C-Funktionsgene ist in verschiedenen Spezies variabel: während in *Arabidopsis* nur das C-Funktionsgen *AG* existiert, wurden in *Antirrhinum* zwei Klasse C Gene identifiziert: *PLE* und *FARINELLI (FAR)* (Davies et al., 1996; Davies et al., 1999).

Aus Petunie wurden Organidentitätsgene isoliert, die die Entwicklung von Ovulen im vierten Wirtel bestimmen und als Klasse D Gene bezeichnet werden (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des ABC-Modells der Blütenentwicklung**

- a) Drei Klassen homöotischer Gene (A, B, C) bestimmen die Organidentität in den vier Blütenwirteln. Im Wildtyp werden durch die kombinatorische Aktion dieser Gene im ersten Wirtel Sepalen, im zweiten Petalen, im dritten Stamina und im vierten Wirtel Karpelle gebildet.
- b), c) Der Verlust der B- oder C-Funktion führt zur homöotischen Umformung von Blütenorganen, wie sie unter den graphischen Darstellungen angegeben sind. Die Blütendiagramme veranschaulichen die Phänotypen der entsprechenden *Antirrhinum* und *Arabidopsis* Nullmutanten. Die betroffenen Gene sind angegeben.

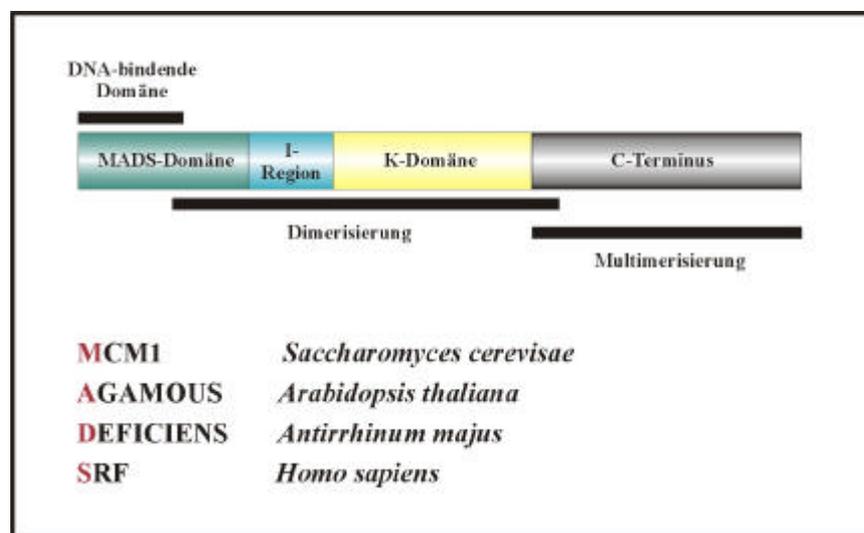
Die A-Funktion wurde versetzt eingezeichnet, um anzudeuten, daß bislang in vielen Spezies kein Klasse A Gen identifiziert wurde. (nach Coen und Meyerowitz, 1991, und Davies und Schwarz-Sommer, 1994, verändert; weitere Referenzen siehe Text)

## 1.2 MADS-Box Transkriptionsfaktoren übernehmen Schlüsselfunktionen bei der Blütenorganogenese

Die meisten der in die Blütenorganogenese involvierten Gene gehören zur Familie der MADS-Box Transkriptionsfaktoren. Der Name dieser Transkriptionsfaktorfamilie leitet sich von den vier zuerst isolierten MADS-Box Genen ab (Schwarz-Sommer et al., 1990): *MINICHROMOSOMAL MAINTENANCE 1* (*MCMI*, Hefe), *AGAMOUS* (*AG*,

Ackerschmalwand), *DEFICIENS* (*DEF*, Löwenmäulchen) und *SERUM RESPONSE FAKTOR* (*SRF*, Mensch) (Passmore et al., 1989; Yanofsky et al., 1990; Sommer et al., 1990; Norman et al., 1988). Charakteristikum der MADS-Domäne Transkriptionsfaktoren ist eine konservierte N-terminale, etwa 60 Aminosäuren umfassende DNA-bindende Domäne, die MADS-Domäne. Sie ermöglicht die Bindung von *cis*-Elementen mit der Konsensussequenz CC(A/T)<sub>6</sub>GG (CArG-Box; Pollock und Treisman, 1991). Jedoch binden unterschiedliche MADS-Box Transkriptionsfaktoren bevorzugt Motive, die geringfügig von der Konsensussequenz abweichen. Der Myocyte Enhancer Factor 2 (Mef2) des Menschen bindet an ein A/T-reiches Element CTA(A/T)<sub>4</sub>TAG (Pollock und Treisman, 1991). Ein ähnliches DNA-Motiv wird vom MADS-Box Transkriptionsfaktor *AGAMOUS-LIKE 15* (*AGL15*) aus *Arabidopsis* gebunden (Tang und Perry, 2003).

Phylogenetische Analysen der über 100 MADS-Domäne Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* führten zur Einteilung der pflanzlichen MADS-Domäne Proteine in zwei



**Abbildung 1.2: Struktur pflanzlicher MADS-Domäne Proteine vom TypII**

Die verschiedenen Domänen pflanzlicher MADS-Domäne Proteine sind dargestellt und die Funktionen einzelner Domänen angegeben. Die Bezeichnung MADS-Box wurde aus den Anfangsbuchstaben der vier zuerst isolierten MADS-Box Transkriptionsfaktoren abgeleitet.

(nach Jack, 2001a, verändert)

Gruppen, die sich hinsichtlich der Aminosäuresequenz innerhalb der MADS-Domäne unterscheiden (Parenicová et al., 2003; Alvarez-Buylla et al., 2000; Ng und Yanofsky, 2001). Die in der MADS-Domäne stark dem SRF ähnelnden Typ I MADS-Domäne Proteine besitzen keine K-Domäne (s.u.) und wurden bisher funktionell noch nicht charakterisiert. Die Mehrzahl der pflanzlichen MADS-Domäne Transkriptionsfaktoren gehört dem Typ II an, dessen MADS-Domäne stark dem tierischen Myocyte Enhancer Factor 2 (Mef2) ähnelt.

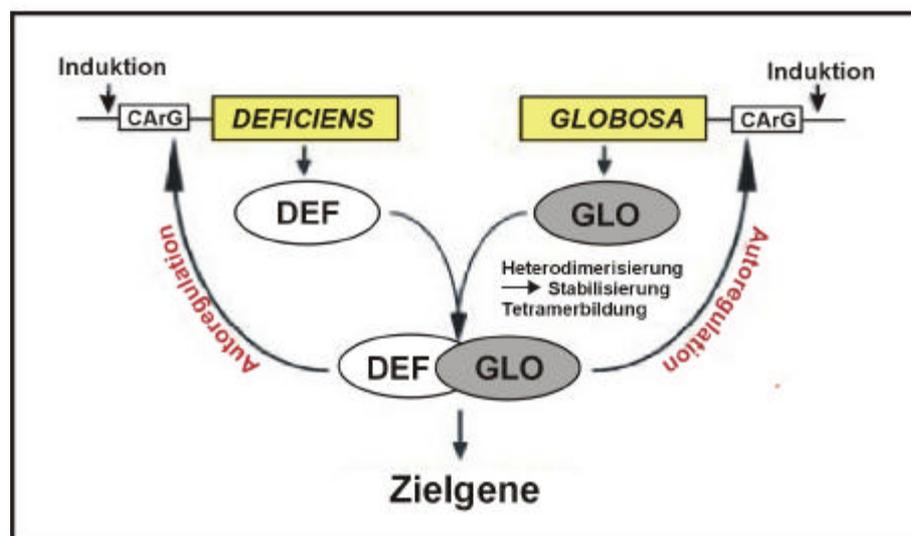
Typ II MADS-Box Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine stereotypische Anordnung distinkter Domänen aus (MIKC, Münster et al., 1997; Shore und Sharrocks, 1995; Riechmann und Meyerowitz, 1997; Jack, 2001a). Die N-terminal lokalisierte MADS-Domäne geht in einen nur schwach konservierten Bereich von etwa 30 Aminosäuren über, die als I-Domäne (intervening) bezeichnet wird. Die an die I-Domäne anschließende, für pflanzliche MADS-Domäne Proteine charakteristische und ungefähr 70 Aminosäuren lange K-Domäne besitzt hydrophobe Aminosäuren in regelmäßigen Abständen und bildet zwei bis drei amphipathische  $\alpha$ -Helices aus, die eine dem Keratin ähnliche coiled-coil Struktur bilden können. Diese Domäne ist maßgeblich bei der Dimerisierung pflanzlicher MADS-Domäne Proteine beteiligt (Ma et al., 1991; Riechmann und Meyerowitz, 1997; Yang et al., 2003). Der in der Länge und Aminosäurezusammensetzung variable C-Terminus interagiert mit weiteren MADS-Domäne Proteinen, die die Spezifität der DNA-Bindung beeinflussen (Egea-Cortines et al., 1999). In einigen MADS-Domäne Proteinen ist in diesem Bereich eine Transaktivierungsdomäne lokalisiert (Davies et al., 1996; Honma und Goto, 2001).

### **1.3 Die B-Funktion wird durch einen autoregulatorischen Mechanismus kontrolliert**

In *Antirrhinum* existieren die zwei Klasse B Gene *DEFICIENS* (*DEF*) und *GLOBOSA* (*GLO*), die überwiegend im zweiten und dritten Wirtel exprimiert werden (Sommer et al., 1990; Schwarz-Sommer et al., 1992; Trübner et al., 1992). Ein Verlust der *DEF* oder der *GLO* Funktion führt zu der homöotischen Umformung von Petalen zu Sepalen und von Stamina zu Karpellen. Die Ausprägung identischer mutanter Phänotypen

zeigte, daß *DEF* und *GLO* vermutlich in den gleichen Kontrollmechanismus involviert sind (Schwarz-Sommer et al., 1992; Tröbner et al., 1992; Zachgo et al., 1995). Die Expression der *DEF* und *GLO* Gene wird früh in der Blütenorganogenese initiiert und in Abhängigkeit von den *DEF* und *GLO* Genprodukten in späteren Entwicklungsstadien aufrechterhalten und sogar verstärkt (Schwarz-Sommer et al., 1992; Tröbner et al., 1992).

CAR-G-Box Motive in den *DEF* und *GLO* Promotoren führten zu der Annahme, daß der autoregulatorische Mechanismus der späten *DEF* und *GLO* Expression durch eine direkte Bindung von DEF/GLO Heterodimeren an diese Sequenzen vermittelt wird (Schwarz-Sommer et al., 1992). Diese Annahme wurde durch den Nachweis einer *in vitro* Interaktion von DEF/GLO Heterodimeren mit diesen Motiven bekräftigt (Tröbner et al., 1992).



**Abbildung 1.3: Schema einer möglichen autoregulatorischen Kontrolle der späten *DEF* und *GLO* Expression**

Die *DEFICIENS* und *GLOBOSA* Gene sind schematisch, die DEF und GLO Proteine als Ellipsen dargestellt. Nach der Induktion der *DEF* und *GLO* Expression interagieren die DEF und GLO Proteine und bilden hetero- oder multimere Komplexe. Die Komplexe binden an CAR-G-Box Motive in den *DEF* und *GLO* Promotoren, wodurch die Expression dieser Gene verstärkt und aufrechterhalten wird.

(aus Tröbner et al., 1992, verändert)

In *Arabidopsis* wurde die autoregulatorische Kontrolle der Klasse B Funktion durch die orthologen Gene *APETALA3* (*AP3*) und *PISTILLATA* (*PI*) bestätigt (Jack et al., 1992 und 1994; Goto und Meyerowitz, 1994; Krizek und Meyerowitz, 1996; Samach et al., 1997).

### 1.3.1 Protein-Protein Interaktionen als Modulatoren der B-Funktion

Die Spezifizierung floraler Organe hängt von der kombinatorischen Aktion pflanzlicher MADS-Box Proteine ab, die das Schicksal einzelner Zellen während der Differenzierung bestimmen. Daher ist es zum Verständnis der Funktion pflanzlicher MADS-Box Transkriptionsfaktoren unerlässlich, das Netzwerk der Protein-Protein Interaktionen, das zwischen den MADS-Box Proteinen selbst und weiteren Faktoren besteht, zu analysieren (Davies et al., 1996).

Der Verlust der Genfunktionen der *DEF* und *GLO* Orthologen in *Arabidopsis*, *AP3* und *PI*, führt zu homöotischen Transformationen der Blütenorgane im zweiten und dritten Blütenwirtel. Diese Transformationen sind mit den Phänotypen der *def* und *glo* Nullmutanten vergleichbar (Jack et al., 1992; Goto und Meyerowitz, 1994). Durch die Überexpression der beiden Klasse B Gene *AP3* und *PI* in *Arabidopsis* entwickeln sich Petalen in den beiden äußeren und Stamina in den beiden inneren Wirteln. Diese homöotischen Transformationen erfolgen jedoch nur im floralen Kontext, nicht in vegetativen Geweben (Krizek und Meyerowitz, 1996). Offenbar sind nur innerhalb der Blüte zusätzliche, für die Ausübung der *AP3* und *PI* Funktionen signifikante Faktoren vorhanden. In *Arabidopsis* wurden drei weitere MADS-Box Transkriptionsfaktoren identifiziert, die maßgeblich zur Spezifizierung floraler Organe beitragen. Diese Gene (*SEPALLATA1*, *SEPALLATA2* und *SEPALLATA3*; *SEPI*, 2 und 3) werden überwiegend in den drei inneren Wirteln exprimiert (Mandel und Yanofsky, 1998; Ma et al., 1991; Flanagan und Ma, 1994; Savidge et al., 1995). Der Funktionsverlust einzelner *SEP* Gene hat nur schwache Auswirkungen auf den Phänotyp. Jedoch führt die Kombination der *sep1*, *sep2* und *sep3* Allele in *sepallata* Dreifach-Mutanten zu einer drastischen Änderung des Phänotyps: alle Blütenorgane dieser Mutante werden als Sepalen ausgeprägt. Zudem zeigen die Blüten ein unendliches Wachstum weiterer Blütenwirtel

(Pelaz et al., 2000). Folglich kommt diesen Genen eine entscheidende Bedeutung bei der Kontrolle der floralen Organidentität zu. Die *SEP* Gene repräsentieren eine weitere Klasse homöotischer Gene und werden als Klasse E Gene bezeichnet (Theissen und Saedler, 2001).

In *Antirrhinum* wurden drei Klasse E Gene identifiziert: *DEFH200*, *DEFH72* und *DEFH84*. Diese MADS-Box Gene zeigen untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit und werden in Bereichen der Blüte exprimiert, die mit den Organidentitätsgenen der Klassen B und C teilweise überlappen (Davies et al., 1996; Davies et al., 1999; P. Huijser und S. Zachgo, unveröffentlichte Daten). Für einige dieser Proteine wurden in Hefesystemen Interaktionen mit den Klasse C Proteinen PLE und FAR nachgewiesen (Davies et al., 1996; Davies et al., 1999).

Interaktionen zwischen den *Arabidopsis* MADS-Domäne Proteinen AP1 (Irish und Sussex, 1990; Mandel et al., 1992), AP3/PI, AG und SEP3 wurden in Hefesystemen untersucht und Interaktionen zwischen dem AP3/PI Heterodimer und AP1 bzw. SEP3 Proteinen nachgewiesen. In transgenen *Arabidopsis* Pflanzen führt die ektopische Expression der Organidentitätsgene *AP3* und *PI* zusammen mit *API* oder *SEP3* in *Arabidopsis* zu einer homöotischen Transformation von vegetativen Organen zu Petalen-ähnlichen Strukturen. Die kombinatorische ektopische Expression des Klasse C Gens *AG* mit *AP3*, *PI* und *SEP3* in *Arabidopsis* bewirkt die Umformung vegetativer Organe in Stamina-ähnliche Strukturen. Offenbar bestimmen die *SEPALLATA* Gene in Kombination mit den Klasse A, B und C Genen die Organidentität in der Blüte (Honma und Goto, 2001; Theissen und Saedler, 2001; Jack, 2001b). Die unvollständige Umformung der vegetativen Organe weist auf weitere Faktoren hin, die zusammen mit den Organidentitätsgenen die Bildung floraler Strukturen steuern.

Folglich übernehmen die SEP Proteine in *Arabidopsis* und die funktional homologen Faktoren in *Antirrhinum* wahrscheinlich grundlegende Funktionen bei der Entwicklung floraler Organe, die auf Interaktionen der ABC Proteine mit den Klasse E Proteinen begründet sind.

Für MADS-Box Transkriptionsfaktoren aus Hefe und Mensch sind zahlreiche Interaktionen mit nicht-MADS-Domäne Proteinen bekannt, die zu einer geänderten DNA-Bindungsspezifität führen und eine Funktionsänderung der MADS-Box Transkriptionsfaktoren hervorrufen (Sparrow et al., 1999; Dagleish und Sharrocks, 2000). Durch die Interaktion von MCM1 aus Hefe mit verschiedenen Cofaktoren in einem 80 Aminosäuren langen, die MADS-Domäne umfassenden Bereich des MCM1 Proteins wird die spezifische DNA-Bindung unterschiedlicher Zielsequenzen ermöglicht (Mead et al., 2002). Die Interaktionen zwischen MCM1 und den Homöodomäne Proteinen YOX1 und YHP1 führen dazu, daß MCM1 einen reprimierenden Effekt auf die Transkription Zellzyklus-spezifisch exprimierter Gene ausübt (Pramila et al., 2002).

In Pflanzen wurden bisher erst zwei Interaktionen von MADS-Domäne Proteinen und nicht-verwandten Faktoren nachgewiesen. Das MADS-Domäne Protein AG aus *Arabidopsis* interagiert mit einem Leucine-rich Repeat und einem sauren Phosphatase-Protein-Komplex. Die Signifikanz dieser Interaktionen für die AG Funktion ist jedoch noch nicht geklärt (Gamboa et al., 2001). OsMADS18, ein MADS-Box Transkriptionsfaktor aus Reis, interagiert mit dem Histon-Fold Protein NF-YB\*. Diese Interaktion vermittelt die MADS-Domäne zusammen mit dem daran anschließenden, etwa 20 Aminosäuren langen Bereich und aktiviert so vermutlich Zielgene (Masiero et al., 2002).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die grundlegenden Kontrollmechanismen der Blütenorganogenese auf Interaktionen zwischen den MADS-Domäne Proteinen der Klassen A, B, C und E beruhen und die DNA-Bindungsspezifität und Funktion vermutlich durch die Interaktion mit nicht-MADS-Domäne Proteinen modifiziert wird. Während die DEF und GLO Proteine ihre DNA-Bindungsaktivität durch die Heterodimerisierung erlangen, wird die Spezifität der DNA-Bindung von multimeren Proteinkomplexen bestimmt. Um diesen Sachverhalt hervorzuheben und dennoch sprachlich zu vereinfachen, werden Proteinkomplexe, die heterodimere DEF/GLO Proteine enthalten, im folgenden als DEF/GLO bezeichnet.

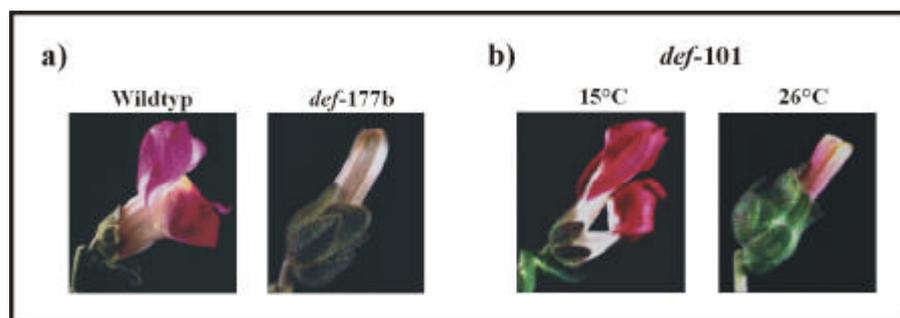
## 1.4 Identifizierung von *DEF* Zielgenen

Um eine Verknüpfung von homöotischer Genaktivität und den daraus resultierenden morphologischen Änderungen herstellen zu können, ist es erforderlich, die von einem Transkriptionsfaktor regulierten Zielgene zu identifizieren. Mit dieser Zielsetzung sollen die von *DEF* ausgeübten regulatorischen Funktionen geklärt werden. CArG-Box Elemente in Promotorbereichen putativer Zielgene sind indikativ, aber nicht ausschlaggebend für eine Regulation durch MADS-Box Transkriptionsfaktoren. Zudem können die Sequenzen von CArG-Box Elementen relativ variabel sein, was eine Abschätzung der Relevanz bestimmter CArG-Box Motive erschwert. Im *Arabidopsis* Genom wurde in den Positionen – 1 bis – 3000 aller bekannter Promotoren eine zufällige Anordnung putativer CArG-Box Motive festgestellt. Daher können Zielgene von MADS-Box Transkriptionsfaktoren nicht durch den *in silico* Nachweis von CArG-Box Motiven identifiziert werden (Bey et al., 2002).

### 1.4.1 Die Temperatur-sensitive *def-101* Mutante ermöglicht die Änderung der *DEF* Funktion *in vivo*

Die Ausprägung des *def-101* Phänotyps ist abhängig von den Kultivierungsbedingungen. In der permissiven Temperatur (15°C) wird die Funktion des DEF Proteins nur geringfügig beeinträchtigt und es werden Petalen und Stamina gebildet, die denen des Wildtyps ähneln. In der nicht-permissiven Temperatur (26°C) führt die Mutation zur Bildung eines Phänotyps, der identisch mit den *def* und *glo* Nullmutanten ist. Die molekularbiologische Analyse des *def-101* Allels zeigte, daß der Temperatur-sensitive Effekt durch die Deletion eines Lysins im Bereich der ersten putativen amphipathischen  $\alpha$ -Helix der K-Domäne verursacht wird. Dies führt zu einer Destabilisierung des DEF/GLO Komplexes und somit zu einem Verlust der DNA-Bindungsaktivität (Schwarz-Sommer et al., 1992; Zachgo et al., 1995). Diese Mutation ermöglicht es, *in vivo* die *DEF* Funktion durch die Kultivierung der *def-101* Mutante in verschiedenen Temperaturen zu beeinflussen.

Mittels Expression Profiling Studien können Expressionsänderungen einer großen Anzahl von Genen als Antwort auf einen bestimmten Stimulus oder in Abhängigkeit einer Genaktivität analysiert werden. Für *Antirrhinum* wurde eine EST (expressed sequence tag) Kollektion, die ungefähr 11600 Einzelgene umfaßt, hergestellt und zur Produktion von Macroarrays verwendet (Z. Schwarz-Sommer, H. Sommer, S. Zachgo, persönliche Mitteilung). Petalen der Temperatur-sensitiven *def-101* Mutante, bei denen die *DEF* Funktion *in vivo* für unterschiedlich lange Zeiträume abgeschaltet wurde, wurden zur Herstellung von Sonden eingesetzt und die Macroarrays auf differenziell exprimierte Gene durchmustert. Durch diese Untersuchungen wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Expression durch die Reduktion der *DEF* Funktion positiv oder negativ beeinflusst wurden (M. Bey, persönliche Mitteilung). Mittels Expression Profiling Studien wurden direkte und indirekte *DEF* Zielgene isoliert. Jedoch kann mit dieser Technik keine direkte Bindung eines Transkriptionsfaktors an regulatorische Elemente der Zielgene nachgewiesen werden. Die Schnelligkeit, mit der die Zielgenexpression auf die veränderte *DEF* Funktion reagiert, ist nur ein Hinweis auf eine mögliche direkte Transkriptionskontrolle. Zur Identifizierung direkter *DEF* Zielgene muß diese Methode mit weiteren Techniken kombiniert werden.



**Abbildung 1.4: Phänotypische Ausprägung der *def-101* Mutation unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen**

- a) Blüten von *Antirrhinum* Wildtyp und *def* Nullmutanten (*def-177b*) Linien. Die *def* Mutation resultiert in der homöotischen Transformation von Petalen zu Sepalen und in der Bildung eines zentralen fusionierten karpelloiden Organs.
- b) In der permissiven Temperatur (15°C) ähneln die Blüten von *def-101* Pflanzen denen des Wildtyps. Durch Kultivierung der Pflanzen in der nicht-permissiven Temperatur (26°C) werden morphologische Änderungen hervorgerufen, die mit der *def* Nullmutante vergleichbar sind.

Es wurden bereits einige potentielle *DEF* Zielgene durch unterschiedliche Versuchsansätze isoliert. Beispielsweise zeigten genetische Analysen verschiedener *def* Allele, daß die Transkription des Myb-Transkriptionsfaktor *MIXTA* vermutlich von *DEF* abhängig ist (Noda et al., 1994; Martin et al., 2002). Weitere mutmaßliche *DEF* Zielgene wurden beispielsweise aus subtrahierten cDNA-Banken unter Verwendung von *def-101* Blütenmaterial isoliert und werden später noch ausführlich behandelt.

### 1.5 Die X-ChIP Technik zur Analyse von Protein-DNA Interaktionen

Die meisten entwicklungsbiologischen Prozesse werden auf transkriptioneller Ebene durch die Assoziation eines transaktiven Faktors mit bestimmten *cis*-Elementen zu einem definierten Zeitpunkt reguliert. Die X-ChIP Technik (Cross-linked Chromatin Immunopräzipitation, auch als Chromatin Immunopräzipitation oder ChIP bezeichnet) basiert auf der kovalenten Bindung von Proteinen an DNA-Sequenzen im lebenden Gewebe und der anschließenden Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen. So wird der Nachweis von Proteinen an ihre DNA-Bindungsstelle *in vivo* ermöglicht (Strutt et al, 1997; Orlando, 2000; Kuo und Allis, 1999). Diese Technik wird zunehmend zur Charakterisierung von DNA-Protein Interaktionen eingesetzt und gestattete bereits interessante Einsichten in die Funktionsweise transaktiver Faktoren im chromosomalen Kontext. Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden, die zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen eingesetzt werden (z.B. Gelretardierungsassays), liegt in der Betrachtung eines *in vivo* Szenarios. Es sind alle Faktoren vorhanden, die für die Bindung eines Faktors an eine bestimmte DNA-Sequenz ausschlaggebend sind.

Diese bisher überwiegend an tierischen Organismen und Hefen durchgeführten Studien trugen wesentlich zum Verständnis der Funktionsweise unterschiedlicher DNA-bindender Proteine bei. So konnten beispielsweise dynamische Änderungen in der Aktivität der Polycomb Proteine in *Drosophila* während der frühen Embryogenese aufgezeichnet werden. Das erlaubte Rückschlüsse auf den Mechanismus, der einer Reprimierung homöotischer Gene durch diese Faktoren zugrunde liegt (Breiling et al., 2001; Strutt et al., 1997; Orlando et al., 1998). In Hefe wurde durch die Verwendung

dieser Technik der Einfluß der SIR Proteine auf die Bildung heterochromosomaler Bereiche an den Telomeren geklärt (Strahl-Bolsinger et al., 1997).

Die Abfolge der experimentellen Schritte der X-ChIP Technik wird im folgenden kurz erläutert. Durch eine chemische Reaktion mit Formaldehyd werden im Gewebe Proteine kovalent mit den assoziierten DNA-Sequenzen verknüpft. Die kovalente Bindung von Proteinen an die DNA verhindert die Dissoziation der transaktiven Faktoren von ihren DNA-Bindungsstellen während weiterer Versuchsschritte. Das fixierte Chromatin wird extrahiert und mechanisch durch die Behandlung mit Ultraschallwellen in kürzere Fragmente gespalten und in Lösung gebracht. Die Immunopräzipitation mit einem Antikörper oder einem Antiserum gegen das zu untersuchende Protein führt zur Anreicherung des Proteins zusammen mit den kovalent gebundenen DNA-Sequenzen. Nach der Spaltung der Quervernetzungen kann die immunopräzipitierte DNA mittels PCR-Analyse auf die Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen untersucht oder als Substrat für Klonierungen eingesetzt werden (Übersicht in Orlando et al., 1997).

Die Analyse von Protein-DNA Interaktionen durch Chromatin Immunopräzipitationen aus pflanzlichem Material findet zunehmend Verwendung. Im Gegensatz zu tierischen Zellen sind pflanzliche Zellen von einer festen Zellwand umgeben, die stabilisierende und schützende Funktionen ausübt. Daher ist pflanzliches Chromatin für die Fixierung nicht so gut zugänglich wie beispielsweise in menschlichen Zellkulturen oder in Hefen. Diese Gegebenheit muß bei der Durchführung von X-ChIP Experimenten mit pflanzlichem Material berücksichtigt werden.

In Pflanzen wurde die X-ChIP Technik angewandt, um die Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Dafür wurde das präzipitierte Chromatin entweder durch PCRs auf eine Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen untersucht oder für Klonierungen eingesetzt mit dem Ziel, bislang noch unbekannt Zielsequenzen zu isolieren (Ito et al., 1997; Johnson et al., 2001; Zhang et al., 2001; Gendrel et al., 2002; Wang et al., 2002).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Um zum Verständnis der *DEF* Funktion beizutragen, sollten direkte Zielgene identifiziert werden. Hierfür wurde die X-ChIP Technik in *Antirrhinum* etabliert und die Versuchsbedingungen an unterschiedliches pflanzliches Ausgangsmaterial angepaßt. Mit dieser Technik wurden putative *DEF* Zielgene, die mutmaßliche DEF/GLO Bindungsstellen enthalten, auf eine *in vivo* Interaktion mit DEF/GLO untersucht. Zur Isolierung weiterer, noch unbekannter *DEF* Zielgene wurden immunopäzipitierte DNA-Fragmente kloniert und zur Herstellung von Bakterien Banken eingesetzt. Diese Banken wurden auf die spezifische Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellen

#### 2.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz), Bio-Rad Laboratories GmbH (München) und Becton Dickinson (Sparks, MD, USA) geliefert. Protein A Sepharose (Immunopure Immobilized Protein A, Pierce) und Protein Desalting Columns (Pierce) lieferte die Firma Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn). TOPO TA pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO Klonierungsvektor wurde von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe), pMAL-c2X Vektor von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München), ECL Chemiluminescence Western Blotting Reagenzien, Esel anti-Kaninchen HRP-konjugierte Antikörper, NHS-aktivierte Sepharose Säulen (HiTrap NHS-activated HP) und Hybond N+ Membranen von der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg), Amylose Resin von der Firma New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M. und Protran Nitrocellulose Transfer Membranen von der Firma Schleicher & Schuell (Dassel) bezogen. Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen Ltd., Paisley, Großbritannien, geliefert. Von der Firma Qiagen GmbH (Hilden) wurden MinElute PCR Purification Kit, Plasmid MIDI Kit, Gel extraction Kit und Nickel-Agarose bezogen. Nucleospin Säulen wurden von der Firma Macherey und Nagel GmbH (Düren) geliefert. Amicon Ultra Säulen und Dialyseplättchen wurden von der Firma Millipore GmbH (Eschborn) bezogen. Dialyseschläuche lieferten die Firmen Visking Ltd. (London, England) und Serva GmbH (Heidelberg). MOnyl Nylonnetze wurden von der Firma Hydro-Bios GmbH (Kiel) bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.), Promega GmbH (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden)

und Stratagene GmbH (Heidelberg) bezogen. LA Taq Polymerase wurde von der Firma Takara (Shiga, Japan, über Boehringer Ingelheim, Heidelberg) geliefert.

### 2.1.3 Radioisotope

[ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]-dCTP mit einer Aktivität von 92 TBq/mmol wurde von der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, geliefert.

### 2.1.4 Polyklonale anti-DEF und anti-GLO Seren

Anti-DEF und anti-GLO Seren wurden von der Firma Pineda Antikörper-Service, Berlin, hergestellt.

## 2.2 Lösungen und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Lösungen und Medien nach Sambrook et al., 1989 und Sambrook und Russell, 2001, oder nach Herstellerangaben angesetzt.

## 2.3 Bakterienstämme

M15[pREP4] (Villarejo und Zabin, 1974)

NaI<sup>s</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>

SG13009[pREP4] (Gottesman et al., 1981)

NaI<sup>s</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>

Dh10 $\beta$  (Grant et al., 1990; Blumenthal, 1986; Donahue und Bloom, 1998)

F, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK* $\lambda^-$ , *rpsL*, *nupG*

## 2.4 Vektoren

Expressionsvektoren:

pQE Qiagen GmbH (Hilden)

pMAL-c2X New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.

Plasmidvektor:

TOPO TA pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.5 Pflanzenmaterial

Es wurden Infloreszenzen und einzelne Blütenorgane der *Antirrhinum* Wildtyp-Linie 165E sowie der *def* Nullmutante *defb-177* und der *glo* Nullmutante *glo-3D* verwendet. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22°C und 16 Stunden Belichtungsdauer gezogen oder im Freiland kultiviert.

## 2.6 Aufreinigung von genomischer *Antirrhinum* DNA

Genomische *Antirrhinum* DNA wurde modifiziert nach Doley und Doley, 1990, aufgereinigt. Nach der Degradation der RNA wurde die DNA mit dem DNeasy Plant Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Genomische *Antirrhinum* DNA wurde von Frau Dr. Zs. Schwarz-Sommer zur Verfügung gestellt.

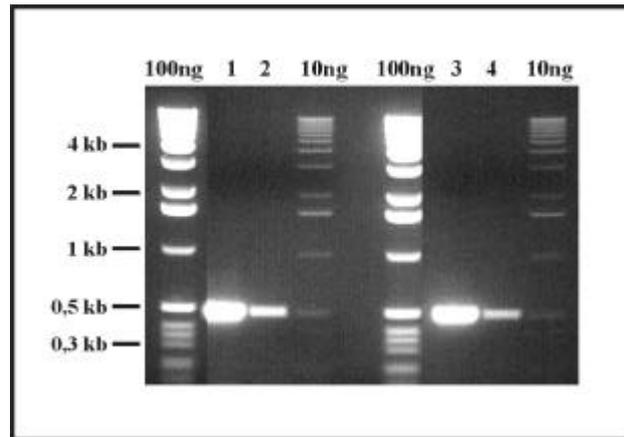
## 2.7 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem Qiagen Plasmid Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers extrahiert (Qiagen GmbH, Hilden).

## 2.8 Aufreinigung sehr geringer DNA-Mengen

Die Aufreinigung sehr geringer DNA-Mengen (Aufreinigung von DNA im fg-Bereich möglich) erfolgte mit den MinElute Säulen der Firma Qiagen GmbH (Hilden). Dieses Protokoll wurde für die Aufreinigung von immunpräzipitierter DNA verwendet.

Der gelieferte Bindungspuffer (PB) ist nur für kleine Probenvolumina geeignet, da 1 Probenvolumen mit 5 Volumen Bindungspuffer gemischt wird. Für größere Probenvolumina (450  $\mu$ l – 900  $\mu$ l) wurde ein Bindungspuffer angesetzt, von dem nur 2/3 des Ausgangsvolumens der Reaktion zugesetzt werden müssen. Die DNA-Lösung wurde durch die Zugabe von 2/3 Volumen 3 M Guanidiniumchlorid (gelöst in 80 % Isopropanol) und Einstellen des pH-Wertes auf  $\sim$  6,5 (Zugabe von ca. 7,5  $\mu$ l 2 M Natrium-Acetat, pH 4,0/450  $\mu$ l Ausgangsvolumen) an Bindungsbedingungen angepasst. Die Lösung wurde auf eine Qiagen MinElute Säule geladen und bei 13000 rpm, Raumtemperatur, für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit dem gelieferten Puffer PE nach Angaben des Herstellers gewaschen, getrocknet und die DNA mit 10  $\mu$ l 5 mM Tris, pH 8,0, eluiert. Die DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Vorteile gegenüber konventionellen DNA Extraktionen mit Phenol-Chloroform und anschließender DNA-Fällung unter Verwendung eines Carriers liegen in der Schnelligkeit, der hohen Ausbeute und werden ohne Zusatz eines Carriers durchgeführt (Abb. 2.1).



### Abbildung 2.1: Aufreinigung sehr geringer DNA-Mengen

Ein *GLO* Promotorfragment wurde mit den Primern X/22 und X/23 mittels PCR und 20 ng genomischer *Antirrhinum* DNA als Matrize unter Standardreaktionsbedingungen (94°C 2 Minuten initiale Denaturierung; 94°C 40 Sekunden, 58°C 40 Sekunden, 72°C 1 Minute; 30 Zyklen) amplifiziert und die Konzentration bestimmt. Das PCR-Produkt wurde mit V-Puffer (330 mM Tris/HCl, pH 8,0, 330 mM NaCl, 65 mM Glycin, 0,03% Tween-20, 0,25 % SDS, 750 µg/ml Proteinase K) auf Endkonzentrationen von 0,1 fg/µl und 0,01 fg/µl verdünnt. 10 µl der DNA-Lösungen wurden mit 890 µl V-Puffer gemischt und mit MinElute Säulen wie unter Abschn. 2.8 beschrieben aufgereinigt. Für eine PCR unter Standardreaktionsbedingungen (s.o.) mit 34 Zyklen wurden 10 % des Eluats (entspricht 0,1 fg (3) und 0,01 fg (4) des aufgereinigten *GLO* Promotorfragments) eingesetzt. Als Kontrollen wurden PCRs mit 0,1 fg (1) und 0,01 fg (2) *GLO* Promotorfragment als Matrize durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,3 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. 100 ng, 10 ng: Marker mit 100 ng bzw. 10 ng DNA je Bande.

## 2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein Assay (500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt.

## 2.10 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diskontinuierliche Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli (1970) angefertigt und mit einer Acrylamidkonzentration zwischen 10 % - 15 % eingesetzt. Als Laufpuffer wurde

1\* Laemmli Puffer verwendet (Sambrook et al., 1989). Die Proteine wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blue (nach Sambrook et al., 1989) angefärbt oder auf Nitrocellulosemembranen (s.u.) übertragen.

## 2.11 Extraktion kernlokalisierter Proteine aus pflanzlichem Material

Zur Extraktion von Kernproteinen für Western Blot Analysen wurde ein Protokoll verwendet, das von Herrn Dr. Roger Rubiera zur Verfügung gestellt wurde. 6 g *Antirrhinum* Infloreszenzen (größte Knospen = 5 mm) wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in 50 ml Kernextraktionspuffer (50 mM MES, pH 8,5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% Glycerin, 10% Saccharose, 1 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 1 mM DTT, 1% Protease Inhibitor Cocktail (P-9599, Sigma, Taufkirchen)) aufgenommen. Das Gemisch wurde durch Nylonnetze mit 300 µm und 20 µm filtiert (MOnyl Netze, Hydro-Bios GmbH, Kiel) und bei 500 xg, 4°C, für 12 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml Kernextraktionspuffer, dem 0,5 % Triton X-100 zugesetzt wurden, resuspendiert. Der Waschschritt wurde wiederholt, die Zellkerne wie oben abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Guanidiniumextraktionspuffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7,9, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 1 mM DTT) aufgenommen. Eine Ultraschallbehandlung wurde mit einer Amplitude von 60% und einer Zykluskontrolleinstellung von 0,5 für 10 Sekunden bei Raumtemperatur durchgeführt (Ultraschallprozessor UP50H; Dr. Hielscher GmbH, Teltow). Anschließend wurde das Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ultraschallbehandlung wurde wiederholt und nicht lösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 20000 xg, 4°C, für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand mit den gelösten Kernproteinen wurde abgenommen, der Guanidiniumextraktionspuffer über Protein Desalting Columns (Pierce über Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) nach Angaben des Herstellers gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 ausgetauscht, die Proteine aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Antikörperaufreinigungen wurden zur Entfernung unspezifischer Antikörper Kernextrakte aus 2g – 4g *def-177b* und *glo-3D* Infloreszenzen modifiziert nach Klein,

1994, hergestellt. Das gemörserte Material wurde in 30 ml Puffer A (10 mM HEPES/KOH, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,5 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (P-9599, Sigma, Taufkirchen)), dem kein Nonidet-P40 Ersatz zugesetzt wurde, aufgenommen und durch Nylonnetze abnehmender Maschenweite filtriert (vgl. Abschn. 2.20.2). Nach Zentrifugation bei 500 xg, 4°C, für 8 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 900 µl Puffer B (20 mM HEPES/KOH, pH 7,9, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA, pH 8,0, 0,2 mM EGTA, pH 8,0, 0,5 mM DTT, 25 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (P-9599, Sigma, Taufkirchen)) aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Kernmembranen wurden durch die Behandlung mit einem Ultraschallprozessor UP50H (Dr. Hielscher GmbH, Teltow) mit einer Amplitude von 60 % und einer Zykluskontrolleinstellung von 0,65 für 10 Sekunden zerstört, die Proteine durch Zugabe von Nonidet-P40 Ersatz (Endkonzentration 0,1 %; Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in Lösung gehalten und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 17000 xg, 4°C, für 8 Minuten aus dem Gemisch entfernt. Der Überstand mit den gelösten Kernproteinen wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 0,6 mg – 1,2 mg/g Ausgangsmaterial. Das Volumen wurde mit HiTrap Bindungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) auf 1 ml aufgefüllt und die Proteine an NHS-aktivierte Sepharose-Säulen (HiTrap NHS-activated HP, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) nach Angaben des Herstellers kovalent gebunden.

## 2.12 Western Blot und Dot Blot Analysen

6 µg *Antirrhinum* Kernproteine (aus *Antirrhinum* Infloreszenzen; s. Abschn. 2.11) oder 1 µg *E. coli* exprimierte DEF bzw. GLO Proteine wurden in einem 12 %igen diskontinuierlichen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Western Blotting Verfahren (Burnette, 1981) auf Nitrocellulosemembranen (BA75, Protran, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Der Transfer wurde mit Western Transfer Puffer (46 mM Tris-Base, 387 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol) in einem Transblotter (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 120 mA für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Effizienz der Übertragung wurde durch

Anfärbung der Proteine mit Ponceau-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau, 3 % TCA) nachgewiesen. Zur Herstellung von Dot Blots wurden *E.coli* exprimierte DEF und GLO Proteine in 1\*PBS-Puffer in Konzentrationen von 100 ng/50 µl, 10 ng/50 µl, 1 ng/50 µl und 0,1 ng/50 µl mit einem Dot Blotter Apparat unter Anlegen eines Vakuums auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Hybridisierung und Detektion der Antikörper erfolgte mit einem Esel anti-Kaninchen HRP-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:10000) unter Verwendung der ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Expositionszeiten betragen zwischen 30 Sekunden und 12 Minuten.

### **2.13 Verwendung von rekombinanten pQE Expressionsvektoren zur Herstellung von *E. coli* exprimierten DEF und GLO Proteinen**

Für Western Blot und Dot Blot Analysen wurden zur Herstellung von *E. coli* exprimierten DEF und GLO Proteinen die *DEF* und *GLO* cDNA-Sequenzen mit den Enzymen *NcoI/BglIII* geschnitten. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden in die *NcoI/BglIII* Schnittstellen des pQE-60 Vektors (Qiagen GmbH, Hilden) integriert (rekombinante Vektoren pQE-*DEF* und pQE-*GLO*). Diese Arbeiten wurden von Frau Sabine Clemens durchgeführt. Die Konstrukte wurden von Frau Dr. Zsuzsanna Schwarz-Sommer für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Rekombinante pQE-19 Vektoren, die Teilbereiche der *DEF* bzw. *GLO* cDNA kodieren, standen zur Verfügung (Anderson, 1995). Ein rekombinanter pQE-Expressionsvektor, der einen kurzen Bereich der MADS-Box und 3'-abwärts gelegener Bereiche der *DEF* cDNA kodiert, wurde durch Restriktion der *DEF* cDNA mit den Enzymen *HindIII/BamHI* und Integration dieses 366 bp langen DNA-Fragments in die *BglIII*-Schnittstelle des pQE-19 Vektors hergestellt (pQE-D39). Ein weiterer rekombinanter pQE-*DEF* Vektor enthielt einen *DEF* cDNA-Sequenzabschnitt, der 3'-abwärts der MADS-Box gelegene Bereiche kodierte. Dieser wurde durch die Restriktion der *DEF* cDNA mit dem Enzym *BanII* und Integration dieses DNA-Fragments in die *BamHI* Schnittstelle des Vektors pQE-19 hergestellt (pQE-DHFR-*DEF*).

Zur Herstellung eines rekombinanten pQE-19/GLO Vektors wurde ein 330 bp langer *GLO* cDNA-Sequenzabschnitt über *Bam*HI und *Ssp*I Schnittstellen in die *Bgl*II-Schnittstelle des pQE-19 Vektors integriert (pQE-DHFR-*GLO*).

Der pQE-19 Vektor kodiert eine Maus-Dehydrofolatreduktasedomäne, die dem Insert vorgeschaltet ist, sowie sechs Histidinreste an der 3'-terminalen Klonierungsstelle, die eine Proteinaufreinigung mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie ermöglichen. Die Konstrukte wurden für diese Arbeit von Frau Dr. Zsuzsanna Schwarz-Sommer zur Verfügung gestellt. Die überexprimierten aufgereinigten *E. coli* DEF und GLO Proteine wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

#### **2.14 Aufreinigung Histidin-markierter Proteine mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie**

Die in *E. coli* exprimierten DEF und GLO Proteine und die DHFR-DEF bzw. DHFR-GLO Fusionsproteine wurden über Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Überexpression der Proteine in *E. coli* SG13009[pREP4] Zellen erfolgte wie im Qiaexpressionist Handbuch der Firma Qiagen GmbH (Hilden) beschrieben. Die Expression der Histidin-markierten Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid) für 3 Stunden bei 37°C induziert. Die Fusionsproteine wurden mit Ni-NTA Agarose nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Qiagen GmbH, Hilden). Der Elutionspuffer wurde durch eine Dialyse gegen 1\*PBS, 0,05 % SDS bei Raumtemperatur über Nacht ausgetauscht. Die Ausbeuten betragen zwischen 3,2 mg – 8,4 mg aufgereinigtes Protein/l Bakterienkultur.

#### **2.15 Herstellung polyklonaler anti-DEF und anti-GLO Seren**

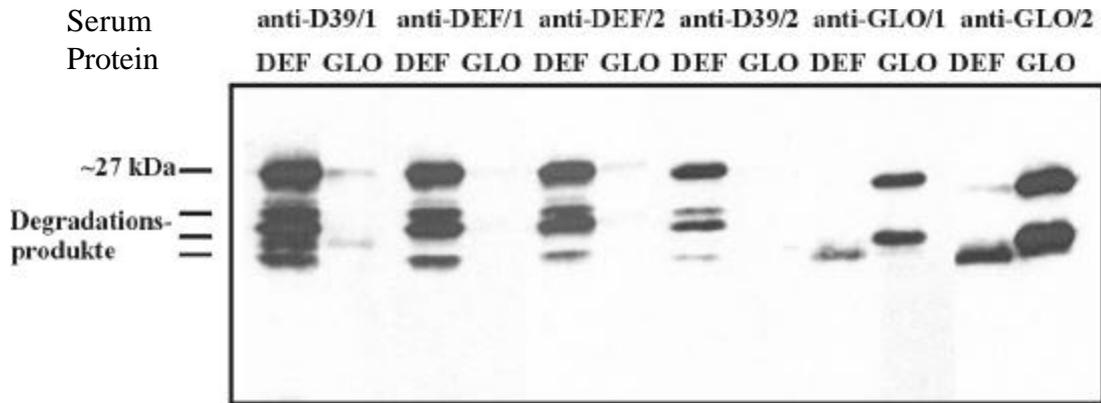
Um die zur Herstellung von anti-DEF und anti-GLO Seren geeigneten Kaninchen zu ermitteln, wurden Präimmunsere von 12 Kaninchen mittels Western Blot Analyse getestet. Hierfür wurden aus *Antirrhinum* Infloreszenzen Kernextrakte nach Klein, 1994, hergestellt, die Proteine mittels PAGE aufgetrennt und nach dem Western

Blotting Verfahren auf Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Abschn. 2.12). Die Filter wurden mit den Präimmunsereen hybridisiert. Die Kaninchen, deren Seren am wenigsten unspezifische Antikörper enthielten, wurden für die Antikörperherstellung verwendet. Die Herstellung der Antikörper wurde von der Firma Pineda Antikörper-Service, Berlin, durchgeführt. Pro Antigen wurden zwei Kaninchen wie folgt immunisiert.

<b>Immunisierungstag</b>	<b>Behandlung</b>
1	Primärimmunisierung mit 100 µg Protein
20	Immunisierung mit 50 µg Protein
30	Immunisierung mit 50 µg Protein
40	Immunisierung mit 50 µg Protein
61	Blutentnahme; Immunisierung mit 25 µg Protein
120	Immunisierung mit 50 µg Protein
150	Immunisierung mit 50 µg Protein
165	Blutentnahme
175	Endblutung

### **2.16 Überprüfung der anti-DEF und anti-GLO Seren**

Serumproben wurden 61, 165 und 175 Tage nach der Primärimmunisierung entnommen und mittels Western Blot Analyse auf die spezifische Erkennung von DEF und GLO Proteinen untersucht. Alle Seren erkannten aufgereinigte *E. coli* exprimierte DEF und GLO Proteine (Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2: Proteinerkennung der anti-DEF und anti-GLO Seren**

1  $\mu\text{g}$  *E. coli* exprimierte DEF und GLO Proteine wurden in einem 12 %igen diskontinuierlichen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Filter wurden mit den anti-DEF und anti-GLO Seren (entnommen 175 Tage nach der Primärimmunisierung; Verdünnung 1:2500) hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit einem Esel anti-Kaninchen HRP-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:10000) unter Verwendung der ECL Western detection reagents (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Die Expositionszeit betrug 30 Sekunden.

### 2.17 Klonierung von *DEF* und *GLO* Sequenzen in den pMAL-Vektor

DEF und GLO Proteine wurden mit dem *E. coli* Maltose-bindenden Protein (MBP) fusioniert, um die Proteine in relativ hohen Konzentrationen in Lösung zu halten und die Bindung an NHS-aktivierte Sepharose Säulen zu ermöglichen. Für diesen Zweck wurden folgende Konstrukte hergestellt. Mittels PCR wurde unter Verwendung der Primer 337 und 338, die *Xba*I bzw. *Hind*III Restriktionsstellen enthielten, ein *DEF* cDNA-Sequenzabschnitt amplifiziert. Es wurde 1 ng des pQE-*DEF* Plasmids als Matrize eingesetzt. Ein *GLO* cDNA-Sequenzabschnitt wurde mit den Primern 339 und 340, an die *Xba*I bzw. *Hind*III Schnittstellen angefügt waren, mittels PCR amplifiziert. Als Matrize wurde 1 ng des pQE-*GLO* Plasmids verwendet. Die PCR mit 30 Zyklen wurde mit der *Pfu* Turbo DNA Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) unter Standardreaktionsbedingungen mit einer Annealingtemperatur von 58°C für 40 Sekunden und einer Verlängerungsphase bei 72°C für eine Minute durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden über *Hind*III und *Xba*I Schnittstellen in den pMAL-c2X Vektor integriert und *E. coli* Dh10 $\beta$  Zellen mit diesen Konstrukten transformiert. Durch die Wahl dieser Schnittstellen wurde ein Stopkodon 33 bp abwärts des 3'-Endes der *DEF* bzw. *GLO* cDNA eingefügt. Die Selektion auf erfolgreich transformierte Plasmid-DNA erfolgte mit 130 mg/l Ampicillin bei 37°C über Nacht. Rekombinante Vektor-DNA wurde mit dem Plasmid MIDI Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) extrahiert und das integrierte PCR-Fragment sequenziert, um mögliche Fehler auszuschließen.

### 2.18 Überexpression und Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Die Überexpression der MBP(Maltose-bindendes Protein)-Fusionsproteine erfolgte wie vom Lieferanten des pMAL-c2X Vektors beschrieben (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.). Der Aufschluß der Bakterien erfolgte mit einem Ultraschallprozessor Cell Disruptor B15 der Firma Branson (über Gerhard Heinemann Laboratoriums-Ausrüstungen, Schwäbisch Gemünd) mit einer Amplitude von 50 % und einer Zykluskontrolleinstellung von 5 für 9\*15 Sekunden. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wurden die Proben 30 Sekunden auf Eis gehalten. Die MBP-Fusionsproteine wurden über Amylose-Säulen gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt (Amylose Resin, New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.). Nach der Aufreinigung wurde der Elutionspuffer durch Dialyse bei 4°C über Nacht gegen HiTrap Bindungspuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) ausgetauscht.

### 2.19 Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Von den aufgereinigten MBP-DEF bzw. MBP-GLO Fusionsproteinen wurden 1 bis 6 mg nach Angaben des Herstellers an NHS-Sepharose High Performance Säulen (HiTrap NHS-activated HP, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) kovalent gebunden. Zur Abtrennung unspezifischer Antikörper wurde das Serum zunächst über Säulen, an die 7 mg bakterielle bzw. 1,3 mg pflanzliche Proteine von *def* bzw. *glo* Nullmutanten kovalent gebunden waren, gegeben (vgl. Abschn. 2.11). Bakterielle Proteine wurden durch Überexpression der leeren Vektoren pQE16 und pMAL-c2X in

*E. coli* Dh10 $\beta$  Zellen, Aufschluß der Bakterien, Entfernung unlöslicher Zellbestandteile mittels Zentrifugation bei 9000  $\times g$ , 4°C, für 30 Minuten und anschließender Dialyse des Überstandes gegen HiTrap Säulenpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) hergestellt (vgl. Abschn. 2.18).

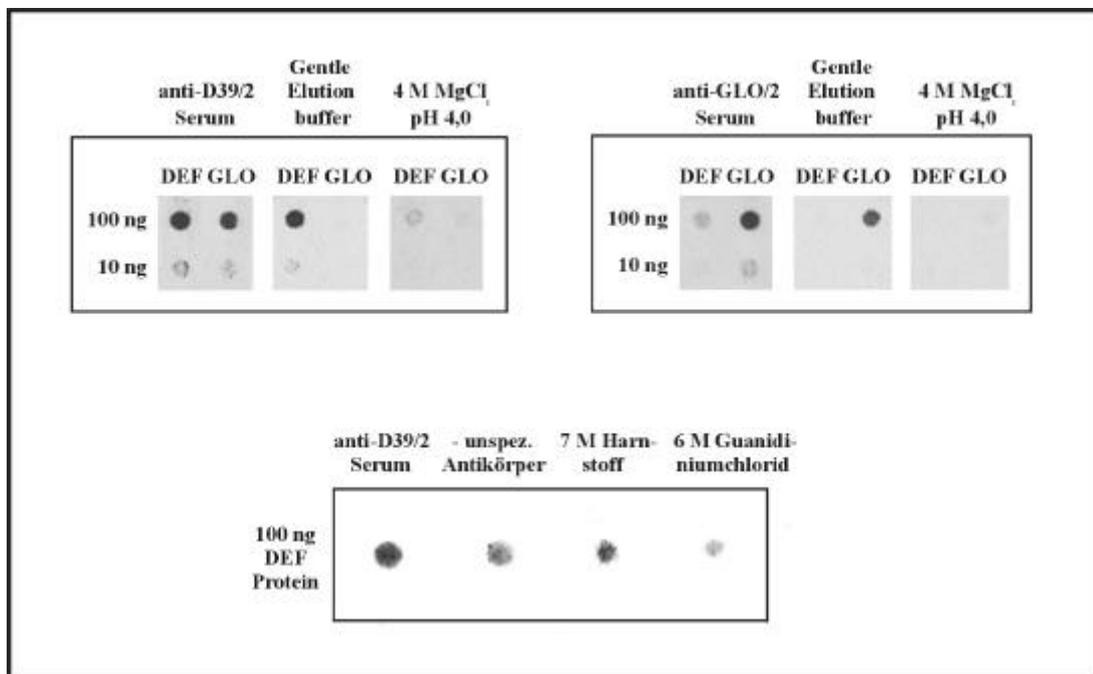
Da die Antikörper auf saure Elutionsbedingungen sensitiv reagierten (nach der Elution mit 0,1 M Glycin, pH 2,6, konnte weder auf Dot Blot- noch auf Immunolokalisationsebene Antikörper-Aktivität nachgewiesen werden) wurden drei alternative Elutionsbedingungen (A, B, C) getestet. Nach der Entfernung unspezifischer Antikörper (s.o.) wurden die Seren auf Säulen, an die MBP-DEF oder MBP-GLO Fusionsproteine gekoppelt waren, gegeben. Die Säulen wurden mit TBS-Puffer gewaschen und die gebundenen Antikörper wie folgt von den Säulen gelöst:

- A Es wurde 1 ml 4 M MgCl<sub>2</sub>, pH 5,4, auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die Antikörper wurden durch Zugabe von 4 M MgCl<sub>2</sub>, pH 5,4, eluiert (nach Gu et al., 1994, verändert). Die eluierten Antikörper wurden gegen dH<sub>2</sub>O für eine Stunde bei Raumtemperatur dialysiert. Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen 1\*PBS bei 4°C über Nacht.
- B Die Antikörper wurden mit 10 ml ImmunoPure Gentle Elution buffer (Pierce über Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) eluiert. Der Elutionspuffer wurde durch eine Dialyse bei Raumtemperatur für eine Stunde gegen 10 mM Tris, pH 7,6, und anschließend gegen 1\*PBS bei 4°C über Nacht ausgetauscht.
- C Die nach der Elution mit ImmunoPure Gentle Elution buffer noch auf der Säule gebundenen Antikörper wurden mit 7 M Harnstoff, 50 mM Natrium-Acetat, pH 5,9, eluiert. Anschließend wurde eine Elution mit 6 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Natrium-Acetat, pH 5,9, durchgeführt. Zwischen den Elutionen wurden die Säulen mit 10 ml TBS gewaschen (nach Narhi et al., 1997, verändert). Der Austausch des Harnstoffpuffers gegen 1\*PBS erfolgte durch Dialyse bei 4°C über Nacht. Der Guanidiniumchlorid Elutionspuffer wurde durch eine Dialyse gegen 7 M Harnstoff, 50 mM Natrium-Acetat, pH 5,9, für eine Stunde bei Raumtemperatur ausgetauscht. Der Austausch des Harnstoffpuffers erfolgte wie oben beschrieben.

Die aufgereinigten Antikörper wurden mit Amicon Ultra Säulen (Millipore GmbH, Eschborn) konzentriert, mit Glycerin vermischt (Endkonzentration 50%) und bei -20°C

gelagert. Die Aktivität der Antikörper wurde in Dot Blot Experimenten überprüft. Unter den oben genannten Elutionsbedingungen blieb die Aktivität der Antikörper erhalten und alle Antikörper erkannten spezifisch *E. coli* exprimierte DEF bzw. GLO Proteine (Abb. 2.3). Jedoch waren die Ausbeuten an aufgereinigten Antikörpern sehr gering.

Die Aufreinigung der Antikörper über an Nickel-Agarose gekoppelte *E. coli* exprimierte DEF bzw. GLO Proteine nach Gu et al., 1994, war nicht erfolgreich.



**Abbildung 2.3: Aktivität der aufgereinigten anti-DEF und anti-GLO Antikörper nach der Elution mit unterschiedlichen Puffern**

*E. coli* exprimierte DEF und GLO Proteine wurden in den in der Abbildung angegebenen Mengen auf Nitrocellulosemembranen aufgetragen. Die Filter wurden mit den Seren anti-DEF D39/2, anti-GLO GLO/2 (Verdünnung 1:2000) oder 0,8 µg aufgereinigten anti-DEF und anti-GLO Antikörpern hybridisiert. Die Elution der aufgereinigten Antikörper von der NHS-Säule erfolgte unter den in der Abbildung angegebenen Bedingungen (vgl. Abschn. 2.19). Die Antikörper wurden mit einem Esel anti-Kaninchen HRP-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:10000) und den ECL Western detection reagents detektiert (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). – unspez. Antikörper: Unspezifische Antikörper wurden aus dem Serum anti-DEF D39/2 entfernt.

## 2.20 Chromatin Immunopräzipitation aus quervernetztem Pflanzenmaterial

Ausgangspunkt für die Etablierung eines Protokolls für *Antirrhinum* Material waren die Arbeiten von Orlando, 2000, Orlando et al., 1997, Strahl-Bolsinger et al., 1997, Ito et al., 1997 und Wang et al., 2002.

### 2.20.1 Fixierung von Pflanzenmaterial

Durch die Fixierung mit Formaldehyd werden Nukleinsäuren mit Proteinen und Proteine mit Proteinen kovalent miteinander verknüpft. Formaldehyd reagiert mit Imino- und Aminogruppen von DNA und Proteinen (z.B. Cytosin und Seitenketten von Lysin und Arginin) unter Bildung einer Schiffschen Base. Dieses Zwischenprodukt kann mit weiteren Aminogruppen reagieren. Die durch Formaldehyd induzierten kovalenten Bindungen können durch Erhitzen in Tris/HCl Puffern revertiert werden. Die Absenkung des pH-Wertes durch die Erhitzung führt zu einer Protonierung der Aminogruppen. Hierdurch liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Ausgangsstoffe (Orlando et al., 1997).

Junge Blütenstände von *Antirrhinum* (Länge der größten Knospen etwa 5 mm) wurden mit einer Klinge zerkleinert und zu 35 ml Fixierungslösung (1 % Paraformaldehyd, 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4; 1,5 g Material/35 ml Lösung) in einem 50 ml Falconreaktionsgefäß gegeben. Es sollte nicht mehr als 6 g Material parallel fixiert werden. Zur raschen und gleichmäßigen Durchdringung des Gewebes mit der Fixierungslösung wurde für 25 Minuten ein Vakuum angelegt. Anschließend wurde das Volumen mit Fixierungslösung auf 50 ml aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 4°C für eine Stunde und 30 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 2 M Glycin (Endkonzentration 125 mM) und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Fixierungsreaktion gestoppt. Das fixierte Material wurde dreimal in eiskaltem 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 125 mM Glycin für je 15 Minuten auf Eis unter leichtem Schütteln gewaschen, der Puffer abgegossen, das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.20.2 Extraktion von Zellkernen

Aus 3 g fixiertem *Antirrhinum* Blütengewebe wurden Kernextrakte modifiziert nach Klein, 1994, hergestellt. Das gemörserte und in 30 ml eiskaltem Puffer A (10 mM HEPES/KOH, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 0,1 % Nonidet P-40 Ersatz (74385, Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), 10 % Glycerin, 0,5 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (P-9599, Sigma, Taufkirchen) homogenisierte Material wurde durch Zentrifugation bei 550 xg, 4°C, für 2 Minuten durch Nylonfilter mit abnehmender Porengröße (300 µm, 75 µm, 20 µm und 10 µm (MOnyl; Hydro-Bios GmbH, Kiel)) in einem eigens dafür entwickelten Zentrifugenadapter gepreßt. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation in einer Laborzentrifuge bei 500 xg, 4°C, für 7 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem Puffer A resuspendiert und die Zellkerne anschließend bei 500 xg, 4°C, 7 Minuten, abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde neunmal wiederholt. Eine Qualitätskontrolle erfolgte durch DAPI-Färbung (4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid; 1 µg DAPI/ml Puffer A) und Betrachtung der Kernextrakte unter einem Lichtmikroskop.

### 2.20.3 Fragmentierung des Chromatins und Immunopräzipitation

Die abzentrifugierten Zellkerne wurden in 450 µl Ultraschallpuffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 mM EGTA, pH 8,0, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % Natrium-Deoxycholat, 125 mM Glycin) resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Mit einem Ultraschallprozessor (UP50H Ultraschallprozessor; Dr. Hielscher GmbH, Teltow) wurde das fixierte Chromatin im 4°C Raum für 16\*10 Sekunden mit einer Zykluskontrolleinstellung von 0,68 und einer Amplitude von 60 % fragmentiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C, für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen RIPAad-Puffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 180 mM NaCl, 125 mM Glycin, 1 mM EDTA, pH 8,0, 1 % Nonidet P-40 Ersatz, 0,2 % Natrium-Deoxycholat, 0,05 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS), 0,65 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (P-9599, Sigma, Taufkirchen) gemischt. Um eine Präzipitation durch unspezifische Antikörper

zu verhindern, wurden der Reaktion 4  $\mu$ l Präimmunsersum zugesetzt und auf einem Überkopfschüttler bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Der Reaktion wurden 40  $\mu$ l Protein A Sepharose (Pierce, über Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn; unmittelbar vor Verwendung in 1\*RIPA-Puffer (50 mM HEPES/KOH, pH 7,7, 140 mM NaCl, 125 mM Glycin, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 % Nonidet P-40 Ersatz, 0,1 % Natrium-Deoxycholat, 0,025 % SDS, 0,5 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail) äquilibriert) zugegeben und bei 4°C auf einem Überkopfschüttler für 1 Stunde inkubiert. Die Protein A Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C, für zwei Minuten akkumuliert und der Überstand auf zwei 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Zu einem Aliquot wurden 4  $\mu$ l anti-DEF bzw. anti-GLO Serum gegeben, zu dem anderen 4  $\mu$ l des entsprechenden Präimmunsersums (Negativ-Kontrolle). Die Reaktionen wurden auf einem Überkopfschüttler bei 4°C über Nacht inkubiert. Pro Reaktion wurden 40  $\mu$ l in 1\*RIPA-Puffer äquilibrierte Protein A Sepharose zugegeben und bei 4°C für 2 Stunden inkubiert. Immunpräzipitierte Protein-DNA Komplexe wurden bei 13000 rpm, 4°C, für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 1,4 ml eiskalter 1\*RIPA-Puffer wurde zu den immunpräzipitierten Protein-DNA Komplexen gegeben und auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. An Protein A gebundene Protein-DNA Komplexe wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm, Raumtemperatur, für 1 Minute pelletiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Für den ersten und den letzten Waschschrift wurde die Reaktion in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Immunpräzipitierte Protein-DNA Komplexe wurden wie oben abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Elution von Protein-DNA Komplexen erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu$ l Glycin-Elutionspuffer (0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, 0,05 % Tween-20; mit konzentrierter HCl auf pH 2,8 eingestellt), verwirbeln für 15 Sekunden und Zentrifugation bei 13000 rpm, Raumtemperatur, für 1 Minute. Der Überstand wurde abgenommen, durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1 M Tris, pH 8,0, neutralisiert und die Elution zweimal wiederholt. Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt und bei 13000 rpm, Raumtemperatur, für 2 Minuten zentrifugiert. 420  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt und RNA durch die Zugabe von 17  $\mu$ g RNase A (1  $\mu$ l einer 40 mg/ml Stocklösung) und Inkubation bei 37°C für 30 Minuten degradiert. Proteine wurden durch die Zugabe von 10,5  $\mu$ l einer 10%igen SDS-Lösung (Endkonzentration 0,25 %) und 750  $\mu$ g/ml Proteinase K (8  $\mu$ l einer 40 mg/ml Stocklösung) bei 37°C über Nacht degradiert.

#### 2.20.4 Revertierung der Quervernetzungen und Aufreinigung der DNA

Durch Formaldehyd gebildete Quervernetzungen wurden durch Inkubation bei 65°C für 6 Stunden gelöst. Immunopräzipitierte DNA wurde aufgereinigt wie unter Abschn. 2.8 beschrieben. Je nach Menge an fixiertem pflanzlichen Ausgangsmaterial betrug das Ausgangsvolumen etwa 450 µl (3 g fixiertes Material) bzw. 900 µl (6 g fixiertes Material). Das Elutionsvolumen nach der Aufreinigung betrug 10 µl.

#### 2.20.5 Bestimmung der eingesetzten Chromatinmenge (Input)

Zur Bestimmung der Menge an eingesetztem Chromatin wurden nach der Ultraschallbehandlung 15 µl von der Reaktion abgenommen und das Volumen mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. RNA wurde durch die Zugabe von RNase (2 µl einer 40 mg/ml Stocklösung) und Inkubation bei 37°C für 30 Minuten degradiert. Es wurden 5 µl 10 % SDS und 750 µg/ml Proteinase K zugesetzt und die Reaktion bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Formaldehyd gebildete kovalente Bindungen wurden durch Inkubation bei 65°C für 6 Stunden gelöst und die DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion und anschließender Isopropanolfällung aufgereinigt. Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Größe der DNA-Fragmente wurden durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 % igem Agarosegel überprüft. Die DNA-Fragmente hatten größtenteils Längen zwischen 0,4 und 4 kb. Aus 6 g fixiertem *Antirrhinum* Blütenmaterial wurden durchschnittlich zwischen 20 µg und 40 µg fixiertes Chromatin extrahiert, das für X-ChIP Experimente eingesetzt wurde.

#### 2.21 PCR-Analysen

Für PCR-Analysen wurden 4 % der immunopräzipitierten DNA in 25 µl Reaktionsvolumen als Matrize eingesetzt. PCR-Kontrollen wurden mit 20 ng genomischer *Antirrhinum* DNA durchgeführt, um die Funktionalität der Primer zu überprüfen. Die Primer wurden mit einer Endkonzentration von 0,4 µM und die dNTPs

mit einer Endkonzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Pro 25  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz wurden 1,25 U Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang angegeben. Es wurde folgendes Programm für die Polymerase-Kettenreaktion gewählt:

94°C	2 Minuten; initiale Denaturierung	
94°C	40 Sekunden; Denaturierung	34 Zyklen
58°C	40 Sekunden; Annealing der Primer	
72°C	1 Minute; Verlängerung	
72°C	3 Minuten	

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Menge an PCR-Produkt wurde durch den visuellen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die definierte Mengen an DNA (100 ng bzw. 10 ng / DNA-Bande) enthielt, bestimmt.

Zur Amplifizierung der in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen Ltd, Paisley, England) klonierten immunopräzipitierten DNA-Sequenzen wurde 1  $\mu\text{l}$  der Bakterienkultur als Matrize in 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansätzen verwendet. Die Primer (M13forward und M13reverse) wurden in einer Endkonzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  und die dNTPs mit einer Endkonzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Der Reaktion wurden 5 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt. Es wurden 2 U Taq DNA Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden) pro 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz verwendet. Die PCRs wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94°C	2 Minuten; initiale Denaturierung	
94°C	40 Sekunden; Denaturierung	30 Zyklen
55°C	1 Minute; Annealing der Primer	
72°C	2 Minuten; Verlängerung	
72°C	5 Minuten	

## 2.22 Klonierung von immunopräzipitierter DNA

Zum Austesten der optimalen Klonierungsbedingungen für sehr geringe DNA-Mengen wurden Pilotexperimente mit 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng mittels Ultraschallbehandlung fragmentierter genomischer *Antirrhinum* DNA durchgeführt. Diese DNA-Fragmente hatten eine durchschnittliche Fragmentlänge von 0,7 kb. Die Ligationen erfolgten in 10 µl Volumen mit 1 µM preannealten Adaptersequenzen 448 und 449 unter Verwendung von 1-3 Units T4 DNA Ligase (M1801; Promega GmbH, Mannheim) mit dem gelieferten 10\*Puffer bei 12°C für 24 Stunden. Durch Zugabe von PEG-8000 (Endkonzentration 10 %; P-2139, Sigma, Taufkirchen) wurde die Klonierungseffizienz gesteigert. Um zu überprüfen, ob durch die Ultraschallbehandlung DNA-Fragmente mit glatten oder mit überhängenden 3'- bzw. 5'-Enden gebildet werden, wurde ein der Adapter-Ligation vorangehendes DNA-Polishing mittels T4 DNA Ligase bzw. *Pfu* DNA Polymerase nach Standardprotokollen durchgeführt und die Effizienz der Klonierung verglichen. Das DNA-Polishing führte nicht zu einer erhöhten Klonierungseffizienz. Daher ist davon auszugehen, daß durch die Fragmentierung des Chromatins mittels Ultraschall überwiegend glatte DNA-Enden erzeugt werden.

Die Ligationsreaktion wurde durch Inkubation bei 70°C für 20 Minuten gestoppt und der Puffer eines 5 µl Aliquots der Reaktion über eine Dialyse (VMWP 01300; MF Millipore Membranfilter; Millipore GmbH, Eschborn) gegen 5 mM Tris, pH 8,0, ausgetauscht. Die DNA wurde als Matrize in einer 50 µl PCR-Reaktion mit dem Primer 448 (Endkonzentration 0,8 µM) und 0,4 µM dNTPs eingesetzt. Es wurde die LA Taq Polymerase der Firma Takara (Shiga, Japan) mit dem gelieferten 10\*Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet.

Adapter-Ligationsansatz (nach Dialyse)	23 µl
10*Puffer	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µl
2,5 mM dNTP	8 µl
10 µM Primer	4 µl
LA Taq Polymerase	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	4,5 µl
Endvolumen	50 µl

Es wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

72°C 3 Minuten; Auffüllen der Adaptersequenzen

94°C 40 Sekunden; Denaturierung

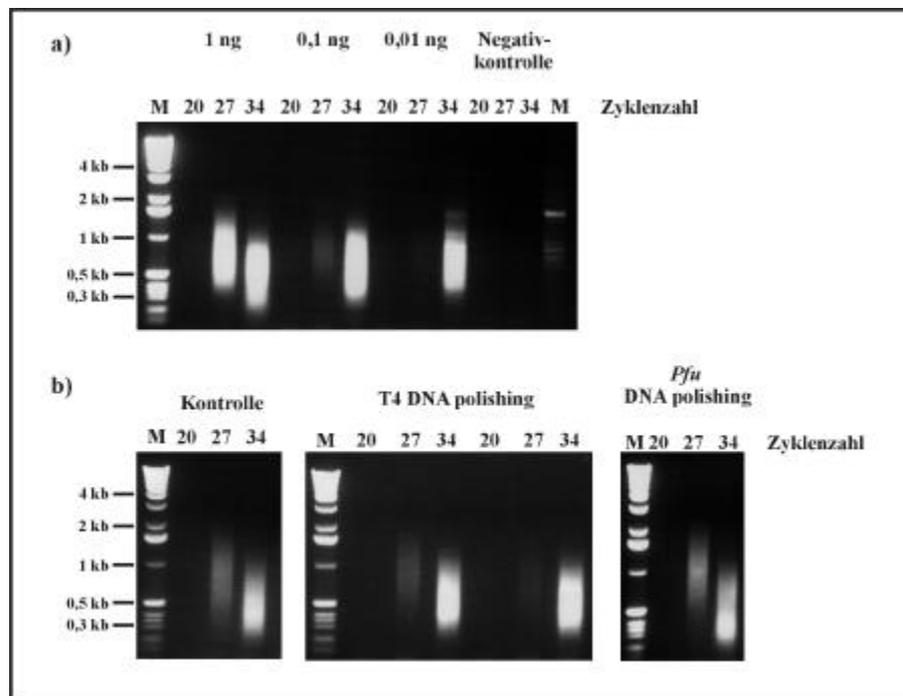
66°C 40 Sekunden; Annealing des Primers

72°C 2 Minuten; Verlängerung

72°C 5 Minuten

27 Zyklen

Die Effizienz der Adapter-Ligation und der PCR-Amplifikation wurde durch die elektrophoretische Auftrennung eines 5 µl Aliquots der PCR-Produkte in einem 1,3%igen Agarosegel überprüft (Abb. 2.4).



**Abbildung 2.4: Adapter-vermittelte PCR-Amplifikation von fragmentierter genomischer *Antirrhinum* DNA**

Genomische *Antirrhinum* DNA wurde mittels Ultraschallbehandlung in Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 0,7 kb gespalten. a) 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng DNA wurden in Adapter-Ligationsreaktionen mit anschließender PCR-Amplifikation (unter Verwendung der *Taq* DNA Polymerase, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), wie in Abschn. 2.22 beschrieben, eingesetzt. b) 1 ng DNA wurde vor der Adapter-Ligation mit T4 DNA Polymerase bzw. *Pfu* DNA Polymerase wie in der Abbildung angegeben behandelt. 5 µl der PCR-Produkte wurden nach 20, 27 und 34 PCR-Zyklen in einem 1,3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Nach 34 Zyklen wurde eine Anreicherung von kürzeren DNA-Fragmenten festgestellt, so daß für die Klonierung von immunopräzipitierten DNA-Fragmenten eine geringere Zykluszahl (27) gewählt wurde.

Da die Pilotexperimente zufriedenstellend verliefen, wurde dieses Protokoll für die Klonierung von immunopräzipitierten DNA-Fragmenten eingesetzt. Für die Klonierung wurden 4 µl der PCR-Produkte in den TOPO-T/A-pCR2.1 Vektor nach Angaben des Herstellers integriert und in elektrokompetente *E. coli* Dh10β Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte mit 130 mg/l Ampicillin bei 37°C über Nacht.

### 2.23 Herstellung von Bakterienfiltern

Einzelne Bakterienkolonien wurden mit dem Microgrid I Spotting Roboter (BioRobotics, England) auf Hybond N+ Membranen (Amersham, England) übertragen und bei 37°C über Nacht auf LB Medium, dem 100 mg/l Ampicillin zur Selektion zugesetzt wurde, inkubiert. Diese Arbeiten wurden von der Serviceeinheit ADIS durchgeführt.

Die Filter wurden zur Lyse der Bakterien und zur Denaturierung der DNA für 10 Minuten auf zwei mit 0,4 M NaOH getränkte 3 MM Whatmanpapiere gelegt. Die Neutralisierung erfolgte mit 3 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0 für 5 Minuten. Der Puffer wurde für 5 Minuten gegen 2\*SSPE ausgetauscht. Die Filter wurden auf ein 3 MM Whatmanpapier gelegt und mit einem 3 MM Whatmanpapier bedeckt. Mit einem Gummiroller (Roller for Microseal Film, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) wurde mehrmals kräftig über die Filter gerollt, um überschüssige Bakterienbestandteile zu entfernen. Die Filter wurden an der Luft getrocknet.

### 2.24 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Durchmusterung der Bakterien-Banken wurden DNA-Sonden mittels Random Oligo Priming mit [<sup>33</sup>P]-dCTP radioaktiv markiert. Zur Markierung wurden PCR-Produkte, die Bereiche der *DEF* und *GLO* Promotoren umspannen, eingesetzt. Es wurde eine PCR mit 20 ng genomischer *Antirrhinum* DNA als Matrize und den Primern X/16 und X/18 (*DEF*) bzw. X/22 und X/24 (*GLO*) mit 30 Zyklen unter folgendem Programm durchgeführt: 94°C initiale Denaturierung; 94°C 40 Sekunden, 58°C 40 Sekunden, 72°C

1 Minute. Die PCR-Produkte wurden mit dem MinElute Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und 30 ng für die Markierung eingesetzt (s.u.).

Für die Analyse der Bakterien-Banken auf noch unbekannte *DEF* Zielsequenzen wurden Adapter-ligierte immunopräzipitierte Sequenzen mittels PCR amplifiziert und 5 µl der PCR-Produkte (s. Abschn. 2.22) über MinElute Säulen (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Adapter-Sequenzen wurden durch Restriktion mit *NotI* entfernt. Die DNA wurde in einem 1,3 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden). Der DNA wurden 3 µl 10\*Oligopuffer (Random Oligonukleotide pd(N)<sub>6</sub>, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, gelöst in 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dTTP, 70 mM β-Mercaptoethanol), 3 µl [<sup>33</sup>P]-dCTP, 1,5 µl Klenow Enzym (2 U/µl, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt und die Reaktion für 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde mit Nucleospin Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Macherey und Nagel GmbH, Düren) und der Einbau von [<sup>33</sup>P]-dCMP mit einem Scintillation Counter ermittelt.

## 2.25 Hybridisierung von Bakterienfiltern

Die Filter wurden in Hybridisierungspuffer (2\*SSPE, 0,1 % SDS, 50 µg/ml denaturiertes Heringssperma) bei 65 °C für eine Stunde vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer bei 65°C mit 1\*10<sup>7</sup> cpm radioaktiv markierter DNA-Sonde über Nacht. Die Filter wurden in 2\*SSPE, 0,1 % SDS, bei 65°C für 15 Minuten und in 1\*SSPE, 0,1 % SDS bei 65°C für 10 Minuten gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem Phosphorimager der Marke Typhoon, Modell 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

## **2.26 Sequenzanalysen**

Sequenzanalysen wurden von der MPIZ-Serviceeinheit ADIS auf Sequenziermaschinen des Typs Abi Prism 377 und 3700 der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) unter Verwendung von BigDye-Terminator Reagenzien (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

## **2.27 Computer-gestützte Arbeiten**

Computer-gestützte Sequenzanalysen wurden mit den Programmen WISCONSIN PACKAGE, Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA, und dem Programm GeneRunner, Version 3.05 der Hastings Inc. Firmengruppe durchgeführt. Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop, Version 6,0, und Corel Draw, Version 8,0, erstellt.

Vergleiche auf Aminosäure- und Nukleotidsequenzebene wurden mit den Datenbanken swissProt und nt-nr im WWW unter der Adresse [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) durchgeführt.

## **2.28 Sonstiges**

Sonstige Arbeiten wurden nach Sambrook et al., 1989, und Sambrook und Russell, 2001, durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Der MADS-Box Transkriptionsfaktor *DEF* wirkt als Schlüsselfaktor in einer regulatorischen Kaskade, die die Entwicklung von Petalen und Stamina steuert. Die Funktion dieses Organidentitätsgens wurde *in vivo* und *in vitro* detailliert untersucht (Sommer et al., 1990; Schwarz-Sommer et al., 1992; Zachgo et al., 1995). Die regulatorischen Netzwerke, die von *DEF* kontrolliert werden, wurden bislang jedoch nicht entschlüsselt. Um Einblicke in diese Netzwerke zu erhalten, müssen die von *DEF/GLO* *in vivo* regulierten DNA-Sequenzen ermittelt werden. Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung direkter *DEF* Zielgene. Hierfür wurde die X-ChIP Technik etabliert, die den Nachweis eines Proteins an seiner *in vivo* DNA-Bindungsstelle ermöglicht (Orlando, 2000).

#### 3.1 Etablierung der X-ChIP Technik in *Antirrhinum majus*

Zur Durchführung der X-ChIP Experimente wurde zunächst ein Protokoll erstellt, das für die Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen aus unterschiedlichen pflanzlichen Geweben geeignet ist. Für diese Versuche wurden polyklonale anti-*DEF* und polyklonale anti-*GLO* Seren verwendet (Anderson, 1995). Methodische Grundlage dieser Versuche waren die Arbeiten von Orlando, 2000, Strahl-Bolsinger et al., 1997, Ito et al., 1997 und Wang et al., 2002.

Entscheidend für eine erfolgreiche Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen ist eine gleichmäßige Fixierung des pflanzlichen Gewebes. Zur Fixierung wurde Formaldehyd, das aufgrund seiner geringen Größe das Gewebe in kurzer Zeit durchdringen kann und durch die hohe Reaktivität schnell Quervernetzungen im Gewebe bildet, verwendet (vgl. M&M, Abschn. 2.20.1). Zudem war bekannt, daß die verwendeten anti-*DEF* und anti-*GLO* Antikörper in Formaldehyd-fixierten Gewebeschnitten Epitope spezifisch erkennen (Zachgo et al., 1995).

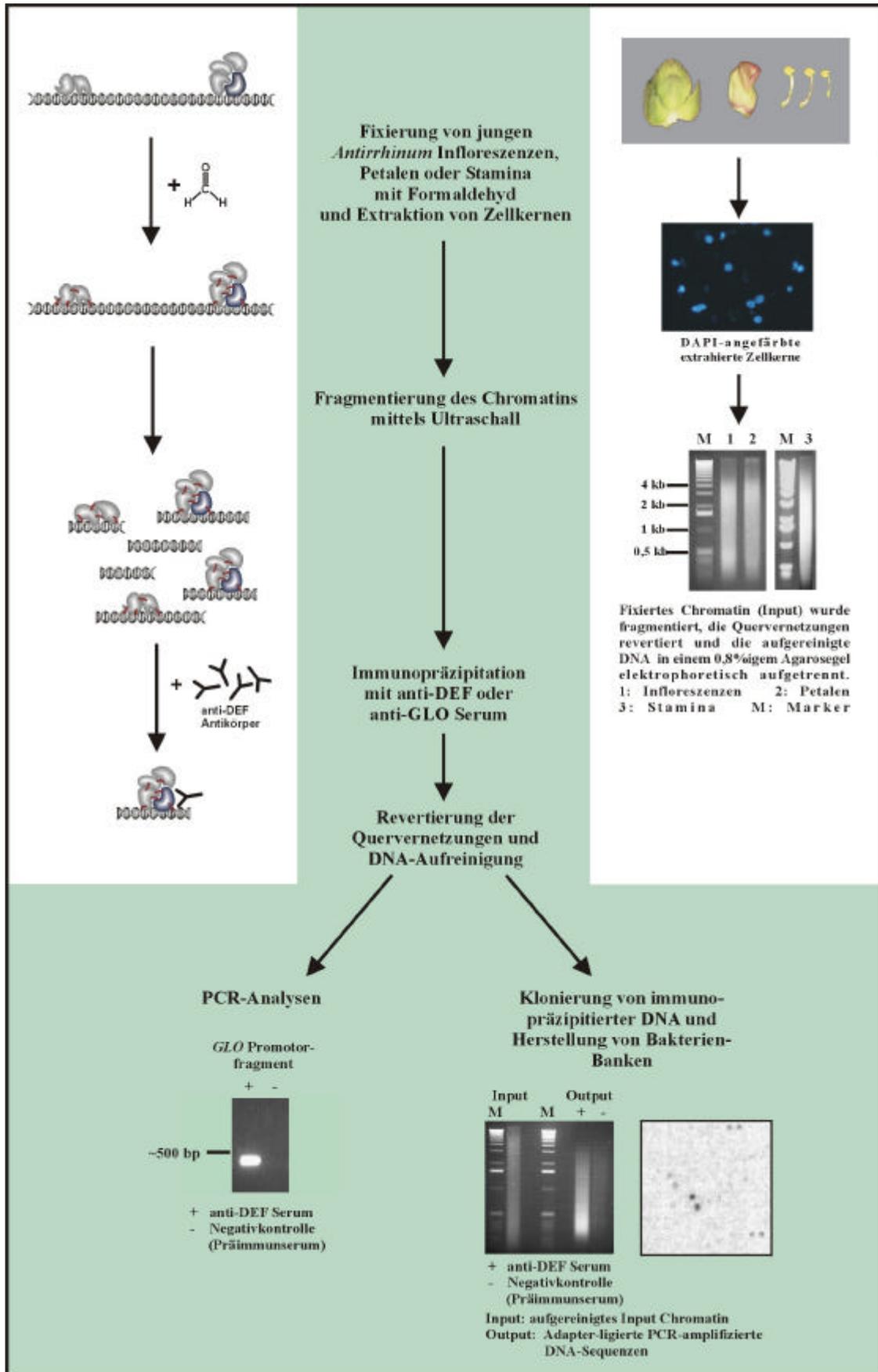
Nach mechanischer Zerkleinerung von jungen *Antirrhinum* Infloreszenzen wurde ein Vakuum angelegt, um die gleichmäßige Durchdringung des Gewebes mit der Fixierungslösung zu gewährleisten. Die optimale Fixierungsdauer und Formaldehydkonzentration wurde experimentell ermittelt. Diese Fixierungsbedingungen konnten auf Organ-spezifische X-ChIP Experimente, die mit Petalen und Stamina im Entwicklungsstadium 3 (Definition siehe Seite 48f) durchgeführt wurden, übertragen werden. Die im Vergleich zu jungen *Antirrhinum* Infloreszenzen geringe Komplexität dieses Gewebes machte die mechanische Zerkleinerung des Gewebes vor der Fixierung überflüssig.

Um eine höhere Spezifität zu erreichen, wurden Zellkernextrakte für die Experimente verwendet. Das fixierte Chromatin wurde durch die Behandlung mit Ultraschallwellen in kürzere Fragmente gespalten und in Lösung gebracht. Die Bedingungen für diese Behandlung wurden so angepasst, daß der überwiegende Teil der DNA-Fragmente eine Größe zwischen 0,4 und 4 kb hatte. Diese Fragmentgröße erwies sich in zweierlei Hinsicht als vorteilhaft. Erstens wurde in PCR-Analysen, bei denen etwa 500 bp lange Promotorbereiche untersucht wurden, der Großteil der immunopräzipitierten DNA-Fragmente erfasst. Zweitens sollten nach der Klonierung der immunopräzipitierten DNA-Sequenzen neue *DEF* Zielgene isoliert werden. Da angenommen wird, daß DEF/GLO bevorzugt an Promotorbereiche der Zielgene bindet, besteht bei längeren immunopräzipitierten DNA-Fragmenten die Möglichkeit, daß sie zusätzlich kodierende Regionen enthalten. Dies würde eine technisch weniger aufwendige Identifizierung der *DEF* Zielgene erlauben.

Die eingesetzten Puffer wurden so gewählt, daß die verwendeten Detergenzien einerseits das fragmentierte Chromatin in Lösung hielten, aber dennoch die Erkennung und Bindung des Proteins durch den Antikörper nicht beeinträchtigten.

### **Abbildung 3.1: Übersicht über einzelne Arbeitsschritte der X-ChIP Technik**

Pflanzliches Gewebe wurde mit Formaldehyd fixiert und die Zellkerne isoliert. Das fixierte Chromatin wurde mittels Ultraschall in kürzere Fragmente gespalten. Gelöste Protein-DNA Komplexe wurden mit einem anti-DEF oder anti-GLO Serum immunopräzipitiert und anschließend die Quervernetzungen gelöst. Die aufgereinigte DNA wurde als Substrat für PCR-Analysen und Klonierungen eingesetzt.



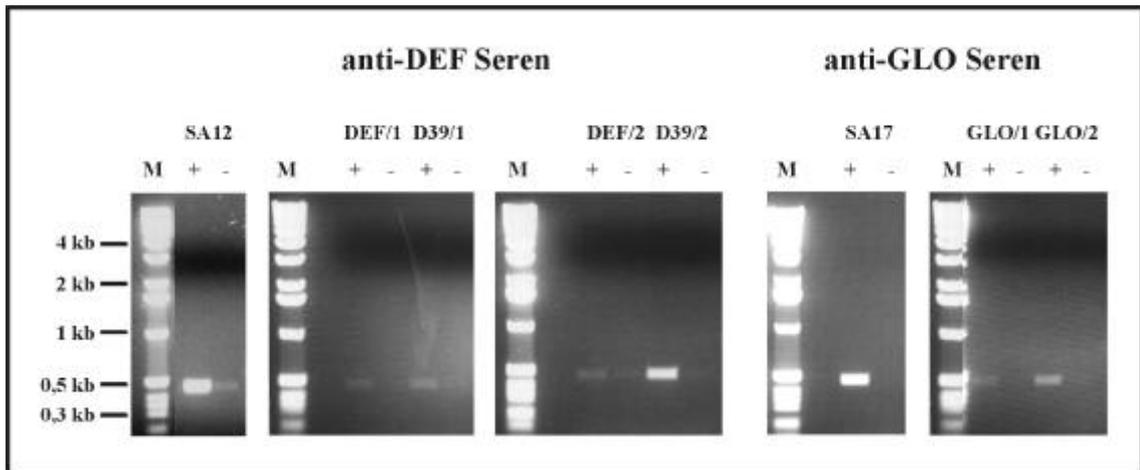
Durch die Optimierung dieser Einzelschritte wurde ein X-ChIP Protokoll etabliert, das für die Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen aus pflanzlichem Material geeignet ist (Abb. 3.1). Zudem wurde die Aufreinigung von extrem gering konzentrierter DNA so verbessert, daß DNA-Mengen im fg-Bereich innerhalb einer Viertelstunde ohne den Zusatz von Carriern aufgereinigt werden können (vgl. M&M, Abschn. 2.8).

### 3.2 Herstellung von polyklonalen anti-DEF und anti-GLO Seren

Es wurden neue polyklonale anti-DEF und anti-GLO Seren hergestellt, da die anfangs verwendeten anti-DEF (SA12) und anti-GLO (SA17) Seren für weitere X-ChIP Experimente nicht mehr in ausreichenden Mengen vorhanden waren. Konstrukte zur Herstellung von Histidin-markierten DHFR(Maus-Dehydrofolatreduktase)-DEF bzw. DHFR-GLO Fusionsproteinen standen zur Verfügung (Anderson, 1995). Die Fusionsproteine wurden über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Von der Firma Pineda Antikörper-Service, Berlin, wurden je Protein zwei Kaninchen über einen Zeitraum von 175 Tagen sechsmal immunisiert und Serumproben entnommen.

Um die für X-ChIP Experimente geeigneten anti-DEF und anti-GLO Seren zu ermitteln, wurde zuerst eine spezifische Erkennung von *E. coli* exprimierten DEF und GLO Proteinen in Western Blot Experimenten nachgewiesen (siehe M&M, Abb. 2.2).

Zur Überprüfung der Funktionalität der Seren in fixiertem Material wurden X-ChIP Experimente mit fixierten *Antirrhinum* Infloreszenzen durchgeführt. Die immunopräzipitierte DNA wurde auf eine spezifische Anreicherung eines ~500 bp großen *GLO* Promotorfragments, welches von DEF/GLO Heterodimeren *in vitro* gebundene CA<sub>2</sub>G-Box Motive enthält, untersucht (vgl. auch Abschn. 3.3; Tröbner et al., 1992). Die Seren anti-DEF D39/2 und anti-GLO GLO/2 zeigten eindeutige positive Signale und wurden in weiteren X-ChIP Experimenten verwendet (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2: Funktionalität verschiedener anti-DEF und anti-GLO Seren in Chromatin Immunopräzipitationen**

Chromatin Immunopräzipitationen wurden mit fixierten *Antirrhinum* Infloreszenzen unter Verwendung verschiedener anti-DEF und anti-GLO Seren durchgeführt. Die Anreicherung eines *GLO* Promotorfragments wurde mittels PCR überprüft und als Nachweis für die Spezifität der Chromatin Immunopräzipitation eingesetzt.

- + anti-DEF oder anti-GLO Serum (wie in der Abbildung angegeben)
- Negativkontrolle (Präimmunseren)

Um die Spezifität der Antikörper-Bindung mit einer unabhängigen Methode nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen mit Kernextrakten aus jungen Infloreszenzen von *Antirrhinum* Wildtyp und *def* Nullmutanten Linien durchgeführt. Das anti-DEF D39/2 Serum erkannte spezifisch ein Protein, das dem errechneten Molekulargewicht von etwa 26 kDa entspricht (Abb. 3.3; Sommer et al., 1990). Das gleiche Protein wurde von dem anti-DEF Serum SA12 gebunden. In Kernextrakten der *def* Nullmutante *def-177b* wurde kein Protein detektiert (Abb. 3.3).

Die anti-GLO Seren GLO/2 und SA17 erkannten spezifisch ein 26 kDa großes Protein in Kernextrakten von Wildtyp Infloreszenzen. Dieses Protein wurde nicht in Kernextrakten der *def-177b* Nullmutante detektiert (Abb. 3.3). Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, daß in *def* Nullmutanten kein GLO Protein nachgewiesen werden kann (Anderson, 1995). Diese Untersuchungen belegen eine spezifische Antigenerkennung der anti-DEF und anti-GLO Seren.



**Abbildung 3.3: Nachweis der spezifischen Proteinerkennung der polyklonalen anti-DEF (D39/2 und SA12) und anti-GLO (GLO/2 und SA17) Seren in Western Blot Experimenten**

Kernproteine wurden aus jungen Infloreszenzen von *Antirrhinum* Wildtyp Pflanzen und *def* Nullmutanten (*def-177b*) isoliert. 6 µg Proteine wurden in einem 12%igen diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosefilter übertragen. DEF und GLO Proteine wurden mit anti-DEF (SA12 und D39/2) bzw. anti-GLO (SA17 und GLO/2) Seren in einer Verdünnung von 1:800 nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit einem Esel anti-Kaninchen HRP-konjugierten Antikörper (Verdünnung 1:10000) unter Verwendung der ECL Detektionsreagenzien. Die Expositionszeit betrug zwölf Minuten. Links: Ponceau-Färbung der Proteine und Größenstandard (Angaben in kDa).

Die Verwendung von aufgereinigten Antikörpern in Chromatin Immunopräzipitationen verhindert unspezifische Reaktionen durch im Serum vorhandene weitere Antikörper. Zudem können aufgereinigte Antikörper kovalent an das Trägermaterial (wie die hier verwendete Protein A Sepharose oder auch andere Trägermaterialien, z.B. CarboLink) gebunden werden, was zu einer weiteren Erhöhung der Spezifität beiträgt. Aufgrund dieser Überlegungen wurden unterschiedliche Strategien zur Aufreinigung der Antikörper verfolgt.

Ein nach Burke et al., 1992, über Western Blot gegen *E. coli* exprimierte DEF Proteine Affinitäts-aufgereinigter Antikörper (anti-D39/2) zeigte auf Immunolokalisationsebene keine Aktivität (nicht gezeigt).

Um DEF und GLO Proteine in relativ hohen Konzentrationen in Lösung zu halten und somit die Bindung an NHS-aktivierte Sepharose Säulen zu ermöglichen, wurden

verkürzte DEF und GLO Proteinsequenzen mit dem leicht löslichen Maltose-bindenden Protein (MBP) aus *E. coli* fusioniert. Die MBP-DEF und MBP-GLO Fusionsproteine wurden an NHS-aktivierte Sepharose kovalent gebunden und für die spezifische Antikörperaufreinigung verwendet.

Nach der Elution der aufgereinigten Antikörper bei niedrigem pH Wert konnte mittels Immunolokalisations- und Dot Blot Experimenten keine Antikörper Aktivität mehr nachgewiesen werden. Daher wurden alternative Aufreinigungs- und Elutionsbedingungen in pH-Bereichen zwischen 4,0 bis 6,55 getestet. Bei pH Werten zwischen pH 5,9 und 6,55 konnten Antikörper eluiert werden, die in Dot Blot Experimenten aktiv waren (vgl. M&M, Abschn. 2.19). Jedoch waren die Ausbeuten an aufgereinigten Antikörpern für umfassende X-ChIP Analysen oder eine kovalente Kopplung an das Trägermaterial zu gering. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren X-ChIP Experimente mit den polyklonalen anti-DEF und anti-GLO Seren durchgeführt, die zu einer erfolgreichen Anreicherung von *DEF* Zielensequenzen führen (Abb. 3.2).

### **3.3 Analyse der *DEF* und *GLO* Promotoren auf eine *in vivo* Interaktion mit DEF/GLO**

Expressionsanalysen von *GLO* in unterschiedlichen *def* und *glo* Mutanten und *in vitro* Bindungsstudien mit *GLO* Promotorfragmenten und DEF/GLO Heterodimeren ließen vermuten, daß die späte *GLO* Expression durch eine direkte Bindung von DEF/GLO an den *GLO* Promotor verstärkt und während der Blütenorganogenese auf einem hohen Niveau gehalten wird (Tröbner et al., 1992). Für die *DEF* Expression wurde ebenfalls eine positive autoregulatorische Kontrolle diskutiert. So wurde gezeigt, daß die späte *DEF* Expression abhängig von den *DEF* und *GLO* Genprodukten ist und eine im *DEF* Promotor vorhandene CArG-Box von DEF/GLO Heterodimeren *in vitro* gebunden wird (Schwarz-Sommer et al., 1992; Tröbner et al., 1992).

### 3.3.1 *In vivo* Nachweis der Bindung von DEF/GLO an den *GLO* Promotor

Um erstmalig einen *in vivo* Nachweis für die Bindung von DEF/GLO an den *GLO* Promotor zu erbringen, wurden Chromatin Immunopräzipitationen mit unterschiedlichem *Antirrhinum* Blütenmaterial durchgeführt. Die immunopräzipitierte DNA wurde als Matrize in PCRs zur Amplifikation von drei *GLO* Promotorfragmenten („*GLO-1*“, „*GLO-2*“, „*GLO-3*“) eingesetzt, deren Größe und Lage in Abb. 3.4 a) schematisch dargestellt ist. Das Promotorfragment „*GLO-1*“ umschließt zwei CARG-Box Motive, die in Gelretardierungsassays schwach von DEF/GLO Heterodimeren gebunden wurden (Tröbner et al., 1992). Das weiter stromaufwärts gelegene Promotorfragment „*GLO-2*“ enthält eine CARG-Box, die ebenfalls *in vitro* von DEF/GLO Heterodimeren gebunden wurde (Tröbner et al., 1992). Das Promotorfragment „*GLO-3*“ umfasst einen Promotorbereich, der ungefähr 1 kb stromaufwärts von den putativen DEF/GLO Bindungsstellen entfernt liegt und vermutlich nicht in die autoregulatorische Kontrolle involviert ist. Wie aus Abb. 3.4 b) ersichtlich ist, führte die Immunopräzipitation von Protein-DNA Komplexen aus jungen *Antirrhinum* Infloreszenzen mit einem anti-DEF Serum zu einer starken Anreicherung des Promotorfragments „*GLO-1*“ im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum. Die Promotorfragmente „*GLO-2*“ und „*GLO-3*“ wurden dagegen nur in deutlich geringeren Konzentrationen in immunopräzipitierter DNA nachgewiesen, die auf der unspezifischen Erfassung nicht von DEF/GLO gebundener DNA-Sequenzen beruht (s.u.).

Als negative Kontrolle für die Spezifität der X-ChIP Technik wurden X-ChIP Experimente mit jungen Infloreszenzen der *def* Nullmutante *def-177b* durchgeführt. Bei diesen Versuchen war das Promotorfragment „*GLO-1*“ ebenso wie die Promotorfragmente „*GLO-2*“ und „*GLO-3*“ nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen in immunopräzipitierter DNA vorhanden (Abb. 3.4 b).

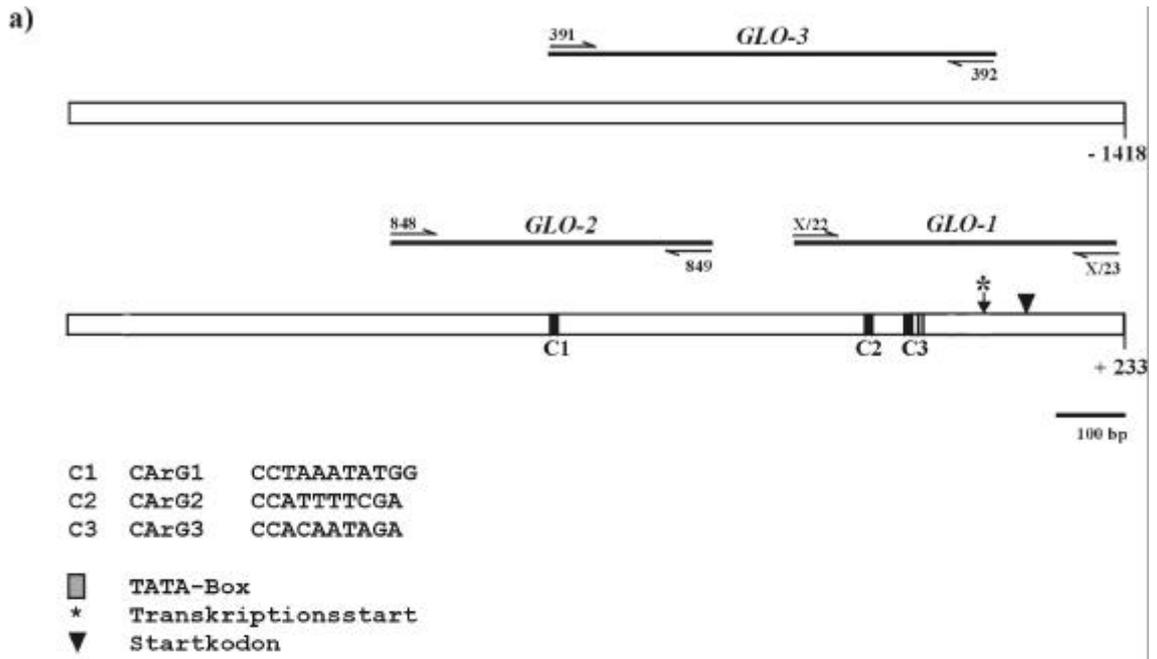
Um die Funktion von *DEF* und *GLO* während der Blütenentwicklung zu verfolgen, wurden X-ChIP Experimente mit fixierten Petalen und Stamina im Entwicklungsstadium 3 durchgeführt. In diesem Stadium haben die geschlossenen Knospen eine Länge von 10-20 mm und die Zellen durchlaufen eine Phase intensiven

Streckungswachstums (Martin und Gerats, 1993). Die immunpräzipitierte DNA wurde mittels PCR mit *GLO* Promotor-spezifischen Primern auf eine Anreicherung von *GLO* Promotorfragmenten getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 c) und d) gezeigt. Die starke Anreicherung des *GLO* Promotorfragments „*GLO-1*“ zeigt, daß auch in späten Entwicklungsstadien sowohl in Petalen als auch in Stamina DEF/*GLO* den *GLO* Promotor bindet. Die Promotorfragmente „*GLO-2*“ und „*GLO-3*“ waren nur in geringen Konzentrationen vorhanden.

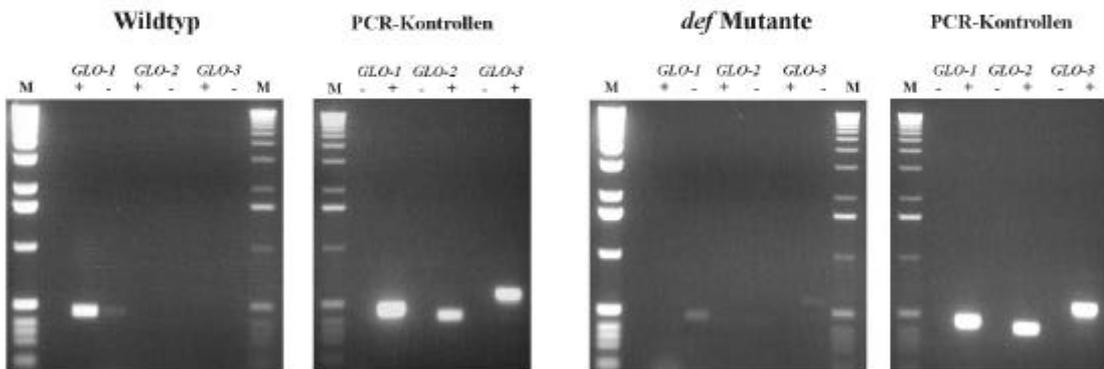
Als weitere negative Kontrolle für die X-ChIP Experimente wurde ein im kodierenden 3'-Bereich des *RAN3* (GTP-bindendes Kernprotein) Gens gelegener genomischer Sequenzabschnitt gewählt, da die Expression dieses Gens nicht durch *DEF* beeinflusst wird (M. Bey, persönliche Mitteilung). Diese Sequenz wurde in immunpräzipitierter DNA nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen und ist in Abb. 3.4 d) exemplarisch für Stamina-spezifische X-ChIP Experimente gezeigt. Daher wurden geringe DNA-Konzentrationen in immunpräzipitierter DNA auf unspezifisch erfasste DNA-Sequenzen zurückgeführt. PCR-Kontrollen wurden mit 20 ng genomischer *Antirrhinum* DNA durchgeführt, um die Funktion der Primer durch die annähernd gleichmäßige Amplifikation unterschiedlicher DNA-Sequenzen zu dokumentieren.

**Abbildung 3.4 (folgende Seite): DEF/*GLO* interagiert mit dem *GLO* Promotor *in vivo***

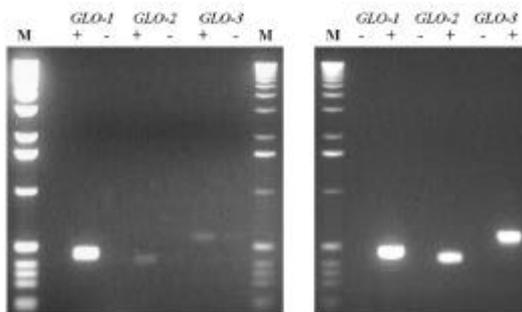
- a) Schematische Darstellung des *GLO* Promotors und 5'-kodierender Regionen. Die eingezeichneten Primer wurden zum Nachweis einer Anreicherung von *GLO* Promotorfragmenten in immunpräzipitierter DNA verwendet. Die CARG-Boxen und das Startkodon sind eingezeichnet.
- b) Zellkerne wurden aus fixierten *Antirrhinum* Infloreszenzen von Wildtyp und *def* Nullmutanten Linien extrahiert. Das Chromatin wurde durch die Behandlung mit Ultraschallwellen in Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 0,4 - 4 kb gespalten und Chromatin Immunpräzipitationen mit dem anti-DEF Serum D39/2 (+) bzw. dem Präimmunserum (-) durchgeführt. Die immunpräzipitierte DNA wurde als Matrize in PCRs mit den oben angegebenen *GLO*-spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR-Kontrollen wurden mit 20 ng genomischer *Antirrhinum* DNA als Matrize (+) bzw. dH<sub>2</sub>O (-) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,3%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.
- c), d) Als Ausgangsmaterial für X-ChIP Experimente wurden Petalen (c) und Stamina (d) im Entwicklungsstadium 3 verwendet. Die X-ChIP Analysen wurden durchgeführt wie unter b) beschrieben.



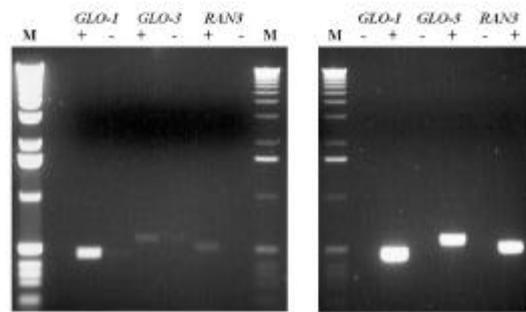
b) Infloreszenzen



c) Petalen



d) Stamina



Die Anwendung der X-ChIP Technik in unterschiedlichen *Antirrhinum* Blütengeweben erbrachte den Nachweis einer direkten Interaktion von DEF/GLO mit einem *GLO* Promotorbereich („*GLO-1*“), der die *in vitro* gebundenen CArG-Box Motive CArG2 und CArG3 umschließt und zwischen -288 und -1 stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert ist.

Der Gehalt an diesem Promotorfragment war in X-ChIP Experimenten circa 20-fach erhöht verglichen mit nicht von DEF/GLO gebundenen DNA-Sequenzen („*GLO-3*“, „*RAN3*“). Der Nachweis über die spezifische Anreicherung des *GLO* Promotorfragments „*GLO-1*“ wurde als positive Kontrolle für den erfolgreichen Verlauf weiterer X-ChIP Experimente verwendet. Der Sequenzabschnitt „*GLO-3*“ wurde nicht gebunden und konnte ebenso wie die „*RAN3*“ Sequenz als negative Kontrolle verwendet werden.

### 3.3.2 Überprüfung einer direkten Interaktion des *DEF* Promotors mit DEF/GLO

Chromatin Immunopräzipitationen wurden mit *Antirrhinum* Infloreszenzen und dem anti-DEF Serum D39/2 durchgeführt. Die immunopräzipitierte DNA wurde auf die Anreicherung von zwei 500 bp langen genomischen *DEF* Fragmenten („*DEF-1*“, „*DEF-2*“) untersucht (Abb. 3.5 a). Ein *DEF* Promotorfragment („*DEF-1*“), das die CArG-Box umschließt, wurde im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum schwach angereichert. Ein weit stromabwärts im 3'-kodierenden Bereich des *DEF* Gens lokalisiertes Fragment („*DEF-2*“) war sowohl in Immunopräzipitationen mit anti-DEF Serum als auch in der Negativkontrolle mit Präimmunserum in geringen Konzentrationen vorhanden (Abb. 3.5 b).

Organ-spezifische X-ChIP Experimente wurden mit fixierten Petalen und Stamina unter Verwendung des anti-DEF Serums D39/2 durchgeführt. Die immunopräzipitierte DNA wurde auf eine Anreicherung des „*DEF-1*“ Promotorfragments und des „*DEF-2*“ Fragments mittels PCR untersucht. Im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum wurde in beiden Experimenten eine Anreicherung des „*DEF-1*“ Promotorfragments nachgewiesen (Abb. 3.5 c, d). Ausgehend von Petalenmaterial wurden zudem geringe Konzentrationen des „*DEF-2*“ Fragments festgestellt

(Abb. 3.5 c). In Chromatin Immunopräzipitationen, die mit Stamenmaterial durchgeführt wurden, wurde eine schwache Anreicherung des „*DEF-1*“ Sequenzabschnitts im Vergleich zu dem „*DEF-2*“ Fragment beobachtet (Abb. 3.5 d).

Die PCR-Kontrollen auf genomische *Antirrhinum* DNA zeigten, daß die PCR-Amplifikation der verschiedenen *DEF* Fragmente vergleichbar war.

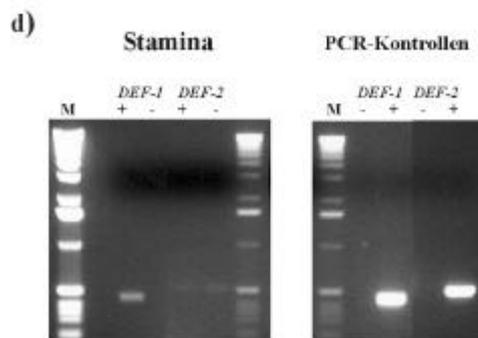
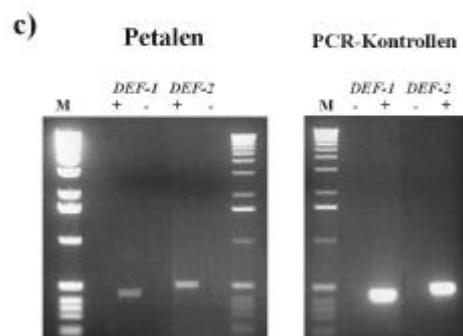
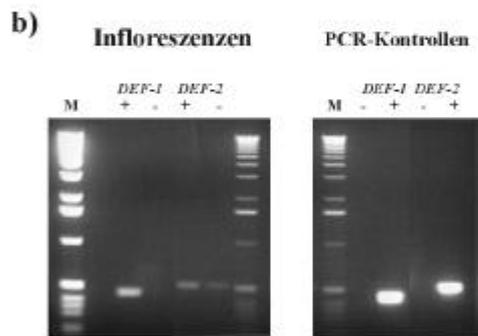
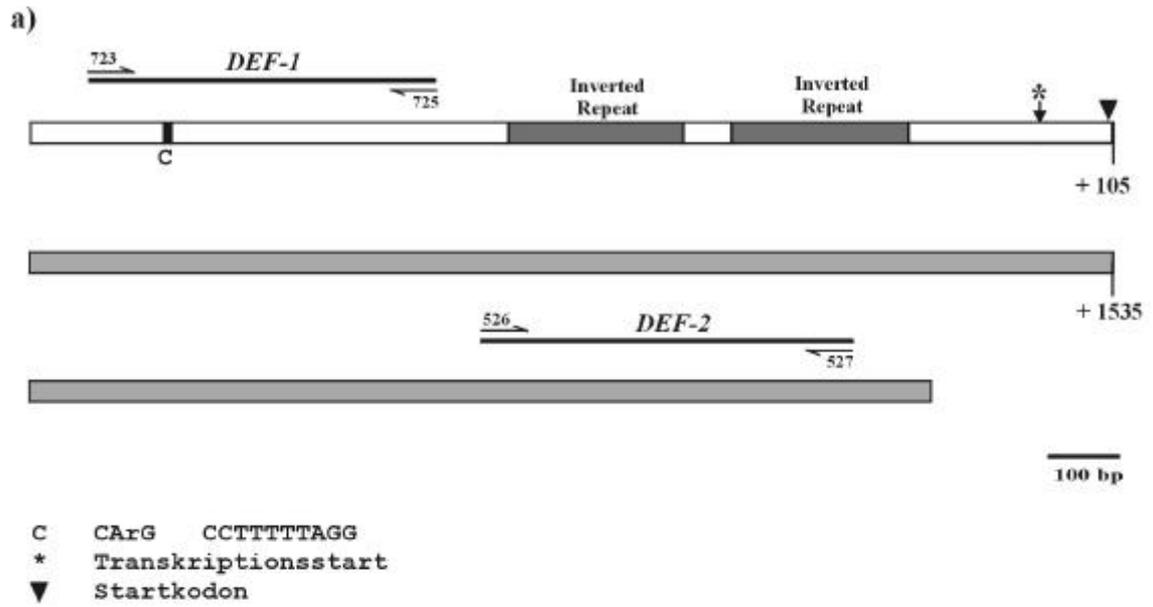
Die Konzentration des „*DEF-1*“ Promotorfragments im Vergleich zu dem *in vivo* von DEF/GLO gebundenen „*GLO-1*“ Promotorfragment ist deutlich geringer. So betrug die Ausbeute an PCR-Produkt für das „*GLO-1*“ Promotorfragment zwischen 100 ng und 200 ng während nur 10 ng – 25 ng an „*DEF-1*“ Promotorfragment erhalten wurden. Diese schwächere Anreicherung des „*DEF-1*“ Promotorfragments erschwert Aussagen über eine Bindung des *DEF* Promotors durch DEF/GLO.

### 3.4 Überprüfung putativer *DEF* Zielgene auf eine *in vivo* Bindung von DEF/GLO

Die Etablierung der X-ChIP Technik ermöglichte die Überprüfung einer *in vivo* Bindung von DEF/GLO an putative *DEF* Zielgene, die bereits in der Vergangenheit mittels unterschiedlicher Ansätze isoliert wurden.

**Abbildung 3.5 (folgende Seite): Chromatin Immunopräzipitationen zur Überprüfung einer *in vivo* Interaktion von DEF/GLO mit dem *DEF* Promotor.**

- a) Skizzierung der Lage und Größe der PCR-amplifizierten DNA-Fragmente im genomischen *DEF* Locus. Die CA<sub>r</sub>G-Box und das Startkodon sind angegeben. Der Inverted Repeat ist dunkelgrau, Sequenzen im kodierenden Bereich sind hellgrau hinterlegt.
- b) DEF-DNA Komplexe wurden mit dem anti-DEF D39/2 Serum (+) aus fixierten *Antirrhinum* Wildtyp Infloreszenzen immunopräzipitiert und die aufgereinigte DNA auf eine Anreicherung von *DEF* Sequenzen in einer PCR mit den unter a) gezeigten Primern untersucht. Negativkontrollen wurden mit dem Präimmunserum durchgeführt (-). In den PCR-Kontrollen wurden 20 ng genomische *Antirrhinum* DNA als Matrize (+) bzw. dH<sub>2</sub>O (-) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,3%igem Agarosegel.
- c), d) Ausgehend von fixierten Petalen (c) und Stamina (d) wurden Chromatin Immunopräzipitationen wie unter b) beschrieben durchgeführt.



Die Promotoren von drei Transkriptionsfaktoren (*DEFH125*, *DEFH84* und *MIXTA*) waren bekannt (Zachgo, 1995; P. Huijser und S. Zachgo, unveröffentlichte Daten; C. Martin, unveröffentlichte Daten) und wurden auf eine direkte Regulation durch DEF/GLO mittels Chromatin Immunopräzipitation untersucht.

### **3.4.1 *DEFH125* - ein Pollen-spezifisch exprimierter MADS-Box Transkriptionsfaktor unterliegt einer direkten negativen Kontrolle durch DEF/GLO**

Die Isolierung des *DEFH125* Gens erfolgte in einem Versuchsansatz mit der Zielsetzung MADS-Box Gene, die in die Regulation der Stamenorganogenese involviert sind, zu identifizieren. Hierzu wurden Stamina von 10 mm großen *Antirrhinum* Knospen als Ausgangsmaterial zur Konstruktion einer cDNA-Bank eingesetzt und diese mit MADS-Box spezifischen DNA-Sonden durchmustert. *In situ* Expressionsanalysen des *DEFH125* Gens und Immunolokalisierungen des DEFH125 Proteins zeigten, daß *DEFH125* überwiegend in Pollen während der Mikrosporogenese exprimiert wird (Zachgo et al., 1997). In diesem Gewebe wird *DEF* nicht exprimiert (Schwarz-Sommer et al., 1992).

Die komplementären Expressionsmuster von *DEF* und *DEFH125* weisen auf eine potentielle direkte Kontrolle der *DEFH125* Expression durch DEF/GLO hin. Um eine mögliche Regulation durch DEF/GLO zu untersuchen, wurde der *DEFH125* Promotor isoliert (Zachgo, 1995). Zwischen den Positionen – 790 bis – 94 relativ zum Startkodon wurden vier CARG-Boxen und ein Mef2-ähnliches Motiv identifiziert (Abb. 3.6 a). Die *in vivo* Bindung von DEF/GLO an diese Sequenzabschnitte würde zu einer Anreicherung dieser Sequenzen in X-ChIP Experimenten führen.

Mit dem anti-DEF Serum D39/2 wurde DNA aus *Antirrhinum* Infloreszenzen, Petalen und Stamina immunopräzipitiert. Die DNA wurde mittels PCR auf die Anreicherung von Sequenzabschnitten des proximalen *DEFH125* Promotors („125-1“, „125-2“) und auf eine von diesen Sequenzen weiter entfernt gelegene Promotorregion („125-3“) untersucht (Abb. 3.6 a).

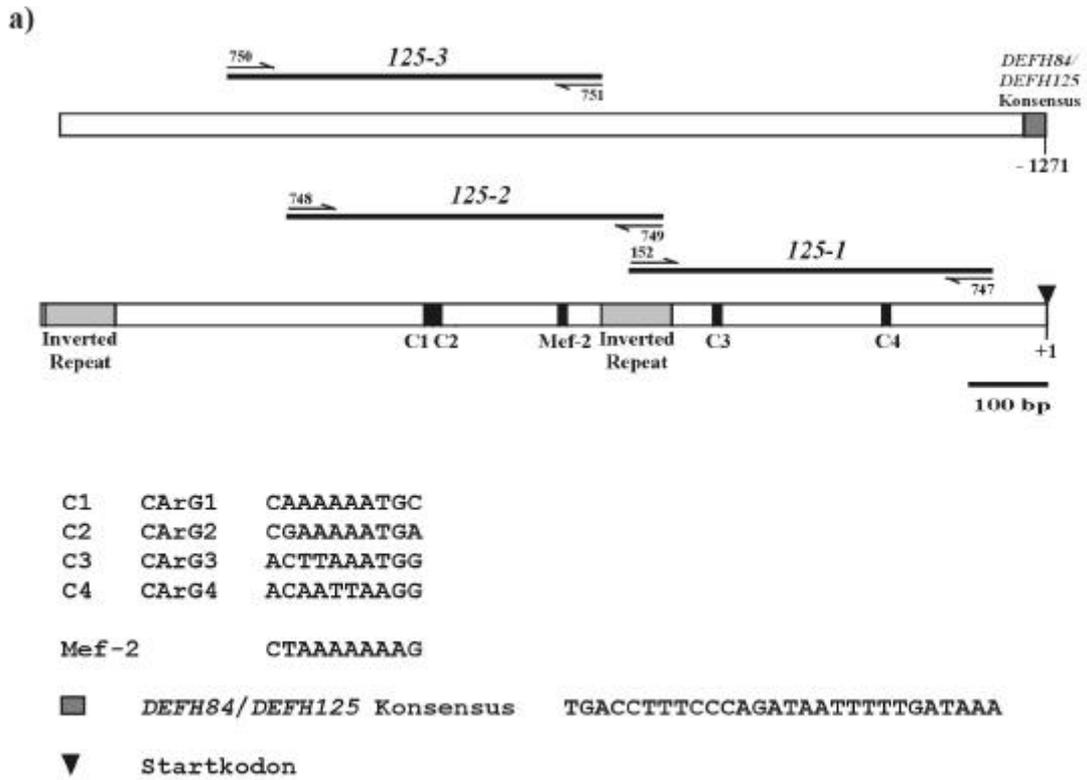
Wie Abbildung 3.6 b) zu entnehmen ist, wurde in immunopräzipitierter DNA aus jungen Wildtyp Infloreszenzen eine geringfügige Anreicherung der Promotorfragmente „125-1“ und „125-2“ im Vergleich zu der Negativkontrolle mit Präimmunserum und dem weiter stromaufwärts im *DEFH125* Promotor gelegenen Fragment „125-3“ festgestellt. In X-ChIP Experimenten mit fixierten Infloreszenzen der *def* Nullmutante *def-177b* war keine Anreicherung dieser Fragmente im Vergleich zum Präimmunserum und zum Promotorfragment „125-3“ zu erkennen.

Die Bindung von DEF/GLO an den *DEFH125* Promotor wurde Organ-spezifisch mittels X-ChIP Analysen in Petalen und Stamina im Entwicklungsstadium 3 untersucht. Es wurde eine etwa 15-fache Anreicherung der *DEFH125* Promotorfragmente „125-1“ und „125-2“ im Vergleich zu dem Promotorfragment „125-3“, das nur in geringen Konzentrationen in immunopräzipitierter DNA vorhanden war, festgestellt (Abb. 3.6 c, d). In den entsprechenden Negativkontrollen mit Präimmunserum wurden diese Sequenzen nur in geringen Mengen nachgewiesen bzw. die Konzentrationen an diesen Sequenzen war unterhalb der Detektionsgrenze (Abb. 3.6 c, d).

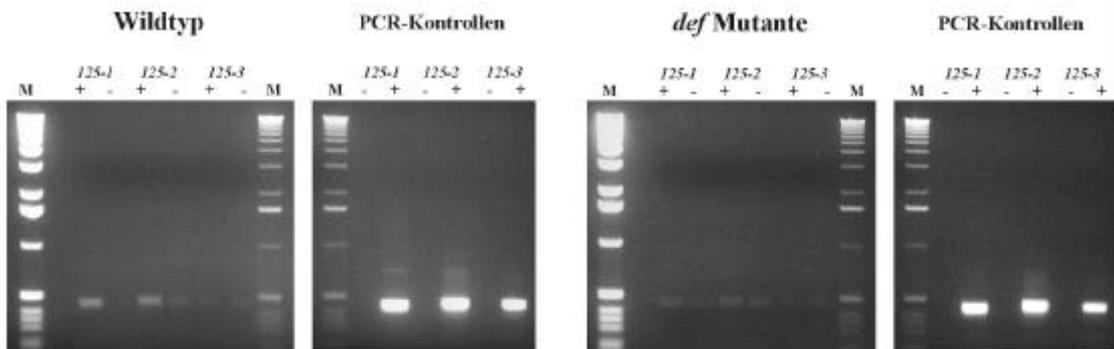
Diese Ergebnisse zeigen, daß DEF/GLO den *DEFH125* Promotor in einem 1 kb langen Bereich oberhalb des Startkodons *in vivo* bindet und daß diese Interaktion vom Entwicklungsstadium abhängig ist.

**Abbildung 3.6 (folgende Seite): *In vivo* Interaktion von DEF/GLO mit dem *DEFH125* Promotor**

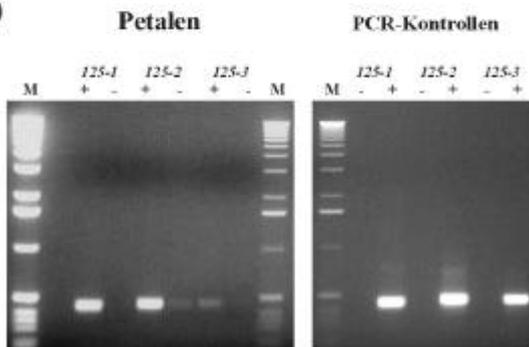
- a) Skizze der *DEFH125* Promotorregion. Die Lagen und Größen der amplifizierten Promotorfragmente sind eingezeichnet. Putative CARG-Box Motive und das Startkodon sind angegeben. Der Inverted Repeat ist grau unterlegt.
- b) Ausgehend von fixierten *Antirrhinum* Infloreszenzen von Wildtyp und *def* Nullmutanten Linien wurden X-ChIP Experimente mit dem anti-DEF Serum D39/2 (+) und dem Präimmunserum (-) durchgeführt. Die immunopräzipitierte DNA wurde mittels PCR mit den unter a) skizzierten Primern auf die Anreicherung von *DEFH125* Promotorfragmenten untersucht. Die PCR-Kontrollen wurden mit 20 ng genomischer *Antirrhinum* DNA (+) und dH<sub>2</sub>O (-) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.
- c), d) X-ChIP Experimente wurden wie unter b) beschrieben mit Petalen (c) und Stamina (d) durchgeführt.



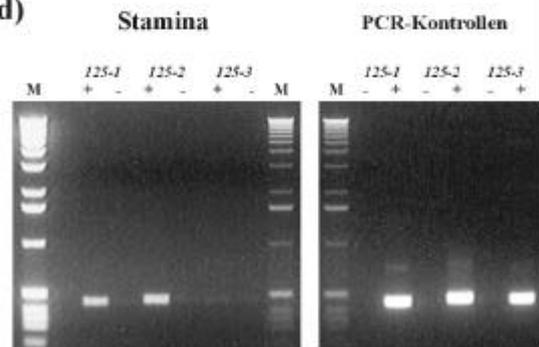
b) Infloreszenzen



c) Petalen



d) Stamina



### 3.4.2 X-ChIP Untersuchungen des *DEFH84* Promotors

Das *DEFH84* Gen wurde aus einer subtrahierten cDNA-Bank, die unter Verwendung von jungen Infloreszenzen der Temperatur-sensitiven *def-101* Mutante hergestellt wurde, als potentiell *DEF* Zielgen isoliert (S. Zachgo, unveröffentlichte Daten). Northern Blot Analysen zeigten, daß die Expression des MADS-Box Transkriptionsfaktors *DEFH84* mit der von *DEF* negativ korreliert ist. In *in situ* Analysen wurde die Expression von *DEFH84* in älteren Knospen in basalen Bereichen der Petalen und Stamina nachgewiesen. In diesen Entwicklungsstadien wird *DEF* in basalen Bereichen des zweiten und dritten Blütenwirtels nur sehr schwach exprimiert (S. Zachgo, persönliche Mitteilung). Die komplementären Expressionsmuster von *DEF* und *DEFH84* und acht putative CArG-Box Motive im *DEFH84* Promotor (Abb. 3.7 a) deuten eine mögliche direkte Kontrolle durch DEF/GLO an.

Die Frage, ob die negative Regulation durch *DEF*, die auf Expressionsebene nachgewiesen wurde, auf einer direkten Interaktion des *DEFH84* Promotors mit DEF/GLO beruht, wurde mittels der X-ChIP Methode untersucht (Abb. 3.7 b). Die Immunopräzipitation von DEF-DNA Komplexen aus *Antirrhinum* Infloreszenzen erbrachte nur eine schwache Anreicherung des *DEFH84* Promotorfragments „84-1“ relativ zur Negativkontrolle mit Präimmenserum und zum Promotorfragment „84-2“. In Petalen-spezifischen X-ChIP Experimenten wurde ebenfalls nur eine schwache Anreicherung von *DEFH84* Promotorsequenzen beobachtet (Abb. 3.7 c). Die geringe Konzentrationen dieser Sequenzen war mit der Menge an DNA-Sequenzen vergleichbar, die unspezifisch erfasst wurden (vgl. Abschn. 3.3.1).

Diese Ergebnisse lassen keine eindeutige Aussage darüber zu, ob der negative Effekt von *DEF* auf die *DEFH84* Expression auf eine direkte Interaktion von DEF/GLO mit dem *DEFH84* Promotor zurückzuführen ist.

### 3.4.3 X-ChIP Analyse des *MIXTA* Promotors

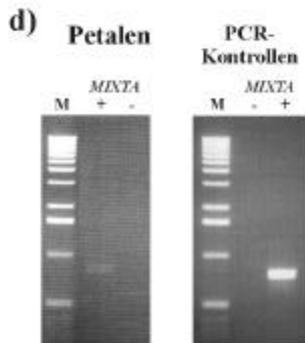
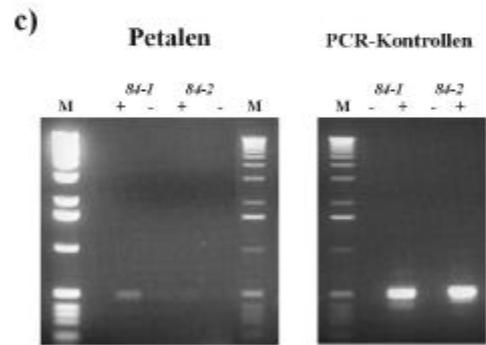
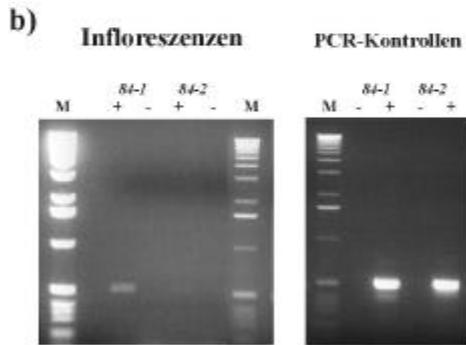
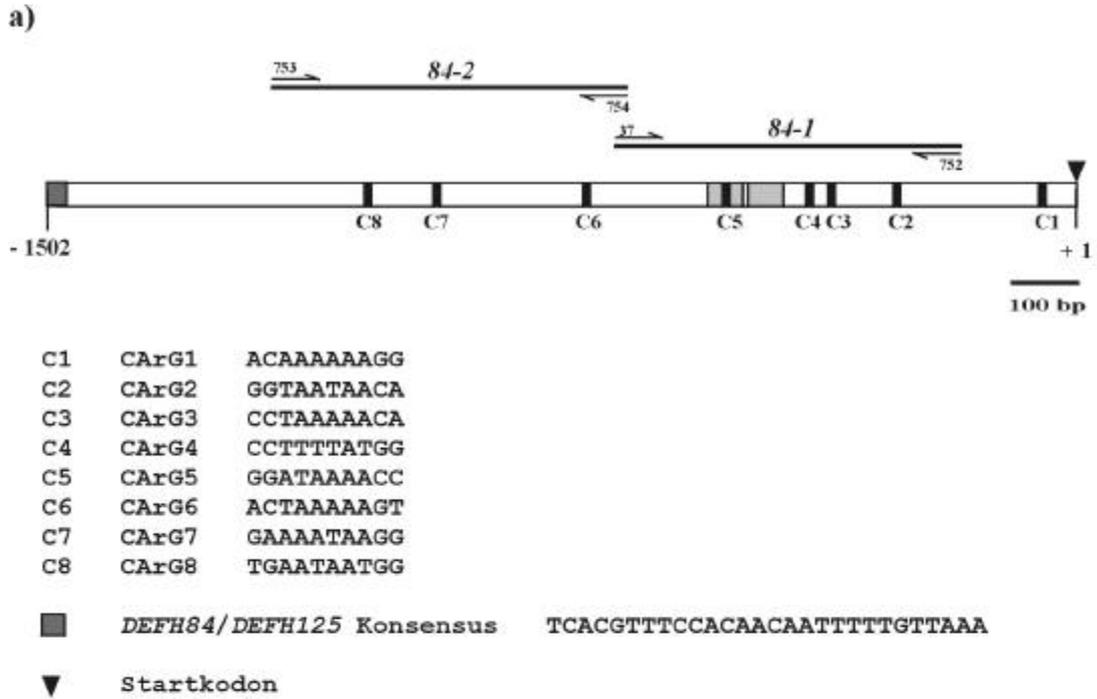
*MIXTA* ist ein Myb-Transkriptionsfaktor, der die Bildung von konischen Zellen in der L1 Zellschicht der inneren Petalenepidermis steuert (Noda et al., 1994). Die *MIXTA* Expression wird erst spät während der Petalenentwicklung induziert. *In vitro* Daten deuten auf eine Interaktion von DEF/GLO mit dem *MIXTA* Promotor hin (Martin et al., 2002). Ein etwa 700 bp langer *MIXTA* Promotorbereich, der ein CArG-Box Motiv umfasst, wurde in Petalen-spezifischen X-ChIP Experimenten auf eine Interaktion mit DEF/GLO untersucht. Es wurde nur eine sehr schwache Anreicherung dieses Promotorfragments festgestellt, das wahrscheinlich auf das Erfassen von unspezifischer DNA zurückzuführen ist (Abb. 3.7d).

### 3.4.4 Identifizierung von direkten *DEF* Zielgenen mittels Kombination von Expression Profiling Daten und Chromatin Immunopräzipitationen

*def-101* ist eine Temperatur-sensitive *def* Mutante. Die Mutante bildet in der permissiven Temperatur (15°C) Blüten aus, die ähnlich den Blüten von Wildtyp-Pflanzen sind. Werden die Pflanzen dagegen bei 26°C gezogen, führt dies zu einem annähernd vollständigen Verlust der *DEF* Funktion und zur Ausprägung eines Phänotyps, der der *def* Nullmutante gleicht. Diese Mutation kann dazu genutzt werden, die *DEF* Funktion *in vivo* ab- bzw. anzuschalten und die hierdurch verursachten Effekte auf die Transkription von Zielgenen zu analysieren (Schwarz-Sommer et al., 1992; Zachgo et al., 1995).

#### Abbildung 3.7 (folgende Seite): X-ChIP Analyse von *DEFH84* und *MIXTA*

- a) Schematische Darstellung des *DEFH84* Promotors. Putative CArG-Boxen, das Startkodon und der Inverted Repeat (hellgrau) sind eingezeichnet.
- b), c) X-ChIP Experimente wurden mit Infloreszenzen von Wildtyp und *def* Nullmutanten Linien (b) und Petalen im Entwicklungsstadium 3 (c) als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die mit dem anti-DEF Serum D39/2 immunopräzipitierte DNA wurde mittels PCR auf die Anreicherung der unter a) gezeigten *DEFH84* Promotorfragmente untersucht. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,3%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.
- d) Mit dem anti-DEF Serum D39/2 aus Petalen immunopräzipitierte DNA wurde mittels PCR auf das Vorhandensein eines ~ 700 bp langen *MIXTA* Promotorbereichs untersucht.



Unter Verwendung von Petalenmaterial im Entwicklungsstadium 3 der *def-101* Mutante identifizierte Frau Melanie Bey im Rahmen ihrer Doktorarbeit mittels Expression Profiling Studien Gene, deren Expression durch die Reduktion der *DEF* Funktion positiv oder negativ beeinflusst wurde. Mittels der RAGE Technik wurden von ihr Promotorbereiche von fünf Genen, die eine starke und schnelle Reaktion auf die Reduktion der *DEF* Funktion zeigten, isoliert und auf CARG-Box Motive untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Promotoren dieser Zielgene einer X-ChIP Analyse unterzogen, um diese Gene als direkte oder indirekte *DEF* Zielgene einordnen zu können.

#### **3.4.4.1 Die Expression des Gens *DEFTup1* unterliegt einer positiven direkten Kontrolle durch DEF/GLO**

Die Expression Profiling Studien führten zur Identifizierung des *DEF Target up-regulated 1* (*DEFTup1*) Gens, dessen Expression durch *DEF* positiv reguliert wird. Die Aminosäuresequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung mit Extensin-ähnlichen Proteinen. *DEFTup1* wird in unterschiedlichen vegetativen und floralen Organen exprimiert. In Blütenorganen wurde eine ausgesprochen starke Expression in Petalen und Stamina, eine etwas schwächere in Karpellen nachgewiesen (M. Bey, persönliche Mitteilung).

Ein 2,85 kb langer *DEFTup1* Promotorbereich besitzt zahlreiche putative CARG-Box Elemente (M. Bey, persönliche Mitteilung). Einige Bereiche des *DEFTup1* Promotors wurden in X-ChIP Experimenten auf die Bindung mit DEF/GLO untersucht.

Hierfür wurde DNA aus *Antirrhinum* Petalen und Stamina im Entwicklungsstadium 3 mit dem anti-DEF Serum D39/2 immunopräzipitiert und die Anreicherung von drei ~500 bp langen *DEFTup1* Promotorbereichen („*Dup1-1*“, „*Dup1-2*“, „*Dup1-3*“) mittels PCR überprüft. Die Promotorbereiche „*Dup1-1*“ und „*Dup1-2*“ wurden in immunopräzipitierter DNA im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmenserum und zu dem Promotorfragment „*Dup-3*“ stark angereichert (Abb. 3.8 a-c).

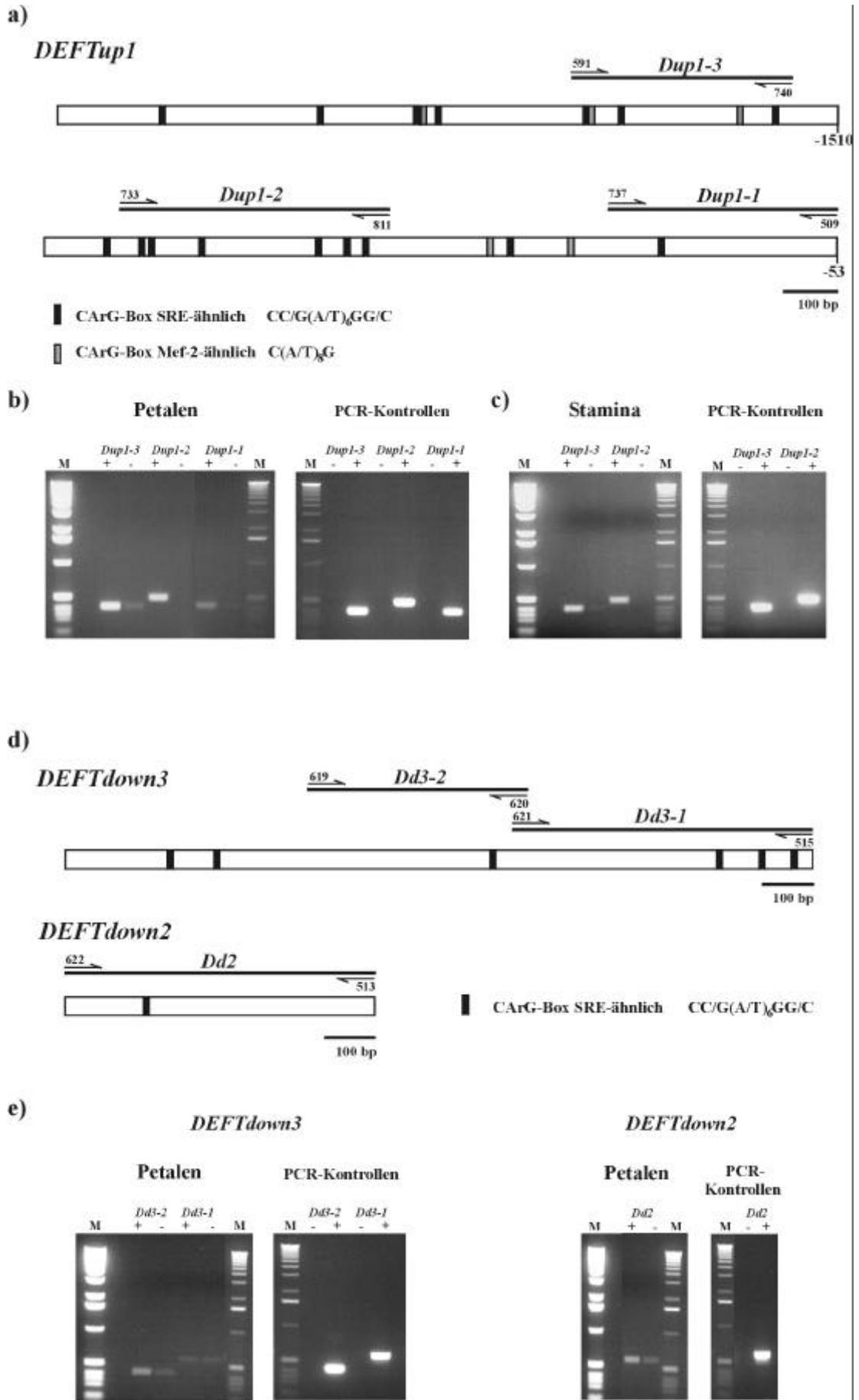
Dieses Ergebnis beweist eine direkte *in vivo* Interaktion von DEF/GLO mit distinkten Bereichen des *DEFTup1* Promotors und liefert damit den Nachweis, daß *DEFTup1* ein direktes *DEF* Zielgen ist.

#### 3.4.4.2 Überprüfung der Gene *DEFTdown2* und *DEFTdown3* auf eine direkte Interaktion mit DEF/GLO

Die Gene *DEF Target down-regulated 2* und *3* (*DEFTdown2*, *DEFTdown3*) wurden als negativ regulierte *DEF* Zielgene in Expression Profiling Studien mit der *def-101* Mutante identifiziert. *DEFTdown3* kodiert ein hypothetisches Protein und wird in allen Organen exprimiert. Jedoch wurden deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke in unterschiedlichen Organen beobachtet. In floralen Organen wird *DEFTdown3* stark in Sepalen und wesentlich schwächer in Petalen, Stamina und Karpellen exprimiert. Das *DEFTdown2* Gen zeigt auf Aminosäureebene hohe Ähnlichkeit zu  $\beta$ -Glukosidasen. Die Expression des *DEFTdown2* Gens ist räumlich begrenzt: es wird ausschließlich im ersten und vierten Wirtel exprimiert (M. Bey, persönliche Mitteilung).

**Abbildung 3.8 (folgende Seite): X-ChIP Analysen von *DEF* Zielgenen, die mittels Expression Profiling identifiziert wurden.**

- a) Abbildung des *DEFTup1* Promotors. Die eingezeichneten Promotorfragmente wurden in Chromatin Immunopräzipitationen auf eine direkte Bindung von DEF/GLO untersucht.
- b) Petalen-spezifische X-ChIP Experimente wurden mit dem anti-DEF Serum D39/2 (+) bzw. mit Präimmunsereum (-) durchgeführt. In einer PCR wurden die unter a) abgebildeten *DEFTup1* Promotorfragmente amplifiziert, die PCR-Produkte in einem 1,3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. In den PCR-Kontrollen wurden 20 ng genomische *Antirrhinum* DNA (+) oder dH<sub>2</sub>O (-) eingesetzt.
- c) Aus Stamina im Entwicklungsstadium 3 wurde Chromatin mit dem anti-DEF Serum D39/2 immunopräzipitiert (+) und mittels PCR auf die Anreicherung von *DEFTup1* Promotorfragmenten im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunsereum (-) untersucht.
- d) Skizzen der *DEFTdown3* und *DEFTdown2* Promotoren.
- e) X-ChIP Experimente wurden mit Petalen unter Verwendung des anti-DEF Serums D39/2 (+) und des Präimmunsereums (-) durchgeführt und die immunopräzipitierte DNA wurde auf die Anreicherung der unter d) gezeigten *DEFTdown3* und *DEFTdown2* Promotorfragmente mittels PCR untersucht.



In X-ChIP Analysen mit Petalen und Stamina im Entwicklungsstadium 3 und dem anti-DEF Serum D39/2 wurden Promotorregionen beider Gene auf eine direkte Assoziation mit DEF/GLO untersucht (Abb. 3.8 d, e). Eine schwache Anreicherung des Promotorfragments „*Dd3-2*“ des *DEFTdown3* Gens wurde im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum und zum Promotorfragment „*Dd3-1*“ festgestellt. Die Konzentrationsunterschiede dieser Promotorfragmente waren jedoch gering, so daß eine *in vivo* Bindung von DEF/GLO an diese Sequenzen nicht zweifelsfrei ermittelt werden konnte.

Der isolierte *DEFTdown2* Promotorbereich umfasste etwa 600 bp und enthielt ein CArG-Box Element. Die PCR-Amplifikation von immunpräzipitierter DNA mit *DEFTdown2*-spezifischen Primern resultierte in einer schwachen Anreicherung dieses Promotorfragments im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum (Abb. 3.8 e). Die leicht erhöhte Konzentration des *DEFTdown2* Promotors in immunpräzipitierter DNA kann ein Hinweis auf eine direkte Interaktion sein. Um dies mit Sicherheit nachweisen zu können, müßte über die bereits isolierte 600 bp lange Promotorregion ein größerer Promotorbereich mittels X-ChIP untersucht werden.

Promotorsequenzen der Gene *DEF Target up-regulated 2* (*DEFTup2*) und *DEF Target down-regulated 1* (*DEFTdown1*) wurden in Petalen-spezifischen X-ChIP Experimenten nicht eindeutig angereichert.

### **3.5 Herstellung von Bakterien-Banken mit immunpräzipitierter DNA zur Isolierung neuer *DEF* Zielgenesequenzen**

Eine Anzahl von *DEF* Zielgenen wurde durch den Einsatz unterschiedlicher Methoden isoliert. Diese Zielgene werden auf Expressionsebene positiv oder negativ von *DEF* reguliert und können durch die Anwendung der X-ChIP Technik auf eine direkte Interaktion mit DEF/GLO untersucht werden, wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigten. Jedoch wurde für die meisten dieser Zielgene eine Kontrolle durch *DEF* in späteren Entwicklungsstadien diskutiert, während Informationen über frühere Steuerungsprozesse fehlen. Zur Isolierung von *DEF* Zielsequenzen, die während

der frühen Entwicklung des zweiten und dritten Wirtels von DEF/GLO gebunden werden, wurde aus *Antirrhinum* Infloreszenzen immunopräzipitierte DNA zur Herstellung von Bakterien-Banken verwendet.

Aus fixierten *Antirrhinum* Infloreszenzen wurde mit einem anti-DEF Serum (SA12) Chromatin immunopräzipitiert. Die Spezifität der Chromatin Immunopräzipitation wurde durch den Nachweis einer Anreicherung des *in vivo* gebundenen „*GLO-1*“ Promotorfragments erbracht. Somit waren die immunopräzipitierten DNA-Fragmente für *DEF* Zielgene angereichert. Um genügend DNA für die Klonierung zu erhalten, wurden an die immunopräzipitierten DNA-Fragmente Adapter ligiert und die Sequenzen mittels PCR amplifiziert. Als Negativkontrolle wurden parallel X-ChIP Experimente mit Präimmunsereum unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots der PCR-amplifizierten DNA-Fragmente zeigte, daß die Immunopräzipitation unter Verwendung des anti-DEF Serums SA12 einen deutlich höheren DNA-Gehalt aufwies als die Immunopräzipitation mit dem entsprechenden Präimmunsereum. Die PCR-amplifizierten DNA-Sequenzen wurden in den pCR2.1-TOPO Vektor integriert und zur Herstellung einer Bakterien-Bank (075) eingesetzt. Diese Bank enthielt etwa 3800 Einzelkolonien, die auf Nitrocellulosefilter übertragen wurden. Die Bank wurde durch die Hybridisierung der Filter mit radioaktiv markierten „*GLO-1*“ und „*DEF-1*“ Promotorfragmenten auf die quantitative Repräsentation dieser Sequenzen untersucht. Es wurden keine Hybridisierungssignale detektiert (nicht gezeigt).

Zur Untersuchung einer größeren Anzahl von immunopräzipitierten DNA-Fragmenten auf die Anreicherung spezifischer DNA-Sequenzen wurde eine Bakterien-Bank mit dem anti-DEF Serum D39/2 nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt (Abb. 3.9 a, b). Diese Bakterien-Bank (078) umfaßte ungefähr 6100 Einzelkolonien und wurde mit radioaktiv markierten Sonden auf den Gehalt an *GLO* und *DEF* Promotorsequenzen durchmustert. Es wurde kein Klon identifiziert, der diese Sequenzen integriert hatte.

Anschließend wurden die Banken auf spezifisch angereicherte, noch unbekannte *DEF* Zielsequenzen untersucht. Filter von beiden Bakterien-Banken wurden mit radioaktiv markierten Sonden, die den Gesamt-DNA-Gehalt eines X-ChIP Experiments nach der

Adapter-vermittelten PCR-Amplifikation repräsentierten, hybridisiert (Abb. 3.9 c). Als „positive“ Sonde wurden Adapter-ligierte PCR-amplifizierte DNA-Sequenzen eingesetzt, die mit einem anti-DEF Serum (SA12 oder D39/2) immunopräzipitiert wurden. Um eine Unterscheidung zwischen spezifisch angereicherten und unspezifisch erfassten DNA-Sequenzen zu ermöglichen, wurden die Filter mit einer „negativen“ Sonde hybridisiert. Diese Sonde enthielt PCR-amplifizierte DNA-Sequenzen der Negativkontrolle mit Präimmunserum. Abbildung 3.9 zeigt die Vorgehensweise zur Herstellung der Bakterien-Banken und das Ergebnis der Durchmusterung der Bank 078 auf spezifisch angereicherte DNA-Sequenzen. Dreißig Klone der Bank 078 zeigten Hybridisierungssignale sowohl mit der positiven als auch mit der negativen Sonde und waren somit als falsche Positive einzuordnen (Abb. 3.9 c). Um zu überprüfen, welche DNA-Sequenzen die falschen Positiven repräsentierten, wurden die in den Vektor integrierten DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert und fünf Klone sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß die DNA-Fragmente repetitive Sequenzen (Satelliten-DNA) enthielten. Die DNA-Fragmente hatten Größen von 0,5 – 1,6 kb mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 0,6 kb. Aufgrund der verwendeten Fixierungs- und Ultraschallbedingungen entsprach diese Fragmentgröße den Erwartungen. Mittels der Hybridisierung wurde kein Klon detektiert, der ausschließlich ein Signal mit der positiven Sonde zeigte. Somit war die Isolierung neuer *DEF* Zielsequenzen durch die hier beschriebene Klonierung von immunopräzipitierter DNA nicht möglich. Um neue direkte *DEF* Zielgene zu isolieren, müssen daher Änderungen am X-ChIP Protokoll vorgenommen werden, auf die in Abschn. 4.6.3 ausführlich eingegangen wird.

**Abbildung 3.9 (folgende Seite): Herstellung und Analyse einer Bakterien-Bank mit immunopräzipitierter DNA**

Aus jungen *Antirrhinum* Infloreszenzen wurden DEF-DNA Komplexe mit dem anti-DEF Serum D39/2 immunopräzipitiert (+). Negativkontrollen wurden mit dem Präimmunserum durchgeführt (-). Die Spezifität der Chromatin Immunopräzipitation wurde durch die Anreicherung des „*GLO-1*“ Promotorfragments dokumentiert (a). Adapter wurden an die immunopräzipitierten DNA-Fragmente ligiert und diese Sequenzen mittels PCR amplifiziert. Als Kontrollen wurden Ligationsreaktionen und PCRs unter den gleichen Bedingungen mit 1 ng und 0,1 ng fragmentierter genomischer *Antirrhinum* DNA durchgeführt (b). Die DNA-Sequenzen wurden in den pCR2.1-TOPO Vektor integriert und *E. coli* Zellen mit diesen Konstrukten transformiert. Ca. 6100 einzelne Kolonien wurden auf die Anreicherung bestimmter DNA-Fragmente durch die Hybridisierung mit den unter b) angegebenen Sonden untersucht (c). Die Größe der integrierten DNA-Sequenzen der falschen Positiven wurde mittels PCR überprüft (d).



## 4 Diskussion

Die *Antirrhinum* Blüte ist aus vier unterschiedlichen Organen aufgebaut, die in konzentrischen Wirteln angeordnet sind und bestimmte Funktionen während des reproduktiven Wachstums ausüben. Die MADS-Box Transkriptionsfaktoren *DEFICIENS* und *GLOBOSA* sind die Schlüsselregulatoren für die Determination der Petalen und Stamina. Obwohl die *DEF* und *GLO* Funktionen intensiv untersucht wurden, ist noch unklar, welche Gene an der Realisierung des regulatorischen Potentials beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von *DEF* Zielgenen, um die Steuerungsprozesse, die der Petalen- und Staminaentwicklung in *Antirrhinum* zugrunde liegen, besser zu verstehen.

### 4.1 Methoden zur Identifizierung von *DEF* Zielgenen

Um die Wirkung von Transkriptionsfaktoren auf die Expression ihrer Zielgene zu untersuchen, gibt es unterschiedliche Strategien. Änderungen in der Zusammensetzung der mRNA Population in Abhängigkeit von einer Genfunktion können Aufschluß über Gene liefern, die von einem Transkriptionsfaktor in ihrer Expression reguliert werden. Dieses als Expression Profiling bezeichnete Verfahren führt zur Identifizierung von indirekten und direkten Zielgenen und wurde beispielsweise angewandt, um Zielgene der MADS-Box Transkriptionsfaktoren *AP3* und *PI* aus *Arabidopsis* zu ermitteln (Zik und Irish, 2003).

Bei induzierbaren Systemen, z.B. bei Temperatur-sensitiven Allelen, kann eine Genfunktion zu einem definierten Zeitpunkt *in vivo* reguliert werden. Die Verwendung derartiger Systeme gestattet Rückschlüsse auf Gene, deren Expressionsniveau in kurzem zeitlichen Abstand durch die Aktivitätsänderung eines Transkriptionsfaktors beeinflusst wird und die daher Kandidaten für eine direkte Kontrolle durch den untersuchten Faktor darstellen. Die Änderung im Expressionsverhalten dieser Gene kann jedoch auch durch andere Faktoren, die in einem regulatorischen Netzwerk weiter unterhalb von direkt regulierten Genen liegen, verursacht werden. Diese indirekten

Effekte können durch die posttranslationale Aktivierung eines Transkriptionsfaktors und gleichzeitiger Blockierung der Proteinsynthese umgangen werden. Posttranslationale Änderungen können beispielsweise die Translokation des untersuchten Faktors vom Zytoplasma in den Zellkern zu einem bestimmten Zeitpunkt steuern. Diese Strategie wird in Pflanzen zur Isolierung direkter Zielgene angewandt und basiert auf der Ausprägung einer posttranslationalen Fusion des untersuchten Transkriptionsfaktors mit einer Domäne des Glukocorticoid Rezeptors. Während des Wachstums werden die Fusionsproteine im Zytoplasma angereichert. Durch die Zugabe eines Steroids gelangen die Fusionsproteine in den Zellkern und gleichzeitig wird die Synthese neuer Proteine durch die Zugabe von Cyclohexamid verhindert. Als Folge können nur direkte Zielgene transkribiert werden. Mit dieser Technik wurde in *Arabidopsis* ein direktes Zielgen der MADS-Box Transkriptionsfaktoren AP3/PI isoliert (Sablowski und Meyerowitz, 1998).

Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung der von einem Transkriptionsfaktor regulierten Zielgene ist die experimentelle Bestimmung des DNA-Motivs, das bevorzugt von diesem Faktor gebunden wird („binding site selection“). Das *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)* Gen wird in *Arabidopsis* Embryonen exprimiert (Heck et al., 1995; Perry et al., 1996; Perry et al., 1999). Die Identifizierung eines von AGL15 *in vitro* mit hoher Affinität gebundenen CARG-Box Motivs ermöglichte die *in silico* Durchmusterung des *Arabidopsis* Genoms mit diesem Sequenzmotiv. Auf diese Weise wurde eine Gensequenz ermittelt, die mit X-ChIP Analysen auf eine *in vivo* Interaktion mit AGL15 untersucht wurde (Tang und Perry, 2003). Voraussetzung für diese Methode ist, daß das Genom des untersuchten Organismus sequenziert ist. Daher beschränkt sich diese Anwendung in Pflanzen momentan auf *Arabidopsis*.

Zur Identifizierung von *DEF* Zielgenen in *Antirrhinum* wurden zwei Techniken kombiniert. Die Etablierung der X-ChIP Technik in *Antirrhinum* ermöglichte die Untersuchung bekannter potentieller *DEF* Zielgene auf eine direkte Kontrolle durch DEF/GLO. Expression Profiling Studien führten zur globalen Identifizierung von direkten und indirekten Zielgenen, die im Petalenstadium 3 von *DEF* reguliert werden. Der Nachweis über eine direkte *in vivo* Bindung von DEF an Promotorsequenzen dieser Zielgene kann mittels X-ChIP Analyse erbracht werden. Darüber hinaus wurde durch

die Etablierung der X-ChIP Methode die Grundlage zur Isolierung neuer direkter *DEF* Zielsequenzen geschaffen.

#### 4.1.1 Die X-ChIP Technik zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen in Pflanzen

Eine Anwendungsmöglichkeit der X-ChIP Technik ist die Analyse der Bindungen DNA-assoziiierter Proteine an bekannte putative Zielsequenzen. Die Identifizierung distinkter von einem Protein gebundener DNA-Bereiche erfolgt hierbei durch den Nachweis der Anreicherung dieser Sequenzen in immunopräzipitierter DNA mittels PCR-Analyse.

Dieser Versuchsansatz wurde in letzter Zeit vermehrt auch in pflanzlichen Systemen eingesetzt. Beispielsweise wurde in *Arabidopsis* Zellkulturen die Bindung von Heat Shock Proteinen an Heat Shock Promotoren untersucht und ausgehend von *Nicotiana tabacum* Zellkulturen wurden funktionale Promotorbindungsstellen eines Streß-induzierbaren b-ZIP Transkriptionsfaktors identifiziert (Zhang et al., 2001; Johnson et al., 2001). Aus *Arabidopsis* Keimlingen wurde mittels Chromatin Immunopräzipitationen mit zwei unterschiedlichen anti-Histon H3 Antikörpern gezeigt, daß das Gen *DDM1* die Methylierung des Histons H3 steuert. Das Methylierungsmuster des Histons H3 hat direkten Einfluß auf die DNA-Methylierung und somit auf die Bildung heterochromosomaler Bereiche (Gendrel et al., 2002).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der X-ChIP Technik ist die Isolierung noch unbekannter Zielsequenzen durch die Klonierung immunopräzipitierter DNA-Fragmente. Bisher liegen erst zwei Studien vor, die die Isolierung von Zielgenen homöotischer Transkriptionsfaktoren aus pflanzlichen Systemen mittels X-ChIP beschreiben. Als direktes Zielgen des MADS-Box Transkriptionsfaktors AG wurde eine Serin/Threonin Kinase aus *Arabidopsis* Blüten mittels Chromatin Immunopräzipitation und Klonierung der immunopräzipitierten DNA-Fragmente isoliert. Das isolierte Fragment dieser Serin/Threonin Kinase liegt in einem weit stromabwärts lokalisierten Intron und besitzt ein putatives CARG-Box Element, das von AG *in vitro* gebunden

wird. Daher wurde ein negativer Effekt von AG auf die Expression dieser Serin/Threonin Kinase diskutiert (Ito et al., 1997).

Zwei direkte Zielgene des AGL15 Proteins, das vorwiegend in *Arabidopsis* Embryonen lokalisiert ist, wurden unter Verwendung der X-ChIP Technik aus einer *Arabidopsis* Gewebekultur isoliert (Heck et al., 1995; Perry et al., 1996; Perry et al., 1999; Wang et al., 2002). Die Gewebekultur bestand aus homogenem embryonalem Gewebe, das durch die Überexpression des *AGL15* Gens einen hohen Gehalt an AGL15 Protein aufwies. Die Überprüfung dieser Zielgenesequenzen in unabhängigen Chromatin Immunopräzipitationen unter Verwendung der embryonalen Gewebekultur und anschließender PCR-Analyse zeigte eine deutliche Anreicherung beider isolierter Zielsequenzen im Vergleich zu einer nicht von AGL15 gebundenen Sequenz. Hingegen führte die Chromatin Immunopräzipitation aus *Arabidopsis* Infloreszenzen nur zu einer äußerst schwachen Anreicherung der Zielsequenzen im Vergleich zu der nicht von AGL15 gebundenen Sequenz (Wang et al., 2002). Offensichtlich war die starke Expression von *AGL15* in der embryonalen Gewebekultur von essentieller Bedeutung für die Isolierung der beiden Zielgene. Auffallend ist, daß die CArG-Box Motive dieser Gene von dem bevorzugt von AGL15 gebundenen DNA-Motiv, wie es mittels „binding site selection“ ermittelt wurde, abweichen (Wang et al., 2002; Tang und Perry, 2003). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Bindungsaffinität eines Proteins hinsichtlich bestimmter DNA-Motive modifiziert werden kann, beispielsweise durch die Interaktion mit weiteren Faktoren.

Die beschriebenen Studien zeigten, daß Chromatin Immunopräzipitationen mit anschließender PCR-Analyse wertvolle Kenntnisse hinsichtlich der Funktion DNA-bindender Proteine liefern können. Im Gegensatz hierzu scheint die Anwendung der X-ChIP Technik zur Isolierung neuer Zielgene schwierig: so wurde bisher erst eine geringe Anzahl neuer Zielgene ermittelt.

In *Antirrhinum* wurden X-ChIP Experimente zur Analyse von *DEF* Zielgenen mit unterschiedlichen Blütengeweben durchgeführt, um eine Unterscheidung zwischen frühen und späten direkten *DEF* Zielgenen zu ermöglichen. Diese Stadien- und Organ-spezifischen Untersuchungen waren durch die Größe der *Antirrhinum* Blüte möglich.

Die X-ChIP Analysen mit Petalen im Entwicklungsstadium 3 wurden zudem zur Ergänzung von Expression Profiling Daten eingesetzt. Für die Identifizierung direkter *DEF* Zielgene war die ausgesprochen starke Expression des Gens während der Blütenorganogenese von besonderer Bedeutung. So wurde für *Drosophila* Embryonen gezeigt, daß das untersuchte Protein in mindestens 10 % des Gewebes ausgeprägt werden muß, um eine effiziente X-ChIP Analyse durchführen zu können (Walter und Biggin, 1997).

Zur Fixierung pflanzlichen Materials wurden unterschiedliche methodische Ansätze verfolgt (Ito et al., 1997; Zhang et al., 2001; Wang et al., 2002; Gendrel et al., 2002). Kovalente Bindungen zwischen Proteinen und DNA-Sequenzen können durch die Behandlung mit Formaldehyd oder durch die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht gebildet werden (Kuo und Allis, 1999). Formaldehyd ist ausgesprochen reaktiv und kann aufgrund seiner geringen Größe das Gewebe schnell durchdringen. Zudem sind die durch Formaldehyd gebildeten kovalenten Bindungen leicht revertierbar. Die Bestrahlung mit UV-Licht eignet sich für Zellkulturen und Kernextrakte und führt zu einer sehr effizienten Fixierung von Proteinen an die DNA (Toth und Biggin, 2000). Jedoch verursacht die UV-Strahlung beträchtliche DNA-Schäden, unter anderem Einzelstrangbrüche. Die Einzelstrangbrüche behindern die PCR-Analyse der immunopräzipitierten DNA-Sequenzen, so daß nur kurze DNA-Bereiche mittels PCR auf eine Anreicherung überprüft werden können (Zhang et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit waren unterschiedliche Kriterien für die Wahl der Fixierungsbedingungen ausschlaggebend. Das Material sollte direkt, ohne vorherige Extraktion der Zellkerne, fixiert werden. Zudem sollten die DNA-Fragmente nach der Ultraschallbehandlung des fixierten Chromatins eine Länge zwischen 0,4 – 4 kb haben, um etwa 500 bp lange Promotorbereiche mittels PCR-Analyse erfassen zu können. Bei einer Klonierung von immunopräzipitierten DNA-Sequenzen würden aufgrund der Fragmentgröße zusätzlich zu regulierenden Bereichen eines Gens eventuell auch kodierende Regionen abgedeckt und somit die Identifizierung der Gene erleichtert. Durch die Optimierung einzelner Arbeitsschritte (Fixierung von *Antirrhinum* Material, Fragmentierung des fixierten Chromatins, etc.) wurde die X-ChIP Technik für Infloreszenzen, Petalen und Stamina in *Antirrhinum* etabliert.

#### 4.1.2 Die polyklonalen Seren anti-DEF D39/2 und anti-GLO GLO/2 zeigen eine spezifische Antigenerkennung

Es wurden neue polyklonale anti-DEF und anti-GLO Seren hergestellt. In X-ChIP Experimenten zeigten eins von vier anti-DEF und eins von zwei anti-GLO Seren eine spezifische Anreicherung eines 467 bp langen *GLO* Promotorfragments, welches von DEF/GLO *in vivo* erkannt und gebunden wird (vgl. Abschn. 3.2; siehe auch spätere Diskussionspunkte). Die Spezifität der Antigenerkennung der anti-DEF und anti-GLO Seren wurde in unabhängigen Tests mittels Western Blot Analyse bestätigt. In Kernextrakten von *Antirrhinum* Wildtyp Infloreszenzen wurden spezifisch ~ 26 kDa große DEF bzw. GLO Proteine erkannt. In Kernextrakten der *def* Nullmutante *def-177b* wurden keine DEF und GLO Proteine detektiert.

Im Serum vorhandene unspezifische Antikörper können zur Immunopräzipitation ebenfalls unspezifischer Proteine führen. Um die Spezifität der Chromatin Immunopräzipitationen zu erhöhen, wurden das anti-DEF D39/2 und das anti-GLO GLO/2 Serum über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Ausbeuten an aufgereinigten anti-DEF und anti-GLO Antikörpern waren für umfangreiche X-ChIP Experimente zu gering, so daß polyklonale anti-DEF und anti-GLO Seren für Chromatin Immunopräzipitationen verwendet wurden.

#### 4.2 Überprüfung der autoregulatorischen Mechanismen der späten *GLO* und *DEF* Expression

Expressionsanalysen der *DEF* und *GLO* Gene in unterschiedlichen *def* und *glo* Allelen und *in vitro* Bindungsstudien von DEF/GLO Heterodimeren mit *DEF* und *GLO* Promotorsequenzen wiesen auf einen direkten autoregulatorischen Mechanismus der späten *DEF* und *GLO* Expression hin (Schwarz-Sommer et al., 1992; Tröbner et al., 1992; Zachgo et al., 1995). Um zu überprüfen, ob der autoregulatorische Mechanismus der späten *DEF* und *GLO* Expression in der Tat auf einer direkten Interaktion von DEF/GLO mit Bereichen der *DEF* und *GLO* Promotoren beruht, wurden Chromatin Immunopräzipitationen mit anschließender PCR-Analyse durchgeführt.

#### 4.2.1 DEF/GLO wirkt über eine direkte Interaktion mit dem *GLO* Promotor aktivierend auf die *GLO* Expression

Für die Überprüfung einer *in vivo* Bindung von DEF/GLO an den *GLO* Promotor wurde eine 467 bp lange *GLO* Promotorregion ausgewählt, die die *in vitro* von DEF/GLO gebundenen CARG-Box Motive CARG2 und CARG3 umfasst („*GLO-1*“; Tröbner et al., 1992). Die Interaktion von DEF/GLO mit diesem Sequenzabschnitt wurde *in vivo* mit der X-ChIP Technik in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Durch diese Untersuchungen wurden zwei Zielsetzungen verfolgt: zum einen sollte der Nachweis der DEF/GLO Bindung an den *GLO* Promotor *in vivo* erbracht werden und darüber hinaus der Nachweis über die Anreicherung dieser *GLO* Promotorsequenz als positive Kontrolle für weitere X-ChIP Experimente eingesetzt werden können.

Als Kriterium zur Zuordnung von direkten *DEF* Zielgenen wurde eine Anreicherung bestimmter Sequenzen im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum gewählt. Zusätzlich mußte die Konzentration an *DEF* Zielsequenzen höher sein als an Sequenzen, die von DEF/GLO nicht gebunden wurden, beispielsweise „*GLO-3*“ oder „*RAN3*“, die in geringen Konzentrationen in immunopräzipitierter DNA nachgewiesen wurden. Geringe Mengen an PCR-Produkt (etwa 10 ng), die auf dem Vorhandensein von unspezifischen Sequenzen basierten, wurden als Hintergrund betrachtet.

DNA wurde mit einem anti-DEF Serum aus unterschiedlichem fixierten *Antirrhinum* Blütenmaterial immunopräzipitiert und mittels PCR auf den Gehalt an unterschiedlichen *GLO* Fragmenten untersucht. In jungen Infloreszenzen sowie in Petalen und in Stamina späterer Entwicklungsstadien wurde eine *in vivo* Bindung von DEF/GLO an einen proximalen *GLO* Promotorbereich nachgewiesen („*GLO-1*“). *GLO* Promotorregionen, die das CARG1-Motiv umspannten oder weiter stromaufwärts der DEF/GLO Bindungsstelle gelegene Sequenzabschnitte wurden *in vivo* nicht gebunden. Die Hochregulierung und Aufrechterhaltung der späten *GLO* Expression ist somit von der Bindung von DEF/GLO an proximale Promotorbereiche abhängig.

Durch diese Chromatin Immunopräzipitationen wurde erstmalig nachgewiesen, daß die autoregulatorische Kontrolle der späten *GLO* Expression auf einer Bindung von

DEF/GLO an die Motive CARG2 und CARG3 des *GLO* Promotors beruht. Diese Interaktion wurde in allen untersuchten Entwicklungsstadien bestätigt.

#### **4.2.2 Multimere Proteinkomplexe sind an der Bindung des *GLO* Promotors beteiligt**

Verschiedene Studien zeigten, daß die DNA-Bindung von MADS-Domäne Proteinen nicht nur durch dimere, sondern auch durch multimere Komplexe vermittelt wird (Egea-Cortines et al., 1999; Honma und Goto, 2001). In *Antirrhinum* zeigte der ternäre Komplex DEF/GLO/SQUA im Vergleich zu den entsprechenden dimeren Komplexen (DEF/GLO oder SQUA/SQUA) *in vitro* eine stark erhöhte Bindungsaffinität für einen *GLO* Promotorbereich, der die CARG-Box Motive CARG2 und CARG3 umschließt. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, daß die Interaktion von DEF/GLO mit weiteren Faktoren in einer spezifischeren Bindung der Zielsequenzen resultiert (Egea-Cortines et al., 1999). Daher ist die mittels X-ChIP Analyse nachgewiesene direkte Interaktion von DEF/GLO mit dem *GLO* Promotor vermutlich auf einen ternären oder multimeren Komplex, der DEF/GLO enthält, zurückzuführen. Für die funktional homologen Proteine in *Arabidopsis*, AP3 und PI, wurden Interaktionen mit dem Klasse A Protein AP1 nachgewiesen, die mit dem ternären Komplex DEF/GLO/SQUA in *Antirrhinum* vergleichbar sind (Honma und Goto, 2001; Egea-Cortines et al., 1999). Diese Studien in den entfernt verwandten Spezies *Antirrhinum* und *Arabidopsis* weisen auf konservierte Mechanismen hinsichtlich der Zusammenlagerung verschiedener MADS-Domäne Proteine in multimeren Komplexen hin.

Voraussetzung für die Bildung von ternären oder multimeren Komplexen ist die Kolokalisierung der in den Komplex involvierten Faktoren in überlappenden Bereichen der Blüte. *DEF* und *GLO* werden überwiegend im zweiten und dritten Blütenwirtel stark exprimiert (Schwarz-Sommer et al., 1992; Tröbner et al., 1992). Das *SQUA* Gen wird früh im floralen Meristem exprimiert. Im Verlaufe weiterer Entwicklungsschritte wird *SQUA* in floralen Organen mit Ausnahme des dritten Wirtels exprimiert (Huijser et al., 1992). Aufgrund der überlappenden Lokalisierungen der DEF, GLO und SQUA Proteine im zweiten Wirtel ist die Bildung eines ternären Komplexes dieser Faktoren

*in vivo* möglich. Da SQUA nicht im dritten Wirtel exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob weitere Proteine an der mittels X-ChIP nachgewiesenen *in vivo* Interaktion von DEF/GLO mit dem *GLO* Promotor im dritten Wirtel beteiligt sind oder ob DEF/GLO als Dimer wirkt.

AG, das Klasse C Gen in *Arabidopsis*, wird im dritten und vierten Wirtel exprimiert und kontrolliert im dritten Wirtel in Kombination mit den Klasse B Genen die Entwicklung der Stamina (Yanofsky et al., 1990). Untersuchungen in Hefesystemen zeigten, daß dieser kombinatorische Effekt im dritten Wirtel nicht auf eine direkte Interaktion von AG mit AP3 und PI, sondern auf die Bildung des multimeren Komplexes AP3/PI/SEP3/AG zurückzuführen ist. In diesem Komplex vermittelt das Klasse E Protein SEP3 die Interaktion zwischen dem Klasse C Protein AG und den Klasse B Proteinen AP3 und PI (Honma und Goto, 2001).

Das *Antirrhinum* Klasse C Protein PLE interagiert nicht direkt mit DEF und GLO (H. Sommer, unveröffentlichte Daten). Jedoch wurden Interaktionen der Klasse C Proteine PLE und FAR mit den Klasse E Proteinen DEFH72 und DEFH200 in Hefe-2-Hybrid Systemen beobachtet (Davies et al., 1996, Davies et al., 1999). Unter der Annahme, daß die grundlegenden Kontrollmechanismen der Blütenentwicklung in *Arabidopsis* und *Antirrhinum* vergleichbar sind, würde dies bedeuten, daß DEF/GLO im dritten Wirtel durch die Interaktion mit einem Klasse E Protein einen multimeren Komplex mit einem Klasse C Protein bildet und dieser Komplex die Entwicklung der Stamina reguliert.

Diese Überlegungen werfen die Frage auf, welcher Faktor letztendlich aktivierend auf die späte *GLO* Expression wirkt. In Hefezellen und in Zwiebel-Epidermiszellen wurden verschiedene *Arabidopsis* Organidentitätsproteine auf das Vorhandensein einer Transaktivierungsdomäne untersucht. Die PI, AP3 und AG Proteine verfügen über keine Transaktivierungsdomäne (Honma und Goto, 2001). Aufgrund der funktionalen Ähnlichkeit von DEF, GLO und PLE zu AP3, PI und AG ist anzunehmen, daß DEF, GLO und PLE ebenfalls keine Transaktivierungsdomäne besitzen. Hingegen verfügt AP1, das Homologe des *Antirrhinum* Proteins SQUA in *Arabidopsis*, über eine Transaktivierungsdomäne, die überwiegend im C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Honma und Goto, 2001). Auf *Antirrhinum* übertragen würde dies bedeuten, daß

DEF/GLO im Kontext mit SQUA im zweiten Blütenwirtel direkt an den *GLO* Promotor binden (vgl. Egea-Cortines et al., 1999) und eine vermutlich im C-Terminus von SQUA lokalisierte Transaktivierungsdomäne die starke späte Expression von *GLO* steuert. Das Klasse E Protein SEP3 in *Arabidopsis* besitzt eine starke Transaktivierungsdomäne, die in Hefe- und Pflanzenzellen aktivierend auf die Expression eines Reportergens wirkt. Daher könnte in *Antirrhinum* im dritten Blütenwirtel die späte *GLO* Expression durch die Bindung eines ternären Komplexes (DEF/GLO/KlasseE-Protein/KlasseC-Protein) an die CArG-Box Elemente des *GLO* Promotors vermittelt und die Hochregulierung der *GLO* Expression durch eine Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich der Klasse E Proteine DEFH200 oder DEFH72 kontrolliert werden.

#### 4.2.3 Diskussion möglicher Kontrollmechanismen der späten *DEF* Expression

In der *def-chlorantha* Mutante wird die späte *DEF* Expression, bedingt durch eine Mutation 32 bp stromaufwärts des CArG-Box Elements im proximalen Bereich des Promotors, stark reduziert. Diese Mutation weist auf die Signifikanz dieser weit stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegenen Sequenzabschnitte für die späte *DEF* Expression hin (Schwarz-Sommer et al., 1992).

Eine *DEF* Promotorregion („*DEF-1*“), die eine *in vitro* von DEF/GLO gebundene CArG-Box etwa 1,2 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts umschließt (Tröbner et al., 1992; Zachgo et al., 1995), wurde in Chromatin Immunopräzipitationen, wider Erwarten, nur schwach angereichert. Diese geringe Anreicherung kann unterschiedliche Ursachen haben. Es könnte darauf hindeuten, daß der untersuchte Promotorbereich *in vivo* nicht gebunden wird und die beobachtete *in vitro* Bindung von DEF/GLO an das CArG-Box Motiv *in vivo* nicht stattfindet. Diese Interaktion vollkommen auszuschließen ist jedoch schwierig, weil in Chromatin Immunopräzipitationen Epitope aufgrund der Quervernetzungen im fixierten Gewebe verdeckt werden können und von den Antikörpern nicht mehr oder nur schwach erkannt werden (Orlando, 2000). Dies würde in X-ChIP Experimenten zu einer geringeren Anreicherungen dieser Komplexe und der gebundenen DNA-Sequenzen führen. Da die bisherigen Studien zeigten, daß DEF und GLO als Heterodimere in einem multimeren Komplex wirken, können

Chromatin Immunopräzipitationen mit einem anti-GLO Antikörper durchgeführt werden, wie es erfolgreich in Abb. 3.2 für das „*GLO-1*“ Promotorfragment dokumentiert wurde. Hierdurch könnte die mögliche Verdeckung von Epitopen durch die Verwendung eines anderen Antikörpers umgangen werden.

#### **4.2.4 Die späte Expression von *GLO* in *Antirrhinum* und *AP3* in *Arabidopsis* könnte durch ähnliche Regulationsmechanismen gesteuert werden**

Mit der Bildung der Sepalenprimordien setzt die *GLO* Expression zwischen den Primordien des ersten Wirtels und dem Blütenzentrum ein. Während der Blütenentwicklung wird *GLO* stark im zweiten und dritten Wirtel exprimiert. Eine schwache *GLO* Expression wurde in ausdifferenzierten Karpellen detektiert (Tröbner et al., 1992). Obwohl *AP3* das *DEF* Ortholog in *Arabidopsis* ist, zeigt *AP3* ein zu *GLO* vergleichbares räumliches und zeitliches Expressionsmuster. Nach Initiierung der Sepalenprimordien wird *AP3* in Bereichen der Blüte exprimiert, in denen im weiteren Verlauf der Entwicklung Petalen und Stamina gebildet werden. Die Expression wird während der weiteren Blütenentwicklung in Petalen und Stamina aufrechterhalten. Eine schwache *AP3* Expression wurde spät in den Integumenten der Ovulen nachgewiesen (Jack et al., 1992).

Der *AP3* Promotor ist aus Modulen aufgebaut, die unterschiedliche Aspekte der frühen und späten *AP3* Expression steuern (Hill et al., 1998). Der *AP3* Promotor besitzt drei CArG-Box Motive (bezeichnet als CArG1, CArG2 und CArG3), die zwischen den Positionen - 180 bis - 90 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert sind. Zwei dieser Motive werden *in vitro* von *AP3/PI* Heterodimeren bzw. *AG* und *AP1* Homodimeren gebunden (Tilly et al, 1998; Hill et al., 1998). Die beiden von dem ternären Komplex *DEF/GLO/SQUA* gebundenen CArG-Box Motive des *GLO* Promotors liegen zwischen -110 und - 50 relativ zum Transkriptionsstart (Tröbner et al., 1992; Egea-Cortines et al., 1999).

*In vivo* Expressionsanalysen wurden mit einem synthetischen *AP3* Promotor-*GUS*-Reportergen Konstrukt durchgeführt, das einen 143 bp langen Sequenzabschnitt des

*AP3* Promotors in einer dreifachen Sequenzwiederholung enthält und die drei CArG-Box Motive umschließt. Dieses Konstrukt steuert die Expression des *GUS* Reportergens in einem räumlichen und zeitlichen Muster, das mit dem gesamten 3,7 kb langen *AP3* Promotor vergleichbar ist. Mutationen einzelner CArG-Box Motive in dem synthetischen *AP3* Promotor Konstrukt zeigten, daß von den drei CArG-Box Motiven offenbar nur zwei funktional relevant sind (Tilly et al., 1998).

Die Übereinstimmungen in den Expressionsmustern beider Gene zusammen mit der Anzahl und Positionen der funktionalen CArG-Box Motive im proximalen Promotor lassen vermuten, daß der Regulation der späten *GLO* und *AP3* Expression ähnliche Mechanismen zugrunde liegen. Chromatin Immunopräzipitationen in *Antirrhinum* zeigten, daß die CArG-Box Motive CArG2 und CArG3 *in vivo* von DEF/*GLO* gebunden werden und diese Interaktion wahrscheinlich für die späte *GLO* Expression essentiell ist. Der hier aufgestellte Vergleich deutet auf konservierte Mechanismen hin, die die späte *GLO* Expression in *Antirrhinum* und die späte *AP3* Expression in *Arabidopsis* steuern.

### 4.3 *DEFH125* wird durch DEF/*GLO* negativ reguliert

Durch Chromatin Immunopräzipitationen wurde gezeigt, daß DEF/*GLO* zwei benachbarte Sequenzabschnitte in einem 0,9 kb langen *DEFH125* Promotorbereich unmittelbar stromaufwärts des Startkodons bindet. Eine starke Anreicherung dieser Promotorregionen wurde in späten Entwicklungsstadien in Petalen und Stamina im Vergleich zu jungen Infloreszenzen festgestellt. *DEFH125* wird überwiegend in Mikrosporen exprimiert (Zachgo et al., 1997). Demgegenüber wurde *DEF* Transkript in weiten Bereichen der Petalen und Stamina, nicht jedoch in sporogenem Gewebe nachgewiesen (Schwarz-Sommer et al., 1992). Die komplementären Expressionsmuster zusammen mit den X-ChIP Daten weisen auf eine Reprimierung der *DEFH125* Expression in Petalen und Stamina hin, die auf eine Bindung von DEF/*GLO* an den *DEFH125* Promotor zurückgeht. Wie kann der direkte reprimierende Effekt von DEF/*GLO* auf die *DEFH125* Expression erklärt werden? Bislang sind für pflanzliche Transkriptionsfaktoren nur wenige Mechanismen bekannt, die zu einer Reprimierung

von Zielgenen führen. Durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren kann eine aktivierende Domäne verdeckt und somit die Aktivierung des Gens verhindert werden (Liu et al., 1999). Eine negative Regulation könnte auch durch die Interaktion mit einem Repressor bedingt sein. Beispielsweise bindet das bZIP Protein ROM2 aus *Phaseolus vulgaris* an *cis*-Elemente im Promotor des *DLEC2* Gens und verhindert über eine N-terminal lokalisierte Repressor-Domäne die von dem Faktor PvALF vermittelte Aktivierung des *DLEC2* Gens (Chern et al., 1996). Denkbar ist auch eine kompetitive Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren an das gleiche *cis*-Element. Dies würde zum Ausschluß eines aktivierenden Faktors an diese Bindungsstelle führen. Ein derartiger Regulationsmechanismus wurde für pflanzliche Transkriptionsfaktoren bisher jedoch noch nicht nachgewiesen (Liu et al., 1999). Eine nur 12 Aminosäuren lange Repressordomäne wurde in dem TFIIIA-Typ Zinkfingerprotein SUPERMAN (SUP) aus *Arabidopsis* und weiteren aus anderen pflanzlichen Spezies isolierten Proteinen nachgewiesen. Diese Domäne ist in der Lage, stark aktivierende Transkriptionsfaktoren in Repressoren umzuwandeln, wie es mittels der Ausprägung von Fusionsproteinen in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen gezeigt wurde (Hiratsu et al., 2003). Für pflanzliche MADS-Domäne Proteine wurden jedoch noch keine Domänen identifiziert, die einen reprimierenden Effekt auf die Transkription der gebundenen Gene ausüben.

In Hefe sind vielfältige Interaktionen des MADS-Box Transkriptionsfaktors MCM1 mit Homöodomäne Proteinen bekannt, die zur Reprimierung von Genen führen (Tan und Richmond, 1998; Pramila et al., 2002). Beispielsweise bindet MCM1 konstitutiv an Early cell cycle box (ECB) Elemente in den Promotoren der Gene *CLN3* und *SWI4*, wodurch diese Gene aktiviert werden. Durch die transiente Interaktion von MCM1 mit dem Homöoboxprotein Yox1 während der späten G1 und M Phase werden diese Gene reprimiert (Pramila et al., 2002).

Die Bindung des *DEFH125* Promotors durch DEF/GLO erfolgt verstärkt in älteren Entwicklungsstadien. Wie zuvor bereits erwähnt wurde, führte die Chromatin Immunopräzipitation mit einem anti-DEF Serum aus Infloreszenzen zu einer schwachen Anreicherung von *DEFH125* Promotorsequenzen, während diese Sequenzen in X-ChIP Experimenten mit älteren Petalen und Stamina stark angereichert wurden. Diese Beobachtung weist auf eine Erhöhung der DNA-Bindungsaffinität von DEF/GLO für

die in dem *DEFH125* Promotor lokalisierten CArG-Box Motive im Verlaufe der Blütenorganogenese hin. Die geänderte DNA-Bindungsaffinität wird vermutlich durch weitere Faktoren bewirkt, die an der Bindung des *DEFH125* Promotors durch DEF/GLO beteiligt sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß DEF sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen ausüben kann. Aufgrund der funktionalen Ähnlichkeit von DEF und GLO zu AP3 und PI in *Arabidopsis* besitzen die DEF und GLO Proteine vermutlich keine Transaktivierungsdomäne. Die Aktivierung bestimmter Gene (z.B. *GLO*) könnte durch eine Interaktion von DEF/GLO mit weiteren MADS-Domäne Proteinen, die über eine Transaktivierungsdomäne verfügen, kontrolliert werden. Ein von DEF/GLO gesteuerter reprimierender Effekt, wie er bei dem *DEFH125* Gen nachgewiesen wurde, könnte durch die Wirkung weiterer interagierender nicht-MADS-Domäne Proteine bedingt sein.

#### **4.4 Die Kombination von Macroarray Daten und X-ChIP Technik führten zur Identifizierung eines direkten *DEF* Zielgens**

In homöotischen Mutanten werden Organe an für sie untypischen Positionen gebildet, was zum Verlust der normalerweise in dieser Position gebildeten Organe führt. In den *def* und *glo* Nullmutanten werden anstelle von Petalen Sepalen und anstelle von Stamina Karpelle gebildet. Die Expression von Zielgenen, die in späten Stadien der Blütenorganogenese aktiviert werden, kann abhängig sein von der Ausprägung bestimmter Strukturen (z.B. bei Petalen- oder Stamina-spezifisch exprimierten Genen). Die Verwendung von konditionellen Mutanten, bei denen die Aktivität des untersuchten Gens durch exogene Faktoren reguliert werden kann, ist für die Untersuchung von homöotischen Genen mittels Expression Profiling von Vorteil, da die Genfunktion gezielt nach der Ausprägung floraler Strukturen beeinflusst werden kann.

Unter Verwendung von Petalenmaterial im Entwicklungsstadium 3 der Temperatursensitiven *def-101* Mutante wurden mittels Expression Profiling Studien Änderungen in der Expression von 11600 Genen in Abhängigkeit von der *DEF* Funktion untersucht.

Diese Studien führten zu der Identifizierung von 108 direkten und indirekten *DEF* Zielgenen, deren Expression durch die Reduktion der *DEF* Funktion geändert wurde. Die Anzahl an aktivierten und reprimierten Genen war vergleichbar (55 aktivierte und 53 reprimierte Gene; M. Bey, unveröffentlichte Daten). Als Kriterium zur Auswahl von putativen direkten *DEF* Zielgenen wurde die Schnelligkeit, mit der die Expressionsstärke der Gene auf eine Reduktion der *DEF* Funktion reagierten, gewählt.

Fünf Gene wurden ausgewählt, deren Expression bereits 24 Stunden nach Reduktion der *DEF* Funktion eine starke Aktivierung (*DEFTup1*, *DEFTup2*) oder Reprimierung (*DEFTdown1*, *DEFTdown2*, *DEFTdown3*) erfuhren. Frau M. Bey isolierte Promotorbereiche dieser Gene mittels der RAGE Technik und ermittelte Regionen, in denen vorhandene CA<sub>2</sub>G-Boxen indikativ für eine Bindung von DEF/GLO sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Regionen mittels Chromatin Immunopräzipitationen mit *Antirrhinum* Petalen und dem anti-DEF Serum D39/2 auf die Bindung durch DEF/GLO untersucht.

In X-ChIP Experimenten wurde *DEFTup1* eindeutig als direktes *DEF* Zielgen identifiziert. Auf Aminosäureebene zeigt *DEFTup1* Ähnlichkeit zu Extensin-Proteinen. Extensine sind glykosylierte Strukturproteine, die Polymere bilden und als Zellwandkomponenten zur Stabilisierung der Zelle beitragen. Die Synthese und Immobilisierung der Extensine steht vermutlich unter einer entwicklungsbiologischen Kontrolle und kann durch verschiedene äußere Faktoren ausgelöst werden (Dey et al., 1997; Showalter, 1993; Keller, 1993). *DEFTup1* wird stark in Petalen und Stamina und schwach in den Karpellen exprimiert. In vegetativen Organen (Blatt, Stengel) wird es schwach ausgeprägt. Eine Hochregulierung der *DEFTup1* Expression wurde in Petalen erst in späteren Entwicklungsstadien, in denen die Zellen ein starkes Streckungswachstum durchlaufen, beobachtet (M. Bey, persönliche Mitteilung). Von den drei in Chromatin Immunopräzipitationen untersuchten jeweils etwa 500 bp langen *DEFTup1* Promotorbereichen wurde eine direkte Interaktion von DEF/GLO mit zwei benachbarten Promotorabschnitten festgestellt. Demzufolge wird in späten Entwicklungsstadien die Aktivierung dieses Gens durch eine direkte Interaktion von DEF/GLO mit regulatorischen Elementen im *DEFTup1* Promotor, die zwischen -1980 und -870 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert sind, vermittelt. Diese

Untersuchungen zeigten, daß *DEF* einen unmittelbaren positiven Effekt auf die Expression von Strukturproteinen ausübt. Die spät in der Blütenorganogenese erfolgende Aktivierung des *DEFTup1* Gens durch DEF/GLO weist auf ein geändertes *DEF* Zielgenspektrum während der Blütenentwicklung hin. Diese hinsichtlich unterschiedlicher *DEF* Zielgene geänderte DNA-Bindungsaffinität wird vermutlich durch die Interaktion mit anderen Faktoren bestimmt.

Das Gen *DEFTdown2* kodiert ein Protein, das Ähnlichkeit zur  $\beta$ -Glukosidase (AT2G44480) in *Arabidopsis* hat (M. Bey, persönliche Mitteilung). In der Zelle liegen viele Substanzen als inaktive Konjugate zwischen einem Molekül und einem Zuckerrest vor. Die hydrolytische Abspaltung des Zuckerrestes durch eine  $\beta$ -Glukosidase führt zur Freisetzung und Aktivierung der Substanzen (Hartung et al., 2002; Chen et al., 1995). *DEFTdown2* wird ausschließlich im ersten und vierten Wirtel exprimiert. Das Gen *DEFTdown3* kodiert ein hypothetisches Protein und zeigt ein breites Expressionsspektrum in vegetativen und floralen Organen. In Blütenorganen wird *DEFTdown3* stark in Sepalen und deutlich schwächer in Petalen, Stamina und Karpellen exprimiert. Promotorbereiche der Gene *DEFTdown3* und *DEFTdown2* wurden in X-ChIP Experimenten im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmenserum schwach angereichert. Allerdings war die Anreicherung der zur Verfügung stehenden Promotorfragmente zu gering, um diese Gene definitiv als direkte *DEF* Zielgene einordnen zu können. Der isolierte *DEFTdown2* Promotorbereich umfasste nur etwa 600 bp und enthält ein putatives CArG-Box Motiv (M. Bey, persönliche Mitteilung). Es ist jedoch möglich, daß in weiter distal gelegenen Promotorbereichen CArG-Box Motive existieren, die von DEF/GLO *in vivo* gebunden werden. Aufgrund des zu *DEF* komplementären Expressionsmusters und dem nachgewiesenen negativen Effekt der *DEF* Funktion auf die Expression dieses Gens wäre es äußerst interessant, weitere Promotorbereiche mittels der X-ChIP Technik auf eine direkte Interaktion mit DEF/GLO zu untersuchen. Sollten diese Experimente eine *in vivo* Interaktion von DEF/GLO mit Sequenzabschnitten des *DEFTdown2* Gens bestätigen, könnte durch X-ChIP Experimente mit *Antirrhinum* Infloreszenzen der Zeitpunkt, zu dem DEF/GLO mit dem *DEFTdown2* Promotor interagieren, genauer bestimmt werden.

Eine eindeutige Anreicherung von Promotorfragmenten der Gene *DEFTup2* und *DEFTdown1* wurde nicht beobachtet.

#### 4.5 Limitierungen der X-ChIP Technik

Obwohl die X-ChIP Technik wichtige Aufschlüsse über die Funktion DNA-bindender Proteine liefern kann, ist die Anwendung einigen Einschränkungen unterworfen.

##### 4.5.1 Wahl der verwendeten Antikörper

Für Immunopräzipitationen von Protein-DNA Komplexen werden monoklonale oder polyklonale Antikörper eingesetzt (Übersichtsartikel von Kuo und Allis, 1999).

Aufgereinigte monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Protein-Markierungen (HA, HIS, MYC u. a.) sind kommerziell erhältlich, so daß die arbeits- und kostenintensive Herstellung polyklonaler Antikörper umgangen werden kann. Voraussetzung für die Verwendung monoklonaler Antikörper ist die Herstellung transgener Pflanzen, die eine posttranslationale Fusion mit einem Markierungsmolekül ausprägen. Die Verwendung monoklonaler Antikörper in Chromatin Immunopräzipitationen bringt jedoch auch entscheidende Nachteile mit sich: Voraussetzung sind effiziente Transformationsmethoden, die nicht für alle Organismen möglich sind. So ist die Transformation von *Antirrhinum* zeitaufwendig und es werden nur wenige Linien pro Transformationsansatz produziert. Zudem werden in X-ChIP Experimenten Protein-DNA Komplexe untersucht. MADS-Domäne Transkriptionsfaktoren üben ihre Funktion nicht allein, sondern im Kontext mit weiteren Proteinen aus (Egea-Cortines et al., 1999; Honma und Goto, 2001; Theissen und Saedler, 2001; Masiero et al., 2002; Gamboa et al., 2001). Demzufolge sind große Bereiche des untersuchten MADS-Domäne Proteins in Interaktionen mit weiteren Proteinen beteiligt. Diese Bereiche sind für die Bindung eines Antikörpers nur schlecht oder gar nicht zugänglich. Bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers besteht das Risiko, daß die kurze Aminosäuresequenz, die von dem Antikörper erkannt wird,

durch Protein-Protein Interaktionen verdeckt und somit nicht gebunden wird. Dies würde eine Anreicherung dieser Komplexe in Chromatin Immunopräzipitationen verhindern.

Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern erkennen polyklonale Antikörper nicht nur ein Epitop, sondern unterschiedliche Bereiche eines Proteins und können auch Proteinkomplexe noch erfolgreich präzipitieren. Daher werden meistens polyklonale Antikörper für Chromatin Immunopräzipitationen verwendet (Botquin et al., 1998; Carr und Biggin, 1999; Molle et al., 2003; Kuo et al., 2000; Johnson und Bresnick, 2002; Strutt et al., 1997; Orlando et al., 1998).

#### **4.5.2 Bedeutung von quantitativen Aspekten für die Chromatin Immunopräzipitation**

Verschiedene Faktoren haben Einfluß auf die Anreicherung von *DEF* Zielensequenzen in Chromatin Immunopräzipitationen. Hierzu zählen die Gewebe-spezifische Expression der Zielgene, die Epitopzugänglichkeit von DEF oder GLO Proteinen in multimeren Proteinkomplexen und die transiente, nur während bestimmter Entwicklungsstadien stattfindende Bindung von Zielensequenzen durch DEF/GLO. Diese Einschränkungen werden im folgenden für einige potentielle *DEF* Zielgene detaillierter diskutiert.

*MIXTA*, ein Myb-Transkriptionsfaktor, der die Bildung konischer Zellen in der inneren epidermalen Zellschicht der Petalen steuert, wird erst spät in der Petalenentwicklung in der Epidermis ausgeprägt (Noda et al., 1994; Martin et al., 2002). Mittels *in vitro* Bindungsstudien wurden erste Hinweise auf eine direkte Bindung von DEF/GLO und einem weiteren MADS-Domäne Protein an den *MIXTA* Promotor erbracht (Martin et al., 2002). Aus Petalen mit einem anti-DEF Serum immunopräzipitierte DNA zeigte keine eindeutige Anreicherung einer etwa 700 bp langen *MIXTA* Promotorregion, die ein CArG-Box Motiv umschließt. Die Bindung von DEF/GLO an den *MIXTA* Promotor, die zu der Aktivierung von *MIXTA* führen würde, würde ausschließlich in den epidermalen Zellen der Petalen in späten Entwicklungsstadien stattfinden. Im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführte X-ChIP Analysen konnten keine eindeutige *in vivo* Bindung nachweisen. Dieses quantitative Problem eines *in vivo* Bindungsnachweises besteht bei allen *DEF* Zielgenesequenzen, deren Expression in einem eng definierten Entwicklungsstadium oder in räumlich stark begrenzten Bereichen durch die Bindung von DEF/GLO an Promotorregionen gesteuert wird. Diese Gene werden in Chromatin Immunopräzipitationen nur geringfügig angereichert, wodurch die Identifizierung dieser Sequenzen als direkte *DEF* Zielgene beeinträchtigt wird.

Ein weiteres Problem, das die Identifizierung direkter *DEF* Zielgene erschweren kann, ist die Verdeckung antigener Bereiche des DEF Proteins durch die Bildung multimerer Komplexe (siehe auch Abschn. 4.5.1). Dies würde den quantitativen Nachweis einer *in vivo* Interaktion von DEF/GLO mit regulatorischen Elementen erschweren oder sogar verhindern. Dieses Problem spielte vermutlich bei der X-ChIP Analyse des *DEF* Promotors eine entscheidende Rolle.

Die X-ChIP Analyse des *DEFH84* Gens resultierte in einer nur schwachen Anreicherung eines bestimmten Promotorbereichs. Diese Ergebnisse ließen keine Schlußfolgerungen über eine direkte Bindung des *DEFH84* Promotors durch DEF/GLO zu. Diese schwache Anreicherung kann auf einer transienten Bindung des *DEFH84* Promotors durch DEF/GLO beruhen oder könnte durch die Verdeckung von Bereichen des DEF Proteins verursacht werden.

Da DEF/GLO als Heterodimere in einem multimeren Komplex an bestimmte DNA-Motive binden, könnten X-ChIP Experimente anstelle mit dem anti-DEF Serum auch mit dem anti-GLO Serum durchgeführt werden. Auf diese Weise können mögliche Interaktionen, wie sie für die *DEF* und *DEFH84* Promotoren diskutiert wurden, überprüft werden.

#### **4.5.3 Regulatorische Elemente können in Intronsequenzen lokalisiert sein**

In dieser Studie, wie auch in vielen anderen Studien, in denen die X-ChIP Technik zur Analyse der von einem Transkriptionsfaktor gebundenen DNA-Bereiche eingesetzt

wurde, wurden Promotorbereiche potentieller Zielgene untersucht (Zhang et al., 2001; Johnson et al., 2001). Diese Untersuchungen beruhen auf der Feststellung, daß die Promotoren regulatorische Elemente enthalten, die für die Transkription eines Gens ausschlaggebend sind. Jedoch wurden für verschiedene Faktoren, beispielsweise AG und AGL15 aus *Arabidopsis*, DNA-Bindungsmotive in Intron- und weit in 3'-kodierenden Bereichen der Zielgene nachgewiesen (Ito et al., 1997; Tang und Perry, 2003). Sofern keine Hinweise vorliegen, daß in einem untersuchten Gen regulatorische Elemente in Intron- oder 3'-gelegenen Bereichen lokalisiert sein könnten, werden diese Regionen in X-ChIP Experimenten in der Regel nicht auf eine Interaktion mit einem Faktor untersucht. Falls auf Expressionsebene der Einfluß eines Faktors auf die Transkription eines Gens nachgewiesen wurde, eine Bindung des Faktors an Promotor Sequenzen *in vivo* jedoch nicht festgestellt wurde, würden diese Gene als indirekte Zielgene betrachtet. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß der Faktor durch die Bindung regulatorischer Elemente in anderen Bereichen des genomischen Lokus eines Gens unmittelbar regulierend auf die Transkription wirkt.

#### 4.5.4 Das „Primer-Problem“

Eine Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen in Chromatin Immunopräzipitationen wird mittels PCR überprüft. Die PCRs werden mit Sequenz-spezifischen Primern durchgeführt, die einen A/T : G/C Gehalt von 40% - 60% haben. Die Untersuchung einzelner Klone der mit immunopräzipitierter DNA hergestellten Bakterien-Banken zeigte, daß in X-ChIP Experimenten DNA-Fragmente von durchschnittlich 600 bp angereichert werden (vgl. Abschn. 3.5). Daher werden die Primer so gewählt, daß sie nicht weiter als etwa 300 bp beiderseits der putativen Protein-Bindungsstelle entfernt liegen. Die systematische Untersuchung des *Arabidopsis* Genoms auf die Basenzusammensetzung in Promotorbereichen in den Positionen -1 bis -1500 relativ zum Startkodon zeigte, daß sich diese Bereiche durch einen hohen A/T Gehalt auszeichnen (K. Stüber, persönliche Mitteilung). Sollte es in den Promotorbereichen von interessanten Genen aufgrund eines hohen A/T-Gehaltes nicht möglich sein, Primer mit einer optimalen Basenzusammensetzung herzustellen, können diese Sequenzen nicht mittels X-ChIP und anschließender PCR auf eine direkte Interaktion mit einem

bestimmten Faktor untersucht werden. Dieses Problem trat bei der X-ChIP Analyse des Gens *FILI*, das spezifisch im Filament exprimiert wird und daher ein potentielles *DEF* Zielgen ist, auf (Nacken, 1990). Zudem können repetitive Sequenzen die PCR-Amplifikation behindern. So konnte innerhalb des *DEF* Promotors nur ein Teilbereich auf eine Interaktion mit DEF/GLO untersucht werden, weil der über 500 bp lange Inverted Repeat innerhalb des *DEF* Promotors eine PCR-Analyse dieses Bereichs verhindert (Schwarz-Sommer et al., 1992).

#### 4.5.5 Unspezifisch erfasste DNA-Sequenzen behindern die Isolierung neuer *DEF* Zielgene

Aus *Antirrhinum* Infloreszenzen mit den anti-DEF Seren SA12 und D39/2 immunpräzipitierte DNA wurde als Substrat für Adapter-vermittelte Klonierungen verwendet. Mit den entsprechenden Präimmunseren durchgeführte Chromatin Immunopräzipitationen führten zur Erfassung von unspezifischen DNA-Sequenzen und wurden parallel in Klonierungsreaktionen eingesetzt, um in Bakterien-Banken zwischen spezifisch angereicherten und unspezifischen DNA-Sequenzen unterscheiden zu können. In X-ChIP Experimenten mit anti-DEF Seren und in den Negativkontrollen mit Präimmunserum reichten die erhaltenen DNA-Mengen für die Adapter-vermittelte PCR-Amplifikation aus. Die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese zeigte, daß bei Chromatin Immunopräzipitationen, die mit einem anti-DEF Serum durchgeführt wurden, der DNA-Gehalt stark erhöht war im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen mit Präimmunserum. Diese Beobachtung wurde durch die Adapter-vermittelte PCR-Amplifikation von immunpräzipitierten DNA-Fragmenten, die mit anti-GLO Seren isoliert wurden, bestätigt (nicht gezeigt). Trotz des erhöhten DNA-Gehalts in Chromatin Immunopräzipitationen mit anti-DEF Serum (im Vergleich zu den Negativkontrollen mit Präimmunserum) wurden in den beiden Bakterien-Banken, die etwa 3800 bzw. 6100 immunpräzipitierte DNA-Sequenzen repräsentierten, keine spezifisch angereicherten Sequenzen identifiziert.

Die in der Negativkontrolle vorhandene unspezifische DNA kann vermutlich auf die Anlagerung von Protein-DNA Komplexen oder DNA-Fragmenten direkt an das

Trägermaterial (Protein A Sepharose) zurückgeführt werden. Diese Erklärung wird unterstützt durch die Feststellung, daß in X-ChIP Experimenten, in denen als Negativkontrolle Wasser anstelle von Präimmunserum verwendet wurde, DNA-Fragmente in Mengen vorhanden waren, die ebenfalls kloniert werden konnten (F. Turck, persönliche Mitteilung). Protein A Sepharose kann durch paramagnetische Polystyrenkügelchen (Dynabeads), an die Protein A kovalent gebunden ist, ersetzt werden. In X-ChIP Experimenten wurde durch die Verwendung von Dynabeads der Gehalt an unspezifischen DNA-Sequenzen vermindert (Zhang et al., 2001).

Die Ausbeute an PCR-Produkt nach der Adapter-vermittelten PCR-Amplifikation wurde für X-ChIP Experimente mit dem anti-GLO Serum SA17 bestimmt und lag bei 25 ng/ $\mu$ l, davon entfallen jedoch nur 1,5 pg/ $\mu$ l auf das *in vivo* von DEF/GLO gebundene GLO Promotorfragment (d.h. eine von 17000 Sequenzen entspricht dem GLO Promotorfragment). Unter der Annahme, daß DEF/GLO nur eine relativ geringe Anzahl von Zielgenen direkt bindet, bedeutet dies, daß der Gehalt an spezifisch angereicherten Sequenzen im Verhältnis zu der gesamten immunpräzipitierten DNA extrem gering ist. Daher muß der deutlich erhöhte DNA-Gehalt, der bei der Klonierung mit anti-DEF oder anti-GLO Seren im Vergleich zur Negativkontrolle mit Präimmunserum festgestellt wurde, auf unspezifisch erfasste DNA-Sequenzen zurückgeführt werden. In den Chromatin Immunopräzipitationen wurden polyklonale anti-DEF und anti-GLO Seren eingesetzt. Zur Herstellung der Seren wurden Kaninchen mehrfach große Mengen an DEF bzw. GLO Proteinen injiziert. Die Injektionen derartiger Mengen an Fremd-Protein führten bestimmt zu einer starken Immunantwort, die das gesamte Immunsystem der Tiere aktiviert. Daher ist die Konzentration an unspezifischen Antikörpern in den anti-DEF und anti-GLO Seren höher als in den entsprechenden Präimmunseren und kann dazu beitragen, daß es zu einer stärkeren Präzipitation von unspezifischen Faktoren im Vergleich zu den Präimmunseren kommt.

Die Adapter-vermittelte PCR-Amplifikation kann zur nicht-proportionalen Amplifikation unterschiedlicher DNA-Fragmente führen (Weinmann und Farnham, 2002). Um dieses Problem zu lösen, müßte entweder die PCR-Amplifikation umgangen oder Änderungen an den PCR Bedingungen vorgenommen werden (z.B. durch eine Verringerung der Zyklenzahl).

## 4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierte X-ChIP Methode kann zu einem vertieften Verständnis der Regulationsprozesse der Petalen- und Staminaentwicklung in *Antirrhinum* beitragen. Um den Anwendungsbereich der Technik in der Zukunft ausweiten zu können, werden im folgenden einige Versuchsvorschläge vorgestellt.

### 4.6.1 Expressionsanalysen zur Ergänzung der X-ChIP Daten

Durch die X-ChIP Technik wurden Promotorbereiche der Gene *GLO* und *DEFH125* definiert, die von DEF/GLO *in vivo* gebunden werden. Die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien beobachtete Bindung von DEF/GLO an den *GLO* Promotor bewirkt eine Aktivierung der *GLO* Expression, die mittels Northern Blot Analysen mit 5-10 mm langen *Antirrhinum* Knospen bereits nachgewiesen wurde (Tröbner et al., 1992). Die in späten Entwicklungsstadien stattfindende Reprimierung der *DEFH125* Expression durch eine Bindung von DEF/GLO an den *DEFH125* Promotor kann mittels Expressionsstudien mit Material der Temperatur-sensitiven *def-101* Mutante weiter untersucht werden. Diese Untersuchungen würden zeigen, ob eine Reduktion der *DEF* Funktion zu einer ektopischen Expression von *DEFH125* in Petalen und Stamina führt.

### 4.6.2 Die erfolgreiche Kombination von Expression Profiling Studien und X-ChIP Technik kann auf weitere Stadien und Organe ausgedehnt werden

Die durchgeführten Chromatin Immunopräzipitationen zeigten, daß mittels dieser Methode der Nachweis einer direkten Regulation der *DEF* Zielgenexpression erbracht werden kann. Die Expression Profiling Studien sollen über das Petalenstadium 3 hinaus auf verschiedene Blütenentwicklungsstadien und Stamina ausgedehnt werden. Weitere, neu identifizierte *DEF* Zielgene können nach der Isolierung ihrer Promotorregionen mittels X-ChIP Analysen auf eine direkte Regulation durch DEF/GLO untersucht werden. Das Ziel ist, einen möglichst umfassenden Einblick in das von DEF und GLO kontrollierte Netzwerk zu erhalten.

### 4.6.3 Weiterentwicklungen der X-ChIP Technik zur Isolierung neuer *DEF* Zielgene

In den Chromatin Immunopräzipitationen mit *Antirrhinum* Blütenmaterial wurden von DEF/GLO gebundene Sequenzen nur in extrem geringen Mengen im Verhältnis zu unspezifischen DNA-Fragmenten angereichert. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, waren diese Konzentrationen ausreichend, um mittels PCR-Analyse die Anreicherung ausgewählter Genbereiche überprüfen zu können. Jedoch ist zur Identifizierung von neuen, noch unbekanntem *DEF* Zielgenen eine Verschiebung des Verhältnisses von unspezifisch erfassten zu spezifisch angereicherten DNA-Sequenzen nötig. Es gibt unterschiedliche Strategien, wie dies in Zukunft erreicht werden kann.

Da sowohl anti-DEF als auch anti-GLO Seren hergestellt wurden, welche erfolgreich in Chromatin Immunopräzipitationen eingesetzt wurden, ist es möglich, nach einer Chromatin Immunopräzipitation mit anti-DEF Serum eine weitere mit dem anti-GLO Serum anzuschließen. Durch die Kombination können unspezifische DNA-Sequenzen stark reduziert werden und die Klonierung von spezifisch angereicherten DNA-Sequenzen könnte erreicht werden. Die Strategie einer Doppel-Immunopräzipitation führte auch bei der Klonierung von Zielgenen des menschlichen Transkriptionsfaktors E2F zu einer starken Erhöhung an spezifisch präzipitierten DNA-Sequenzen. Eine weitere Verbesserung wurde bei diesen Experimenten dadurch erzielt, daß die Adaptervermittelte PCR umgangen wurde, wodurch die Anreicherung einfach amplifizierter DNA-Sequenzen vermieden wurde. In der Tat wurde die Isolierung neuer E2F Zielgene durch diese Änderungen am Standard X-ChIP Protokoll überhaupt erst ermöglicht (Weinmann et al., 2001; Weinmann und Farnham, 2002). Um genügend DNA-Sequenzen für die Klonierungen zu erhalten, wurden hierfür 50 unabhängige X-ChIP Experimente durchgeführt. Ein vergleichbarer Ansatz ist in *Antirrhinum* aufgrund der großen Blüte bei entsprechender Planung auch mit Organ-spezifischem Blütenmaterial durchführbar.

Eine weitere Möglichkeit, um die Spezifität in X-ChIP Experimenten zu erhöhen, könnte mittels subtraktiver Verfahren erreicht werden. Eine Subtraktion zwischen den beiden DNA Pools (immunopräzipitierte DNA / DNA der Negativkontrolle) würde die

Repräsentationsrate der Gene, die in beiden Pools vorhanden sind, reduzieren und differentiell vorhandene DNA-Sequenzen anreichern. Problematisch hierbei ist die sehr geringe Ausgangsmenge an spezifisch präzipitierter DNA, so daß die Doppel-Immunopräzipitation sicherlich die zuerst auszutestende Optimierungsmethode darstellt.

Für Hefesysteme existieren Arrays, die intergene Regionen des gesamten Hefe Genoms enthalten. Durch die Hybridisierung dieser Arrays mit DNA-Sonden, die aus immunopräzipitierter DNA hergestellt wurden, konnten Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Shannon und Rao, 2002; Ren et al., 2000; Iyer et al., 2001).

Eine Perspektive für die Zukunft ist, daß es nach der Sequenzierung des *Arabidopsis* Genoms (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) nun für ein tieferes Verständnis der Entstehung von pflanzlicher Diversität notwendig ist, andere Modellorganismen für eine komplette Genomsequenzierung auszuwählen. Da für *Antirrhinum* bereits zahlreiche Genomics Ressourcen etabliert sind (EST-Kollektion, Bac-Banken, molekulare Linkage Karte) und es über ein relativ kleines haploides Genom verfügt, ist es ein attraktiver Kandidat für ein Genom-Sequenzierungsprojekt (Schwarz-Sommer et al., 2003). Mittels Arrays, die das gesamte *Antirrhinum* Genom abdecken, könnten ähnliche Experimente wie in Hefe durchgeführt und sowohl Promotor- als auch Intronsequenzen auf mögliche DEF/GLO Bindungsstellen untersucht werden.

Die X-ChIP Technik besitzt das Potential, über die Überprüfung putativer DEF Zielgene hinaus, zur Isolierung neuer Zielgene eingesetzt werden zu können. Die mit dieser Arbeit geschaffenen Grundlagen zusammen mit den hier diskutierten Änderungen am X-ChIP Protokoll sollten dies in Zukunft in *Antirrhinum* möglich machen und würden weitere Erkenntnisse hinsichtlich der DEF Funktion liefern.

## 5.1 Zusammenfassung

Die Blüten angiospermer Pflanzen bestehen aus morphologisch distinkten Organen, die in vier Wirteln angeordnet sind. Im ersten Wirtel werden Sepalen, im zweiten Petalen, im dritten Stamina und im vierten Karpelle angelegt. In *Antirrhinum* üben die MADS-Box Transkriptionsfaktoren *DEFICIENS* (*DEF*) und *GLOBOSA* (*GLO*) Schlüsselfunktionen bei der Ausprägung der Petalen und Stamina aus. Der Funktionsverlust von *DEF* oder *GLO* resultiert in einer homöotischen Umformung von Petalen zu Sepalen und von Stamina in karpelloide Strukturen. Obwohl die Funktion von *DEF* bereits seit langem intensiv untersucht wird, ist bislang wenig über die von *DEF* *in vivo* gebundenen regulatorischen DNA-Bereiche der Zielgene bekannt. Um diese Zielsequenzen zu identifizieren, wurde die X-ChIP Technik in *Antirrhinum* etabliert. Diese Technik ermöglichte den Nachweis von *DEF* und *GLO* Proteinen an ihren *in vivo* DNA-Bindungsstellen. Hierbei wurden Proteine durch eine chemische Reaktion mit Formaldehyd *in vivo* kovalent mit den assoziierten DNA-Sequenzen verbunden. Das fixierte Chromatin wurde mittels Ultraschallwellen in kürzere Fragmente gespalten und Protein-DNA Komplexe wurden mit einem anti-*DEF* oder anti-*GLO* Serum immunopräzipitiert. Die durch Formaldehyd induzierten Quervernetzungen wurden gelöst und die immunopräzipitierten DNA-Fragmente analysiert. Durch die Anwendung der Technik wurden verschiedene Zielsetzungen verfolgt. Die vermutete direkte autoregulatorische Kontrolle der späten *GLO* Expression durch die Bindung von *DEF/GLO* an bestimmte *GLO* Promotorregionen wurde *in vivo* mittels X-ChIP Analyse bewiesen. Definierte Promotorbereiche potentieller *DEF* Zielgene wurden auf eine *in vivo* Interaktion mit *DEF/GLO* untersucht. Durch diese Analysen wurde gezeigt, daß *DEF* durch die Bindung des *DEFH125* Promotors einen unmittelbaren Einfluß auf späte Ereignisse in der Blütenorganogenese ausübt. Die Kombination von Expression Profiling Studien und X-ChIP Technik führte zur Identifizierung eines Extensin-ähnlichen direkten *DEF* Zielgens, dessen Expression von *DEF* positiv reguliert wird. Somit wirkt *DEF* unmittelbar auf strukturelle Aspekte der Blütenentwicklung. Die Anwendung der X-ChIP Technik zur Isolierung neuer *DEF* Zielsequenzen durch die Klonierung immunopräzipitierter DNA-Fragmente wird diskutiert.

## 5.2 Abstract

Flowers of higher plants are typically organized in four whorls: sepals and petals in the two outer whorls form the perianth, which surrounds two whorls of reproductive organs, stamens and carpels. The development of morphologically complex structures like flowers requires an accurate temporal and spatial control of gene expression. In *Antirrhinum*, key regulators of petal and stamen organogenesis are the MADS-box transcription factors *DEFICIENS* (*DEF*) and *GLOBOSA* (*GLO*). Loss-of-function of either of these two genes results in a petal to sepal and stamen to carpel conversion indicating that *DEF* and *GLO* participate in the same regulatory pathway. Although *DEF* function has been intensively studied the target genes that are recognized and bound by *DEF* *in vivo* remained elusive. To shed light on the downstream pathway of *DEF* control the cross-linked chromatin immunoprecipitation (X-ChIP) technique has been established. This technique allowed the detection of *DEF* and *GLO* DNA binding sites *in vivo*. In short, formaldehyde was used to induce the formation of covalent bonds between proteins and DNA. The chromatin was solubilized by sonication and protein/DNA complexes were immunoprecipitated with an anti-*DEF* or an anti-*GLO* serum, respectively. Finally, the cross-links were fully reversed and the immunoprecipitated DNA fragments were analyzed. This technique was applied to follow different aims. X-ChIP analyses showed that the assumed autoregulatory control of the upregulation and maintenance of *GLO* expression is indeed accomplished by a direct binding of *DEF/GLO* to distinct regions of the *GLO* promoter *in vivo*. Putative *DEF* target genes that were previously isolated by different means were analyzed by X-ChIP experiments for a direct interaction with *DEF/GLO*. It was shown that *DEF* affects late developmental processes by regulating the expression of *DEFH125*, a MADS-box transcription factor that is most likely involved in microsporogenesis. The combination of expression profiling studies and chromatin immunoprecipitations identified an extensin-like gene as direct *DEF* target gene indicating that *DEF* controls structural aspects of flower development. The use of the X-ChIP technique to isolate novel *DEF* target genes by cloning immunoprecipitated DNA fragments is discussed.

## 6 Literatur

Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Vergara-Silva, F. und Yanofsky, M. F. (2000) MADS-Box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes *Plant J.*, **24**(4), 457-466

Anderson, H. (1995) *In vitro* und *in vivo* Studien zur Charakterisierung der floralen MADS-Box-Proteine DEFICIENS und GLOBOSA aus *Antirrhinum majus* L.  
Dissertation, Köln

Angenent, G. C., Franken, J., Busscher, M., van Dijken, A., van Went, J. L., 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

Bateson, W. (1894) Materials for the study of variation *Macmillan, London*

Baur, E. (1924) Untersuchungen über das Wesen, die Entstehung und die Vererbung von Rassenunterschieden bei *Antirrhinum majus*. *Bibliotheca Genetica* 4

Bey, M., Müller, B. M., Lauri, A. und Zachgo, S. (2002) Downstream of *DEFICIENS*: Towards the isolation of target genes *Flowering Newsletter*, **34**, 19-26

Blumenthal, R. M. (1986) *E. coli* can restrict methylated DNA and may skew genomic libraries *Trends Biotechnol.*, **4**, 302-305

Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M. K., Vriend, G. und Schöler H. R. (1998) New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2 *Genes & Development*, **12**, 2073-2090

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

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254

Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N. und Coen, E. (1993) Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell*, **72**, 85-95

Breiling, A., Turner, B. M., Bianchi, M. E., Orlando, V. (2001) General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins *Nature*, **412**, 651-655

Burke, B., Griffiths, G., Reggio, H., Louvard, D. und Warren, G. (1992) A monoclonal antibody against a 135-K Golgi membrane protein. *EMBO J.*, **1**, 1621-1628

Burnette, W. N. (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, **112**, 195-203

Carr, A. und Biggin, M. D. (1999) A comparison of *in vivo* and *in vitro* DNA-binding specificities suggests a new model for homeoprotein DNA binding in *Drosophila* embryos *EMBO J.*, **18** (6), 1598-1608

Chen, Z. X., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sanchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J. und Klessig, D. F. (1995) Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(10), 4134-4137

- Chern, M.-S., Bobb, A. J. und Bustos, M. M. (1996) The Regulator of *MAT2* (ROM2) Protein Binds to Early Maturation Promoters and Represses PvALF-Activated Transcription. *Plant Cell*, **8**, 305-321
- Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353**, 31-37.
- Colombo, L., Franken, J., 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
- Dagleish, P. und Sharrocks, A. D. (2000) The mechanism of complex formation between Fli-1 and SRF transcription factors *Nucleic Acids Res.*, **28**(2), 560-569
- Davies, B. und Schwarz-Sommer, Z. (1994) Control of Floral Organ Identity by Homeotic MADS-Box Transcription Factors. *Results Probl Cell Differ*, **20**, 235-258.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. und Sommer, H. (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *Embo J.*, **15**, 4330-4343.
- Davies, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H. und Schwarz-Sommer, Z. (1999) *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development *EMBO J.*, **18**(14), 4023-4034
- Dey, P. M., Brownleader, M. D., Pantelides, A. T., Trevan, M., Smith, J. J., Saddler, G. (1997) Extensin from suspension-cultured potato cells: a hydroxyproline-rich glycoprotein, devoid of agglutinin activity *Planta*, **202**, 179-187
- Donahue, R. A. Jr. und Bloom, F. R. (1998) Transformation efficiency of *E. coli* electroporated with large plasmid DNA. *Focus*, **20**, 77

Doyle, J. J. und Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13-15

Egea-Cortines, M., Saedler, H. und Sommer, H. (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus* *EMBO J.*, **18**(19), 5370-5379

Flanagan, C. H. und Ma, H. (1994) Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *AGL2* in wild-type and mutant *Arabidopsis* flowers. *Plant Mol. Biol.*, **7**, 721-733

Gamboa, A., Paéz-Valencia, J., Acevedo, G. F., Vázquez-Moreno, L. und Alvarez-Buylla, R. E. (2001) Floral Transcription Factor AGAMOUS Interacts *in Vitro* with a Leucine-Rich Repeat and an Acid Phosphatase Protein Complex *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **288**, 1018-1026

Gendrel, A.-V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V., Martienssen, R. A. (2002) Dependence of Heterochromatic Histone H3 Methylation Patterns on the *Arabidopsis* Gene *DDMI* *Science*, **297**, 1871-1873

Gottesmann, S., Halpern, E. und Trisler, P. (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation of Ion mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **148**, 265-273

Goto, K. and Meyerowitz, E. M. (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes and Development*, **8**, 1548-1560

Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990) Differential Plasmid Rescue from Transgenic Mouse DNAs into *Escherichia coli* Methylation-Restriction Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4645-4649

Gu, J., Stephenson, C. G. und Iadarola, M. J. (1994) Recombinant Proteins Attached to a Nickel-NTA Column: Use in Affinity Purification of Antibodies *BioTechniques*, **17** (2), 257-262

Hartung, W., Sauter, A. und Hose, E. (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Exp. Bot.*, **53**, 27-32

Heck, G. R., Perry, S. E., Nichols, K. W. und Fernandez, D. E. (1995) AGL15, a MADS-Domain Protein Expressed in Developing Embryos. *Plant Cell*, **7**, 1271-1282

Hill, T. A., Day, C. D., Zondlo, S. C., Thackeray, A. G. und Irish, V. F. (1998) Discrete spatial and temporal *cis*-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3* *Development*, **125**, 1711-1721

Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T. und Ohme-Takagi, M. (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis* *Plant J.*, **34**, 733-739

Honma, T. und Goto, K. (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs *Nature*, **409**, 525-529

Huijser, P., Klein, J., Lönnig, W.-E., Meijer, H., Saedler, H. und Sommer, H. (1992) Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *Embo J.*, **11**, 1239-1249.

Irish, V. F. und Sussex, I. M. (1990) Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell*, **2**, 741-753.

Ito, T., Takahashi, N., Shimura, Y. und Okada, K. (1997) A Serine/Threonine Protein Kinase Gene Isolated by an in vivo Binding Procedure Using the *Arabidopsis* Floral Homeotic Gene Product, AGAMOUS. *Plant Cell Physiol.*, **38**(3), 248-258

- Iyer, V. R., Horak, C. E., Scafe, C. S., Botstein, D., Snyder, M. und Brown, P. O. (2001) Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF *Nature*, **409**, 533-538
- Jack, T., Brockman, L. L. und Meyerowitz, E. M. (1992) The Homeotic Gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* Encodes a MADS Box and Is Expressed in Petals and Stamens *Cell*, **68**, 683-697
- Jack, T., Fox, G. L. und Meyerowitz, E. M. (1994) *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity *Cell*, **76**, 703-716
- Jack, T. (2001a) Plant development going MADS *Plant Mol. Biol.*, **46**, 515-520
- Jack, T. (2001b) Relearning our ABCs: new twists on an old model *TRENDS in Plant Science*, **6**(7), 310-316
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P. und Arias, J. (2001) *In vivo* target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.*, **28**(2), 237-243
- Johnson, K. D. und Bresnick, E. H. (2002) Dissecting long-range transcriptional mechanisms by chromatin immunoprecipitation *Methods*, **26**, 27-36
- Keck, E., McSteen, P., Carpenter, R. und Coen, E. (2003) Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *EMBO J.*, **22**, 1058-1066
- Keller, B. (1993) Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.*, **101**, 1127-1130
- Klein, J. (1994) Molekulargenetische Untersuchungen zum Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum bei *Antirrhinum majus*  
Dissertation, Köln

Klemm, M. (1927) Vergleichende morphologische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen einer Reihe multipler Allelomorphe bei *Antirrhinum majus*. *Bot. Archiv*, **20**, 423-474

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

Kuo, M.-H. und Allis, C. D. (1999) *In Vivo* Cross-Linking and Immunoprecipitation for Studying Dynamic Protein:DNA Associations in a Chromatin Environment *Methods*, **19**, 425-433

Kuo, M.-H., vom Baur, E., Struhl, K. und Allis, C. D. (2000) Gcn4 Acitvator Targets Gcn5 Histone Acetyltransferase to Specific Promoters Independently of Transcription *Molecular Cell*, **6**, 1309-1320

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

Liu, L., White, M. J. und MacRae, T. H. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants *Eur. J. Biochem.*, **262**, 247-257

Ma, H., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M. (1991) *AGL1-6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes *Genes and Development*, **5**, 484-495

Maes, T., Van de Steene, N., Zethof, J., Karimi, M., D'Hauw, M., Mares, G., Van Montagu, M. und Gerats, T. (2001) *Petunia* AP2-like genes and their role in flower and seed development. *Plant Cell*, **13**(2), 229-244

Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. und Yanofsky, M. F. (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature*, **360**, 273-277.

- Mandel, M. A. und Yanofsky, M. F. (1998) *The Arabidopsis AGL9 MADS box gene is expressed in young flower primordia Sex. Plant Reprod.*, **11**, 22-28
- Martin, C. und Gerats, T. (1993) Control of Pigment Biosynthesis During Petal Development. *Plant Cell*, **5**, 1253-1264
- Martin, C., Bhatt, K., Baumann, K., Jin, H., Zachgo, S., Roberts, K., Schwarz-Sommer, Z., Glover, B. und Perez-Rodrigues, M. (2002) The mechanics of cell fate determination in petals *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 809-813
- Masiero, S., Imbriano, C., Ravasio, F., Favaro, R., Pelucchi, N., Gorla, M. S., Mantovani, R., Colombo, L. und Kater, M. M. (2002) Ternary Complex Formation between MADS-box Transcription Factors and the Histone Fold Protein NF-YB\* *J.Biol. Chem.*, **277**(29), 26429-26435
- Mead, J., Bruning, A. R., Gill, M. K., Steiner, A. M., Acton, T. B., und Vershon, A. K. (2002) Interactions of the Mcm1 MADS Box Protein with Cofactors That Regulate Mating in Yeast *Mol. Cell. Biol.*, **22** (13), 4607-4621
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y. und Sonenshein, A. L. (2003) Additional Targets of the *Bacillus subtilis* Global Regulator CodY Identified by Chromatin Immunoprecipitation and Genome-Wide Transcript Analysis *Journal of Bacteriology*, **185**(6), 1911-1922
- 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
- Nacken, W. (1990) Molekularbiologische Untersuchungen zur Blütenentwicklung von *Antirrhinum majus*  
Dissertation, Köln

- Narhi, L. O., Caughey, D. J., Horan, T. P., Kita, Y., Chang, D. und Arakawa, T. (1997) Fractionation and Characterization of Polyclonal Antibodies Using Three Progressively More Chaotropic Solvents. *Anal. Biochem.*, **253**, 246-252
- Ng, M. und Yanofsky, M. F. (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family *Nature Reviews*, **2**, 186-195
- Noda, K.-I., Glover, B. J., Linstead, P. und Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor *Nature*, **369**, 661-664
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. und Treisman, R. (1988) Isolation and properties of cDNA clone SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element *Cell*, **55**, 989-1003
- Orlando, V., Strutt, H. und Paro, R. (1997) Analysis of Chromatin Structure by *in Vivo* Formaldehyde Cross-Linking *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*, **11**, 205-214
- Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. und Paro, R. (1998) Binding of Trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.*, **17**(17), 5141-5150
- Orlando, V. (2000) Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation *TIBS*, **25**, 99-104
- Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H. E., Ingram, R. M., Kater, M. M., Davies, B., Angenent, G. C. und Colombo, L. (2003) Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World *Plant Cell*, **15**, 1538-1551

Passmore, S., Elble, R. und Tye, B. K. (1989) A protein involved in minichromosome maintenance in yeast binds a transcriptional enhancer conserved in eucaryotes *Genes and Development*, **3**, 921-935

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

Perry, S. E., Nichols, K. W. und Fernandez, D. E. (1996) The MADS-Domain Protein AGL15 Localizes to the Nucleus During Early Stages of Seed Development. *Plant Cell*, **8**, 1977-1989

Perry, S. E., Lehti, M. D. und Fernandez, D. E. (1999) The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiol.*, **120**, 121-129

Pollock, R. und Treisman, R. (1991) Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets *Genes and Development*, **5**, 2327-2341

Pramila, T., Miles, S., Thakurta, D. G., Jemiolo, D und Breeden, L. L. (2002) Conserved homeodomain proteins interact with MADS domain protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle *Genes & Development*, **16**, 3034-3045

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T. L., Wilson, C. J., Bell, S. P., Young, R. A. (2000) Genome-Wide Location and Function of DNA Binding Proteins *Science*, **290**, 2306-2309

Riechmann, J. L. und Meyerowitz, E. M. (1997) MADS domain proteins in plant development *Biol. Chem.*, **378**, 1079-1101

Sablowski, R. W. M. und Meyerowitz E. M. (1998) A Homolog of *NO APICAL MERISTEM* Is an Immediate Target of the Floral Homeotic Genes *APETALA3/PISTILLATA* *Cell*, **92**, 93-103

Samach, A., Kohalmi, S. E., Motte, P., Datla, R. und Haughn, G. W. (1997) Divergence of function and regulation of class B floral organ identity genes. *Plant Cell*, **9**, 559-570

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Savidge, B., Rounsley, S. D., und Yanofsky, M. F. (1995) Temporal Relationship between the Transcription of Two Arabidopsis MADS Box Genes and the Floral Organ Identity Genes *Plant Cell*, **7**, 721-733

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

Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P. J., Hansen, R., Tetens, F., Lönnig, W.-E., Saedler, H. und Sommer, H. (1992) Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *Embo J.*, **11**(1), 251-263.

Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. und Hudson, A. (2003) An everlasting pioneer: the story of *Antirrhinum* research *Nature Reviews*, **4**, 655-664

Shannon, M. F. und Rao, S. (2002) Of Chips and ChIPs *Science*, **296**, 666-669

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

Showalter, A. M. (1993) Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *Plant Cell*, **5**, 9-23

Sommer, H., Beltran, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.-E., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z. (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *Embo J.*, **9**(3), 605-613.

Sparrow, D. B., Miska, E. A., Langley, E., Reynaud-Deonauth, S., Kotecha, S., Towers, N., Spohr, G., Kouzarides, T. und Mohun, T. J. (1999) MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR *EMBO J.*, **18**(18), 5085-5098

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. und Grunstein, M. (1997) SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast *Genes & Development*, **11**, 83-93

Strutt, H., Cavalli, G. und Paro, R. (1997) Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression *EMBO J.*, **16** (12), 3621-3632

Stubbe, H. (1966) Genetik und Zytologie von *Antirrhinum L. sect. Antirrhinum* VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Tan, S. und Richmond, T. J. (1998) Crystal structure of the yeast MATa2/MCM1/DNA ternary complex *Nature*, **391**, 660-666

Tang, W. und Perry, S. E. (2003) Binding Site Selection for the Plant MADS Domain Protein AGL15 *J. Biol. Chem.*, **278** (30), 28154-28159

The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815

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

Tilly, J. J., Allen, D. W., und Jack, T. (1998) The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects *Development*, **125**, 1647-1657

Toth, J. und Biggin, M. D. (2000) The specificity of protein-DNA crosslinking by formaldehyde: *in vitro* and in *Drosophila* embryos. *Nucleic Acids Res.*, **28**(2), e4

Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönnig, W.-E., Saedler, H., Sommer, H. und Schwarz-Sommer, Z. (1992) *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *Embo J.*, **11**, 4693-4704.

Villarejo, M. R. und Zabin, I. (1974)  $\beta$ -galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.*, **110**, 171-178

Walter, J. und Biggin, M. D. (1997) Measurement of *in Vivo* DNA Binding by Sequence-Specific Transcription Factors Using UV Cross-Linking *METHODS: A companion to Methods in Enzymology*, **11**, 215-224

Wang, H., Tang, W., Zhu, C. und Perry S. E. (2002) A chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach to isolate genes regulated by AGL15, a MADS domain protein that preferentially accumulates in embryos *Plant J.*, **32**, 831-843

Weinmann, A. S., Bartley, S. M., Zhang, T., Zhang, M. Q. und Farnham, P. J. (2001) Use of Chromatin Immunoprecipitation To Clone Novel E2F Target Promoters *Mol. & Cell. Biol.*, **21**(20), 6820-6832

Weinmann, A. S. und Farnham, P. J. (2002) Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation *Methods*, **26**, 37-47

Yang, Y., Fanning, L., und Jack, T. (2003) The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA* *Plant J.*, **33**, 47-59

Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldman, K. A. und Meyerowitz, E. M. (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors *Nature*, **346**, 35-39

Zachgo, S. (1995) Funktionale Analyse des homöotischen MADS-Box Gens *DEFICIENS* und Charakterisierung des stamenspezifischen MADS-Box Gens *DEFH125* aus *Antirrhinum majus*

Dissertation, Köln

Zachgo, S., de Andrade Silva, E., Motte, P., Tröbner, W., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z. (1995) Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. *Development*, **121**, 2861-2875.

Zachgo, S., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z. (1997) Pollen-specific expression of *DEFH125*, a MADS-box transcription factor in *Antirrhinum* with unusual features *Plant J.*, **11**(5), 1043-1050

Zhang, L., Eggers-Schumacher, G., Schöffl, F. und Prändl, R. (2001) Analysis of heat-shock transcription factor-DNA binding in *Arabidopsis* suspension cultures by UV laser crosslinking *Plant J.*, **28**(2), 217-223

Zhang, X., Cui, Z., Miyakawa, T., und Moye-Rowley, W. S. (2001) Cross-talk between Transcriptional Regulators of Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* *J. Biol. Chem.*, **276**(12), 8812-8819

Zik, M. und Irish, V. F. (2003) Global Identification of Target Genes Regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* Floral Homeotic Gene Action *Plant Cell*, **15**, 207-222

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Antirrhinum</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
Abb.	Abbildung
al.	alii
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
cpm	radioaktiver Zerfall pro Minute
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
DHFR	Maus-Dehydrofolatreduktase
dH <sub>2</sub> O	steriles, vollentsalztes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotide
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
f	femto
g	Gramm
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton

---

l	Liter
MBP	<i>E. coli</i> Maltose-bindendes Protein
MBq	Mega-Bequerel
μ	Mikro
m	milli
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA
n	nano
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.u.	siehe unten
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol, v	Volumen
WT	Wildtyp
X-ChIP	Cross-linked Chromatin Immunopräzipitation
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Verwendete Primer

### *GLO*

- X/22 5'- CCAAAAGATAACAAGGTGCAACCACGG -3'  
X/23 5'- GGGCTACAAAATTCATGCATCTTGCCAGAGC -3'  
391 5'- CTTATTGGCATATGGCGTTGTC -3'  
392 5'- GAGTCATATCCATGGACGTTCCA -3'  
848 5'- GATGCACTTTTGCTTTTGCTTATAGC -3'  
849 5'- GTTACTAGGTTACAGCAATCTTGAATTAGGG -3'

### *DEF*

- 723 5'- GCTATTGCACTGTGCTGTGTGGTGGGG -3'  
725 5'- CACATTTTCATTCCGTGTTACTAGTATTGC -3'  
526 5'- GTCTAAGTTAAGACCAGCAGCTAGCCTG -3'  
527 5'- CGATCGTTGCATCACCATTGCATGGAG -3'

### *DEFH125*

- 152 5'- CCTCAGTGGGTGTAGCTGTAATTATCCC -3'  
747 5'- CTTGTGTTAGATCTCGAAACCACTTAGGTC -3'  
748 5'- GAAAGGCACACCATCTACTTAACTAATC -3'  
749 5'- GTTTGGGATAATTACAGCTACACCCACTG -3'  
750 5'- CGTACCCCTCATGTTAGTAAAGATTTGC -3'  
751 5'- GCTCTTTTAAAGCCACATAAACCGTAATACC -3'

### *DEFH84*

- 37 5'- CGGAGTGTGATGTGATAACCAG -3'  
752 5'- CAATAAGCATGAGCCCATGAGTTGATTTGC -3'  
753 5'- CTTAAGACTCATGATGCAACCG -3'  
754 5'- CTGGTATCACATCACACTCCG -3'

### *MIXTA*

- 165 5'-GAATCCCCGGATCTTATACGGAACCC-3'  
166 5'-GGCCTATTGATGATGTAGTTAGCTGATCGCG-3'

*DEFTup1*

591 5'-CGAACATGCCACAGCTAAATAAC -3'  
740 5'-AATGTCAATCTTCTCTACAAACTTGCGC -3'  
733 5'-GCTTGAATAATTCTACCTGAGTACTGCAAG -3'  
811 5'-AACAAATCTATTTACCACCTCTCGATACCC -3'  
737 5'-CACGAGAACCGAATCACGAACCCATG -3'  
509 5'-GAAGGGCAAGAGCCCCAAAAAGAAAGATG -3'

*DEFTdown2*

513 5'-CTCCACCTCTACGAAACCCTCTGTACG -3'  
622 5'-GATATTGTCGTGACTTTCCATGGGCCGG -3'

*DEFTdown3*

619 5'-GGAATCGAAAGGAAGGGCCCAAAGTATCTG-3'  
620 5'-GTGATGGATGCTACCTTACTCTGGAAAACG-3'  
621 5'-CGTTTTCCAGAGTAAGGTAGCATCCATCAC-3'  
515 5'-GCCTGGATAACATCTGCATGTTTGTGAAC-3'

*RAN3*

530 5'-CAGGAGAAATTTGGTGGCCTTAGGG-3'  
637 5'-CACATTGTCCGTGGATGCTGCAAG-3'

## Adaptersequenzen

448 5'-TCGAGCCCGGGCGGCCGCAGGT -3'  
449 5'-ACCTGCGGCC -3'

Für Klonierungen wurden verwendet:

337 5'-CGTTCTAGACTTCACGAATACATCAGCCCAAC-3'  
338 5'-CGTCAAGCTTATCCTCTCTCCTTGCATCAAATTCAAG-3'  
339 5'-CAGTCTAGACTCTGGGATCCCAAACATGAGG-3'  
340 5'-CTGCAAGCTTCGTATACCGCCTGGCTTTCCATC-3'

Primer für den TOPO Vektor

M13forward 5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'

M13reverse 5'- GTAAAACGACGGCCAG-3'

553 5'- GCTTGGTACCGAGCTCGGATCC-3'

555 5'- GGCGAATTGGGCCCCTCTAGATGC-3'

### 7.3 Nomenklatur

Wildtyp Allele	groß, kursiv	z.B. <i>DEFICIENS</i>
Mutante Allele	klein, kursiv	z.B. <i>deficiens</i>
Proteine	groß	z.B. DEFICIENS

## 7.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Molekulare Pflanzengenetik unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. Heinz Saedler durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Heinz Saedler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Themenstellung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Klaus Harter danke ich dafür, daß er sich als Kokorrektor zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dr. Sabine Zachgo danke ich für die Betreuung dieser Doktorarbeit.

Bei Frau Dr. Franziska Turck möchte ich mich für viele motivierende Gespräche über die X-ChIP Technik bedanken.

Herrn Dr. Roger Rubiera und Frau Dr. Cristina Navarro danke ich für viele Ratschläge bezüglich der Protein- und Antikörperaufreinigung. Das Protokoll zur Extraktion von pflanzlichen Kernproteinen für Western Blot Analysen wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Roger Rubiera zur Verfügung gestellt.

Frau Dr. Zsuzsanna Schwarz-Sommer danke ich für rekombinante *DEF* und *GLO* Expressionsvektoren, ihre Hilfe in fachlichen Fragen und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Riyaz Bhat danke ich für viele hilfreiche Tipps.

Frau Melanie Bey, Frau Anja Hörold, Frau Andrea Busch und Herrn Dr. Shuping Xing danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung.

## 7.5 Erklärung

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

Köln, im Oktober 2003

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Bey, M., Müller, B. M., Lauri, A. und Zachgo, S. (2002) Downstream of *DEFICIENS*: Towards the isolation of target genes *Flowering Newsletter*, **34**, 19-26