

**Isolierung und Charakterisierung von
Zielgenen des homöotischen Transkriptions-
faktors *DEFICIENS* aus *Antirrhinum majus***

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Melanie Bey
aus Olpe

Köln 2005

Diese Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
in Köln durchgeführt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Saedler
Prof. Dr. Klaus Harter

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2004

*In Gedenken an
Reinhold Bicher
(1906 – 2003)*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Blütenentwicklung von <i>Antirrhinum majus</i>	1
1.2	Homöotische Transkriptionsfaktoren	4
1.3	Zielgene von Transkriptionsfaktoren	7
1.4	Die Array Technik	9
1.5	Ziel der Arbeit	12
2	MATERIAL & METHODEN	13
2.1	Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	13
2.2	Medien, Puffer und Lösungen	14
2.3	Biologisches Material	14
2.3.1	Bakterienstämme und Plasmidvektoren	14
2.3.2	Pflanzenmaterial	14
2.4	Isolierung von Nukleinsäuren	15
2.4.1	Isolierung von genomischer DNA	15
2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA	15
2.4.3	Isolierung von Gesamt-RNA	15
2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gestützte Verfahren	16
2.5.1	Standard PCR	16
2.5.2	Genomische PCR	16
2.5.3	Genomische Linker PCR zur Isolierung von genomischen DNA-Fragmenten	17
2.5.4	Semiquantitative RT-PCR-Analysen	18
2.6	Klonierung von PCR-Fragmenten	20
2.7	DNA-Sequenzierungen	20
2.8	Expressionsprofil-Experimente mittels Makroarray Technik	20
2.8.1	Die <i>Antirrhinum majus</i> EST-Kollektion	20
2.8.2	Die EST-Filter	21
2.8.3	Experimentelle Durchführung der Makroarray-Experimente	22
2.8.3.1	Erststrang-cDNA-Synthese mit radioaktiver ³³ P-Markierung	22
2.8.3.2	Hybridisierung der EST-Filter	23
2.8.3.3	Detektion der Signale radioaktiv hybridisierter EST-Filter	25
2.8.4	Computerunterstützte Auswertung der Makroarray-Experimente	25
2.8.4.1	Quantifizierung der Signale	25
2.8.4.2	Speicherung, Prozessierung und Analyse der Makroarray-Daten mittels M-CHIPS	26
2.8.4.3	Clusteranalysen mittels GENESIS	30
2.8.4.4	Funktionelle MIPS-Kategorie-Analysen	31
2.9	Sequenzanalysen und Datenbanksuchen	31

3	ERGEBNISSE	32
3.1	Analyse der Petalenentwicklung von <i>Antirrhinum majus</i>	32
3.1.1	Einteilung der Petalenentwicklung in definierte Stadien	32
3.1.2	Genexpressionsanalyse der Wildtyp Petalenentwicklung mittels Makroarray Technik	34
3.1.2.1	Prozessierung und qualitative Prüfung der Makroarray-Daten	35
3.1.2.2	Vergleich der Expressionsprofile zwischen Petalen und Sepalen	39
3.1.2.2.1	Funktionelle Untersuchung der Expressionsdaten	41
3.1.2.2.2	Gene mit erhöhtem Expressionsniveau in Petalen im Vergleich zu Sepalen	44
3.1.2.2.3	Gene mit erniedrigtem Expressionsniveau in Petalen im Vergleich zu Sepalen	52
3.1.3	Expressionsanalysen ausgewählter Gene mittels semiquantitativer RT-PCR	55
3.2	Isolierung von DEF-Zielgenen aus späten Petalenstadien	58
3.2.1	Morphologische Auswirkungen von Temperaturverschiebungs-Experimenten während der Petalenentwicklung bei <i>def-101</i> Mutanten	59
3.2.2	Expressionsprofil-Experiment mit einem späten Petalenstadium der <i>def-101</i> Mutante	61
3.2.2.1	Prozessierung und qualitative Prüfung der Makroarray-Daten	62
3.2.2.2	Regulierte ESTs nach Reduktion der DEF-Funktion in Petalen P3 der <i>def-101</i> Mutante	63
3.2.2.2.1	Funktionelle Untersuchung der DEF-Zielgene	65
3.2.2.3	Zielgene, die von DEF aktiviert werden	68
3.2.2.4	Zielgene, die von DEF reprimiert werden	70
3.2.3	Bestätigung der Makroarray-Daten mittels semiquantitativer RT-PCRs	72
3.3	Vergleichende Expressionsanalysen ausgewählter DEF-Zielgene in Mutante und Wildtyp	74
3.3.1	Auswahl einiger DEF-Zielgene für weitere Analysen	74
3.3.2	Ermittlung der vollständigen EST-Sequenzen der ausgewählten DEF-Zielgene	76
3.3.3	Vergleichende Expressionsanalysen ausgewählter DEF-Zielgene	77
3.3.3.1	Expression von <i>DEFICIENS</i>	79
3.3.3.2	Expression von <i>GLOBOSA</i>	80
3.3.3.3	Expression von <i>DEFTup 1</i> (<i>Extensin-ähnliches Gen</i>)	81
3.3.3.4	Expression von <i>DEFTup 2</i> (<i>Alpha Tubulin</i>)	82
3.3.3.5	Expression von <i>DEFTdown 1</i> (<i>RuBisCO Aktivase</i>)	83
3.3.3.6	Expression von <i>DEFTdown 2</i> (<i>Beta Glukosidase</i>)	84
3.3.3.7	Expression von <i>DEFTdown 3</i> (<i>hypothetisches Gen</i>)	85
3.3.3.8	Expression von <i>DEFTdown 4</i> (<i>PAP-ähnliches Gen</i>)	86
3.4	Charakterisierung der Genstruktur einiger DEF-Zielgene	88
3.4.1	Isolierung von Promotorfragmenten der ausgewählten Zielgene mittels RAGE Technik	88
3.4.2	Sequenzmotivanalyse der isolierten Promotorregionen	89
3.5	Test auf direkte Bindung der isolierten Promotorregionen einiger DEF-Zielgene durch das <i>DEFICIENS</i> Protein	92
3.5.1	Auswahl der zu testenden Promotorregionen	93
3.5.2	Entwurf und Test Gen-spezifischer Promotorprimer	93
3.5.3	X-ChIP-PCR-Analysen mit ausgewählten Promotorfragmenten der DEF-Zielgene	94
3.6	Weitere Aspekte der Expressionsanalyse der EST-Kollektion	98
3.6.1	ESTs mit invariantem Expressionsniveau	98
3.6.2	Temperatursensitive ESTs in Wildtyp Pflanzen	100
4	DISKUSSION	102
4.1	Petalenentwicklung in <i>Antirrhinum majus</i>	102
4.1.1	Während der Petalenentwicklung von <i>A. majus</i> werden mindestens ein Fünftel der exprimierten Gene reguliert	102
4.1.2	DEF und GLO zeigen eine unterschiedliche Expressionsdynamik innerhalb der Petalenentwicklung	104

4.1.3	Korrelation von Genexpressionsveränderungen mit morphologisch sichtbaren Differenzierungsprozessen	105
4.1.3.1	<i>Petalen des Stadiums P1 zeigen eine hohe Zellteilungsaktivität</i>	106
4.1.3.2	<i>Der schnelle Größenzuwachs der späten Petalen (P3 und P4) wird durch Zellstreckungsprozesse realisiert</i>	107
4.1.3.3	<i>Petalen des Stadiums P4 zeigen neben Zellstreckungsprozessen eine hohe metabolische Aktivität</i>	108
4.1.3.4	<i>Die Photosynthese wird innerhalb der Petalenentwicklung kontinuierlich reprimiert</i>	109
4.2	Isolierung von DEF-Zielgenen	110
4.2.1	Kombination von Makroarray Technik und temperatursensitiver <i>def-101</i> Mutante	111
4.2.2	Die Expression von über 100 ESTs reagiert auf eine ein- bis drei-tägige Reduktion der DEF-Funktion	112
4.2.3	Das regulatorische Potential von DEFICIENS erstreckt sich in Petalen des Stadiums 3 auf verschiedene Stoffwechselwege	113
4.2.3.1	<i>DEF kontrolliert das Zellstreckungswachstum während der späten Petalenentwicklung</i>	114
4.2.3.2	<i>DEF hemmt den Photosynthesestoffwechsel während der späten Petalenentwicklung</i>	115
4.2.3.3	<i>DEF und GLO werden unterschiedlich stark durch das DEF Protein reguliert</i>	115
4.3	Charakterisierung der ausgewählten DEF-Zielgene	117
4.3.1	<i>DEFTup 1 – ein Extensin-ähnliches DEF-Zielgen</i>	117
4.3.2	<i>DEFTup 2 – ein Alpha Tubulin ist Zielgen von DEF</i>	119
4.3.3	<i>DEFTdown 1 – eine RuBisCO Aktivase ist Zielgen von DEF</i>	120
4.3.4	<i>DEFTdown 2 – eine Beta Glukosidase ist Zielgen von DEF</i>	120
4.3.5	<i>DEFTdown 3 – ein hypothetisches DEF-Zielgen</i>	122
4.3.6	<i>DEFTdown 4 – ein PAP-ähnliches DEF-Zielgen</i>	123
4.4	Ausblick auf weitere Experimente	124
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
5.1	Abstract	128
6	LITERATURVERZEICHNIS	130
7	ANHANG	134
7.1	Sequenzen der Oligonukleotide	134
7.1.1	RT-PCR-Primer (nach Genen sortiert)	134
7.1.2	EST-Adapterprimer	136
7.1.3	RAGE GSP-Primer	136
7.1.4	Genomische Primer für X-ChIP-Studien	137
7.2	Hierarchische Cluster	139
7.3	Ergebnistabellen der Makroarray-Experimente	144
7.4	Danksagungen	158
7.5	Eidesstattliche Erklärung	159
7.6	Lebenslauf	160

Abkürzungsverzeichnis

Physikalische Einheiten, chemische Formeln, die gängigen Abkürzungen für Nukleotide sowie der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren sind nicht aufgeführt.

<i>A. majus</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
ad	bis
al.	alii
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	exprimierte cDNA (<i>expressed sequence tag</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
min.	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
O.D.	Optische Dichte
p.A.	zur Analyse
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
<i>scatterplot</i>	Streu-Diagramm
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde(n)

Spot	DNA-Element auf einem Nylonfilter
Tab.	Tabelle
<i>template</i>	DNA Matrize
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
Unigen	cDNA-Sequenz, die in einem Set von Genen einzigartig ist
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Blütenentwicklung von *Antirrhinum majus*

Die Blüten der Scrophulariaceae *Antirrhinum majus* sind nicht nur für die sie bestäubenden Insekten attraktiv, sondern erregten bereits 1838 zum ersten Mal auch wissenschaftliches Interesse (Paxton, 1838). In den nachfolgenden Jahrzehnten wurden viele Blütenmutanten dieser Pflanzenart beschrieben und Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts etablierte Erwin Bauer das Löwenmäulchen als Modellsystem für genetische Untersuchungen (Schwarz-Sommer *et al.*, 2003). Als ein typisches Beispiel für eine mit ihrem Pollinator ko-evolierte höhere Angiosperme zeigt die Blüte von *Antirrhinum majus* eine zygomorphe Symmetrie (siehe Abb. 1-1). Das charakteristische Erscheinungsbild der *Antirrhinum* Blüten beruht hauptsächlich auf den sehr großen und oftmals auffällig gefärbten Petalen. Die fünf Blütenblätter die eine Korolla formen, bilden zwei spezifische Bereiche aus, die Blütenröhre und die Blütenlappen. Abgesehen von dem ventralen Blütenblatt, welches den mittleren Bereich der Unterlippe bildet zeigen die zwei lateralen und die zwei dorsalen Petalen in sich eine dorsoventrale Asymmetrie.

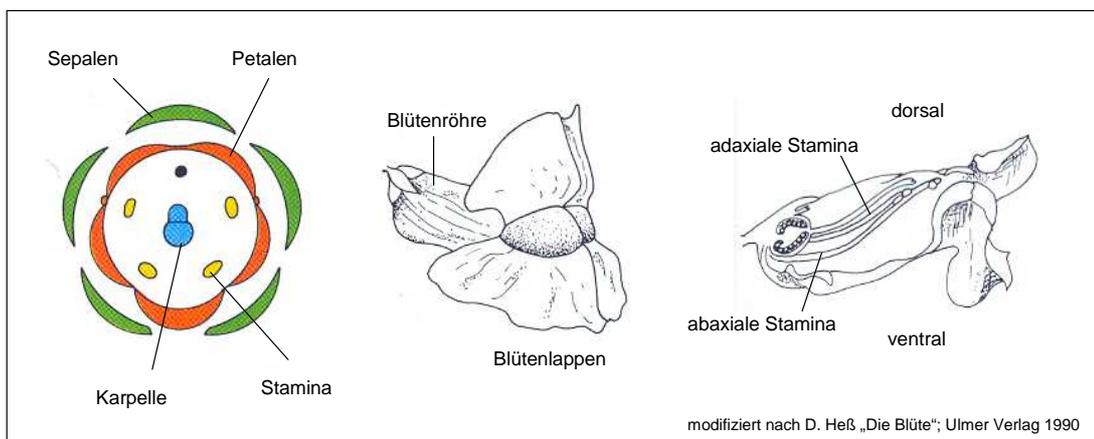


Abb. 1-1 Blütendiagramm und schematische Skizzen von *Antirrhinum* Blüten

Die Blüten von *Antirrhinum majus* besitzen 5 Sepalen, 5 an der Basis fusionierte Petalen, 4 Stamina plus ein Stamenoid und 2 fusionierte Karpelle. Die Organe sind in vier konzentrischen Blütenwirteln angeordnet. Die Blüten weisen eine zygomorphe Symmetrie auf.

Der durch die spezielle Blütenblatt-Faltung bedingte Klappmechanismus ermöglicht nur eine Bestäubung durch entsprechend große und schwere Insekten wie Hummeln, welche auf der Unterlippe landen, ihre Körper in die Blütenröhre schieben und bei Aufsammlung des Nektars von Pollen überzogen werden.

Ausgewachsene Petalen umfassen zwischen der einzelligen äußeren und inneren Epidermis 5-6 Mesophyll Zellschichten (Kay, 1988). Die Epidermis der *Antirrhinum* Petalen zeigt wie bei über 80% der Angiospermenarten spezialisierte Zellformen. Innerhalb der Blütenröhre und auf der äußeren Epidermis befinden sich Trichome und speziell nur in der inneren Epidermis der Petalen findet man die hochspezialisierten konischen Zellen. Sie sind mit einer besonders dicken Cuticulaschicht überzogen und ihre Form bewirkt, dass das einfallende Licht stärker von den in den Epidermiszellen lokalisierten Pigmenten absorbiert und somit weniger weißes Licht reflektiert wird. Dadurch erscheinen die Petalenbereiche farbintensiver und erhalten einen samtigen Glanz (Kay *et al.*, 1981).

Neben der markanten Symmetrie weisen die Petalen weitere interessante Charakteristika wie z.B. verschiedene Farbtöne, komplizierte Faltungen und eine mit der Anthese koordinierte Blütenöffnung und Duftproduktion auf. Außerdem findet in den frühen Differenzierungsphasen der Petalenentwicklung eine Umschaltung von einer Zellteilungs-geprägten Wachstumsphase zu einer Phase statt, in der der Größenzuwachs durch Zellstreckungsprozesse realisiert wird (Martin & Gerats, 1993). Alle genannten Merkmale spiegeln die Vielzahl der von der Petaleninitiierung bis zur Reife kontrolliert stattfindenden morphologischen und biochemischen Prozesse wider, die zur Ausbildung dieser Organe einer hoch entwickelten Angiospermblüte notwendig sind.

Viele dieser Prozesse wurden bereits anhand von Funktionsverlust-Mutanten untersucht und führten zur Isolierung einer Vielzahl von Genen, die spezifische Aufgaben innerhalb der Petalenmorphogenese spielen. Die meisten von ihnen zeigen eine spezifische, lokal und zeitlich regulierte Expression in verschiedenen Entwicklungsphasen von Petalen was ein Indiz dafür ist dass die Transkription dieser Gene durch übergeordnete Regulatoren kontrolliert wird. Durch Analysen von *Antirrhinum* Mutanten mit veränderter Blütensymmetrie wurden z.B. die Gene *CYCLOIDEA*, *DICHOTOMA* und *DIVARICATA* entdeckt (Stubbe, 1966; Luo *et al.*, 1999; Galego & Almeida, 2002). Pflanzen mit Störungen in der Pigment-Biosynthese wurden ebenfalls intensiv untersucht und trugen erheblich zum Verständnis der daran beteiligten Stoffwechselwege bei (Schwarz-Sommer *et al.*,

2003). Unter anderem wurden aus *Antirrhinum* die Gene *NIVEA*, *DELIA* und *PALLIDA* kloniert. Die Chalconsynthase, ein von *NIVEA* kodiertes Schlüsselenzym der Anthocyan-synthese, wurde bereits Mitte der achtziger Jahre erforscht (Sommer & Saedler, 1986). Dieses Gen wird hauptsächlich in Phasen der späten Blütenentwicklung exprimiert, wo eine starke Blütenblatrfärbung zu beobachten ist (Jackson *et al.*, 1992). *DELILA* reguliert die Verteilung der roten Anthocyan-Pigmentierung in *Antirrhinum* Blüten und seine Expression korreliert mit der Verteilung dieses Farbstoffs. Das Protein beinhaltet eine Region, die der konservierten „Helix-Loop-Helix“-Domäne der gleichnamigen Transkriptionsfaktorenfamilie sehr ähnlich ist (Goodrich *et al.*, 1992). *PALLIDA* ist ebenfalls ein Gen des Flavonoidstoffwechsels und wird von *DELILA* reguliert (Almeida *et al.*, 1989). Das von diesem Gen kodierte Enzym ist an der Anthocyan-synthese beteiligt und eine komplette Blockade der Expression der Dihydroflavonol-4-Reduktase resultiert in ungefärbten (elfenbeinfarbenen) Blüten (Coen *et al.*, 1986).

Mit *MIXTA* konnte 1994 ein weiteres wichtiges Regulatorgen aus der Petalenentwicklung identifiziert werden (Noda *et al.*, 1994). Dieser *MYB*-ähnliche Transkriptionsfaktor wird ebenfalls in späten Phasen der Petalenentwicklung exprimiert und ist notwendig zur Ausbildung der charakteristischen konischen Epidermiszellen in den Petalen (Glover *et al.*, 1998). Ein weiteres, speziell in Petalen exprimiertes Gen ist *BAMT*. Das Genprodukt ist eine Benzolsäure-Carboxyl-Methyltransferase, welche als finales Enzym der Methylbenzoat-Biosynthese die Reaktion von Benzolsäure und S-Adenosyl-L-Methionin zu Methylbenzoat und S-Adenosyl-L-Homocystein katalysiert. Der leicht flüchtige Ester Methylbenzoat ist Hauptbestandteil der von reifen *Antirrhinum* Blüten emittierten Duftstoffe. Die mRNA von *BAMT* ist nur in reifen Petalen und dort speziell in den Blütenlappen nachweisbar (Dudareva *et al.*, 2000).

1.2 Homöotische Transkriptionsfaktoren

Neben Funktionsverlust-Mutanten die Aberationen während der Organogenese bewirken, wurden in *Antirrhinum majus* auch eine Anzahl von Genen entdeckt, deren Mutanten eine veränderte Organidentität innerhalb der Blüten oder sogar generell keine floralen Strukturen mehr aufweisen. Erstere, zu denen *DEFICIENS*, *GLOBOSA* und *PLENA* gehören sind Organidentitätsgene, letztere sind mit den Vertretern *FLORICAULA* und *SQUAMOSA* in die Klasse der Meristemidentitätsgene einzuordnen (Lohmann & Weigel, 2002). Aus den Untersuchungen dieser Gene und ihrer funktionellen Orthologen in *Arabidopsis thaliana* ging das ABC-Modell hervor, welches die Festlegung der Organidentitäten der vier Blütenorgane durch eine kombinatorische Expression dreier unterschiedlicher Klassen von homöotischen Transkriptionsfaktoren beschrieb (Coen & Meyerowitz, 1991; Bowman *et al.*, 1991). Jede Klasse dieser A, B und C Gene wird dabei in zwei benachbarten Wirteln exprimiert und kontrolliert die Entwicklung der in diesen beiden Wirteln gebildeten Blütenorgane (siehe Abb. 1-2).

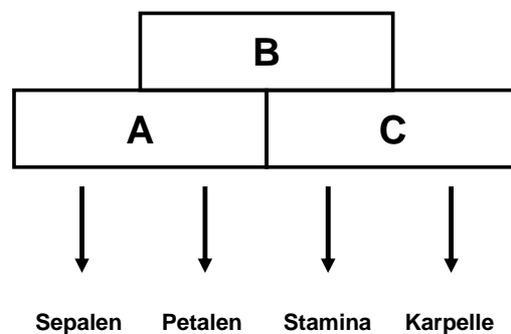


Abb. 1-2 Das ABC-Modell.

Drei Klassen von homöotischen Genen steuern die Organogenese der vier Blütenorgane.

Die B-Funktion wird in *Antirrhinum majus* durch die MADS-Box Gene *DEFICIENS* und *GLOBOSA* vermittelt, welche Schlüsselregulatoren der Petalen- und Staminaentwicklung sind. Blüten der Funktionsverlust-Mutanten sowohl von *DEF* als auch von *GLO* zeigen zwei äußere Wirtel von Sepalen und eine fusionierte karpelloide Struktur in der Blütenmitte (siehe Abb. 1-3).

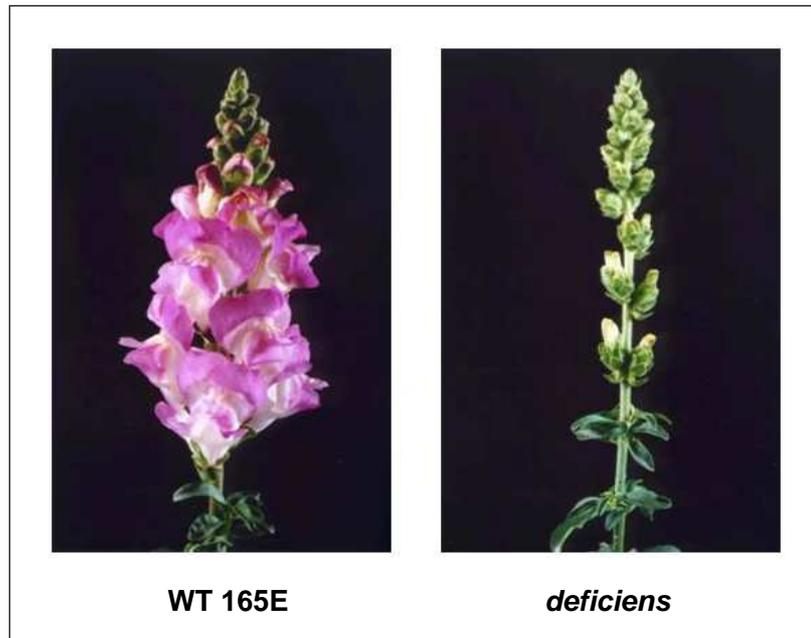


Abb. 1-3 Infloreszenzen von Wildtyp (Ecotyp 165E) und *def* Mutante von *A. majus*

Die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in Wildtyp Pflanzen ist hauptsächlich auf die Organe der zweiten und dritten Wirtels (Petalen und Stamina) begrenzt. In den restlichen zwei Blütenorganen ist nur eine sehr schwache Expression nachweisbar (Sommer *et al.*, 1991). Der Verlust der Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in Organen des zweiten Blütenwirtels führt zu einer homöotischen Konvertierung von Petalen zu Sepalen (Sommer *et al.*, 1990). Umgekehrt ist eine ektopische Expression von *DEF* und *GLO* in Sepalen hinreichend für eine Konvertierung zu Petalen (Davies *et al.*, 1996).

Temperaturverschiebungs-Experimente mit einer konditionalen *def* Mutante (*def-101*) wiesen nach, dass für eine korrekte Petalen- und Staminamorphogenese die DEF-Funktion kontinuierlich von der Organinitiation bis hinein in reife Stadien vorhanden sein muss (Zachgo *et al.*, 1995). Die Blüten der *def-101* Mutante zeigen unter nicht-permissiven Bedingungen (15°C) einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp. Auch hier sind mRNA und Proteine der beiden MADS-Box Gene hauptsächlich in Petalen und Stamina nachweisbar, allerdings ist die Expressionsstärke von *DEF* etwas geringer als in Wildtyp Blüten. Dieses leicht abgesenkte Expressionsniveau bewirkt ein kompakteres Erscheinungsbild der Blüten, deren Petalen verkürzt und intensiver gefärbt sind (siehe Abb. 1-4). Werden *def-101* Pflanzen unter permissiven Bedingungen (26°C) kultiviert, so zeigen sie

den Phänotyp einer *DEF*-Funktionsverlust-Mutante (siehe Abb. 1-4). Die Expression sowohl von *DEF* als auch von *GLO* ist in den Organen des zweiten Wirtels dieser Blüten stark reduziert und in dem zentralen feminisierten Organ fast gar nicht nachweisbar (Zachgo, 1995).

Durch Kombination der B-Funktionsverlust-Mutante *def-101* mit der C-Funktionsverlust-Mutante *plena* erhält man eine temperatursensitive B/C-Doppelmutante. Diese zeigt unter permissiven Bedingungen (15°C) einen *plena*-ähnlichen Phänotyp und unter nicht-permissiven Bedingungen (26°C) mit nur einem ausgeprägten Blütenorgantyp (Sepalen) den Phänotyp einer B/C-Doppelmutante (siehe Abb. 1-4). Die erhöhte Anzahl an Wirteln ist auf den Verlust der C-Funktion zurückzuführen, die in Wildtyp Blüten zusätzlich, neben der Regulation der Ausbildung der reproduktiven Organe, das Blütenmeristem terminiert.

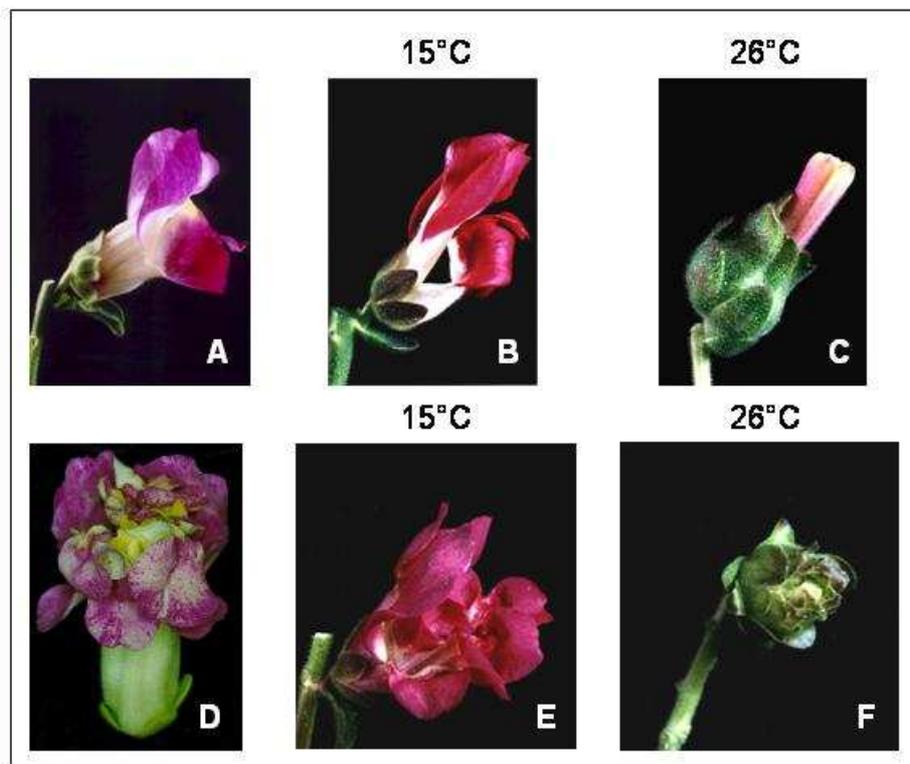


Abb. 1-4 Einzelblüten des Wildtyps und homöotischer Mutanten aus *Antirrhinum majus*.
A: WT 165E; **B:** *def-101* (15°C); **C:** *def-101* (26°C); **D:** *plena*; **E:** *def-101/plena* (15°C);
F: *def-101/plena* (26°C)

1.3 Zielgene von Transkriptionsfaktoren

Wie im letzten Abschnitt erwähnt, wird die Petalen- und Staminaentwicklung primär von den homöotischen Transkriptionsfaktoren *DEFICIENS* und *GLOBOSA* reguliert. Die Ausbildung dieser komplex aufgebauten Organe mit ihren diversen Geweben wird jedoch durch viele direkte und indirekte Zielgene dieser Schlüsselregulatoren und deren spezifische zeitliche und räumliche Expression realisiert (Bey *et al.*, 2002).

Trübner und Schwarz-Sommer konnten 1992 zeigen, dass *DEF* und *GLO* ihre eigene Transkription regulieren. Die autoregulative Kontrolle wird dabei durch eine Interaktion des aus *DEF* und *GLO* Proteinen gebildeten Heterodimer-Komplex mit spezifischen DNA-Motiven (CArG-Boxen) in den Promotoren beider Gene vermittelt (Trübner *et al.*, 1992; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992). Auch für *APETALA3*, dem Orthologen von *DEF* in *Arabidopsis* konnte eine Autoregulation nachgewiesen werden, bei der die im *AP3* Promotor befindlichen CArG-Boxen durch ein *APETALA3*/*PISTILLATA* Heterodimer gebunden werden (Riechman *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1998). Der Promotor von *PISTILLATA* hingegen, dem *Arabidopsis* Orthologen von *GLO*, enthält weder eine CArG-Box, noch wird ein für die Autoregulation als entscheidend geltender Promotorabschnitt von dem *AP3*/*PI*-Heterodimer gebunden (Honma & Goto, 2000). Diese Untersuchungen zeigten, dass MADS-Domänen Proteine in der Lage sind konservierte CArG-Box Elemente in regulatorischen Regionen ihrer Zielgene *in vitro* zu binden, dass eine Regulation jedoch nicht ausschließlich über die Interaktion mittels CArG-Boxen stattfinden muss. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sich die DNA-Bindeaffinität eines aus *DEF*, *GLO* und *SQUA* gebildeten ternären Komplex deutlich von denen der einzelnen Heterodimere unterscheidet (Egea-Cortines *et al.*, 1999). Folglich wird angenommen, dass die DNA-Bindenspezifität von MADS-Domänen Proteinen und ihre Fähigkeit zur Interaktion mit spezifischen Zielgenen sehr wahrscheinlich von Interaktionen mit ternären Faktoren abhängig ist und dadurch moduliert werden kann.

Um Zielgene von MADS-Box Genen zu isolieren, können mehrere Strategien verfolgt werden. Unter dem Aspekt der für MADS-Domänen Proteine *in vitro* gezeigten DNA-Bindefähigkeit, kann man zum einen *in silico* putativ regulative Sequenzen aus Daten-

banken nach Besitz von DNA-Bindemotiven (z.B. CARG-Boxen) durchsuchen. Des Weiteren bietet ein konditionales System, in dem die Funktion des Transkriptionsfaktors induziert werden kann die Möglichkeit, mit der Induktion korrelierende Expressionsveränderungen von Zielgenen zu untersuchen. Um jedoch direkte Zielgene zu isolieren, muss man biochemisch eine *in vivo* Interaktion zwischen MADS-Box Protein und gebundener regulatorischer DNA-Sequenz des entsprechenden Gens nachweisen.

Im Falle von *DEFICIENS* sind die Identitäten der Zielgene bislang noch weitgehend unbekannt, obwohl es viele Petalen-spezifisch exprimierte Gene wie z.B. *MIXTA*, *NIVEA*, *DELILA*, *PALLIDA* oder *BAMT* (siehe Abschnitt 1.1) gibt, die als Kandidaten diskutiert werden. In der Literatur wird jedoch über die Isolierung einiger Zielgene von anderen pflanzlichen MADS-Box Genen berichtet. Zum Beispiel konnte für ein, mit Hilfe eines AGAMOUS Antikörpers isoliertes genomisches DNA-Fragment die Bindung durch diesen Klasse C Transkriptionsfaktor in Gelretardierungs-Experimenten nachgewiesen werden (Ito *et al.*, 1997). Des weiteren wurde unter Benutzung des induzierbaren Glukocortikoid-Systems in Kombination mit der „*differential display*“ Technik *NAP*, das bislang einzige direkte Zielgen des *Arabidopsis* B-Funktionsgens *APETALA3* isoliert (Sablowski & Meyerowitz, 1998). In einer global ausgelegten Expressions-Studie benutzte Zik u.a. das gleiche induzierbare System in Kombination anderen B-Funktionsverlust-Mutanten aus *Arabidopsis* (Zik & Irish, 2002). Aus den Ergebnissen dieser Expressionsprofil-Experimente wurde gefolgert, dass durch die Aktivitäten von AP3 und PI ungefähr 200 Gene in Petalen und Stamina transkriptionell reguliert werden. Ebenfalls eine Kombination unterschiedlicher Methoden führte zur Isolierung von *DTA4*, einem Zielgen von AGL15 (Tang & Perry, 2003). Hier wurde zunächst durch eine PCR-gestützte Bindestellen-Selektion *in vitro* ein speziell von AGL15 gebundenes DNA-Motiv ermittelt. Bei der anschließenden *in silico* Suche nach Genen, die diese Bindestelle in ihrem Promotor besitzen wurde *DTA4* als perfekt übereinstimmender Kandidat gefunden und die Bindung von AGL15 an dieses cis-aktive Element durch die X-ChIP Technik nachgewiesen.

Diese Beispiele zeigen, dass eine Kombination verschiedener Strategien zur Isolierung von Zielgenen sinnvoll ist.

1.4 Die Array Technik

Nachdem Schena 1995 den ersten Artikel über ein Expressionsprofil-Experiment mittels cDNA Mikroarrays publizierte (Schena *et al.*, 1995) erfuhr die Array Technik in den folgenden Jahren einen rasanten Aufschwung in wissenschaftlichen Laboren. Als Hochdurchsatz Technik bot sie das Potential, die aufkommende Flut von Sequenzinformationen aus diversen Genomprojekten, welche kurze Zeit später komplett entschlüsselt vorlagen (Hefe 1996; *E. coli* 1997; *C. elegans* 1998; *Drosophila* 1999; *Arabidopsis* 2000 und Mensch 2000) effektiv zu nutzen (Draghici, 2003). Somit ebnete sie den Weg für die heutige Form der Genomik. Die Array Technologie erlaubt die Untersuchung der Transkriptomte von verschiedenen Zellen, Geweben, Organen oder ganzer Organismen durch eine simultane Erfassung der Expressionsprofile tausender Gene.

Bei dieser Technik unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Arrays: Mikroarrays und Makroarrays. Erstere sind Glas-Chips, auf die in einer sehr hohen Dichte entweder cDNA-Fragmente aufgebracht, oder Oligonukleotide direkt auf dem Chip synthetisiert werden. Die Anzahl der DNA-Elemente pro Chip kann hier die Größenordnung von 100.000 pro cm² erreichen. Jedes einzelne Mikroarray-Experiment erfordert eine kompetitive Hybridisierung eines Chips mit Sonden der Probe und Kontrolle, welche zuvor mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden (Shalon *et al.*, 1996). Die relativen Verhältnisse der Signale (Ratios) geben Aufschluss darüber, welche Gene stärker unter der einen oder der anderen Bedingung exprimiert sind.

Bei den Makroarrays, der zweiten Form von Arrays werden die DNA-Elemente auf positiv geladenen Nylonmembranen immobilisiert. Aufgrund der Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden ist die Dichte der Elemente geringer, jedoch ist die Methode sensibler da die Magnitude detektierbarer Signalstärken 10 fach höher ist als bei den Fluoreszenzfarbstoffen (Friemert *et al.*, 1989). Die in dieser Arbeit verwendeten Nylon-Filter weisen eine Dichte von über 36.000 DNA-Elementen auf einer Fläche von 22 x 22 cm auf. Ein entscheidender Vorteil von Makroarrays ist die Möglichkeit der mehrmaligen Wiederverwendung, was die laufenden Kosten dieser Art von Experimenten gegenüber Glas-Chips erheblich reduziert. Jedes Makroarray-Experiment liefert aufgrund der Hybridisierung mit nur einer Sonde absolute Intensitätsdaten, welche mit den Intensitätsdaten

aus anderen Hybridisierungen nach Prozessierung der Daten in beliebiger Kombination verglichen werden können.

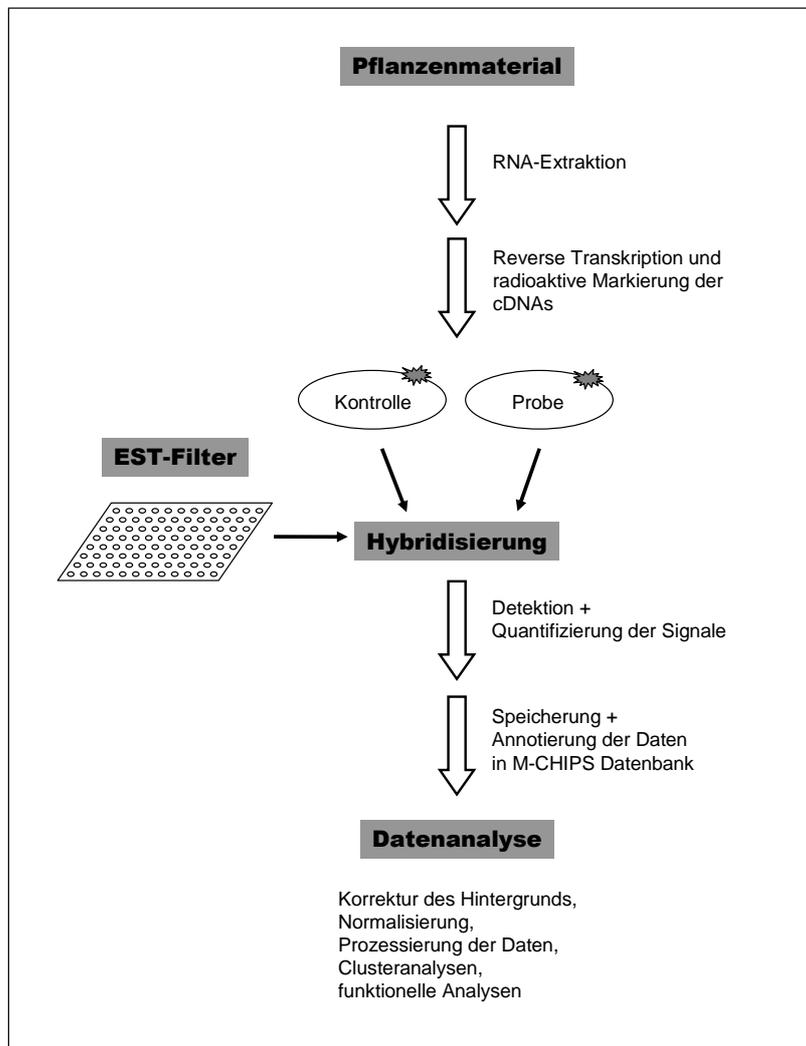


Abb. 1-5 Schematische Übersicht eines Makroarray-Experiments

Eine Übersicht des Ablaufs der in dieser Arbeit durchgeführten Makroarray-Studien ist in Abbildung 1-5 dargestellt, die dafür im Detail notwendigen Arbeitsschritte sind im Kapitel Material & Methoden (2.8) beschrieben. Es werden die Transkriptome verschiedener Konditionen (Proben) in Bezug zu einer Referenzbedingung (Kontrolle) untersucht. Der Ablauf von Expressionsprofil-Experimenten beinhaltet zum einen Arbeitsschritte die im Labor durchgeführt werden und anschließend einen mehrstufigen Prozess der Datenanalyse.

Die für die Makroarray-Experimenten verwendeten EST-Filter repräsentieren über 14.000 cDNA-Fragmente aus *Antirrhinum majus*, welche Bestandteil der EST-Kollektion sind (siehe Material & Methoden, Abschnitt 2.8.2). Die auf den EST-Filtern immobilisierten DNA-Elemente repräsentieren 11.600 unigene Sequenzen, die in bioinformatischen Untersuchungen der EST-Kollektion ermittelt wurden (Dr. Kurt Stüber, persönliche Mitteilung). Eine bioinformatische Analyse dieses Datensatzes ergab die in Abbildung 1-6 dargestellte Einteilung in funktionelle Kategorien in Anlehnung an die MIPS-Kategorien von *A. thaliana*. Die Verteilung der Häufigkeiten der dargestellten Kategoriezugehörigkeiten der unigenen ESTs aus *Antirrhinum* sind ähnlich zu der von den in *Arabidopsis thaliana* exprimierten Genen. Für *Antirrhinum* wird angenommen, dass diese 11.600 ESTs ungefähr 40% der gesamt vorhandenen cDNAs darstellen.

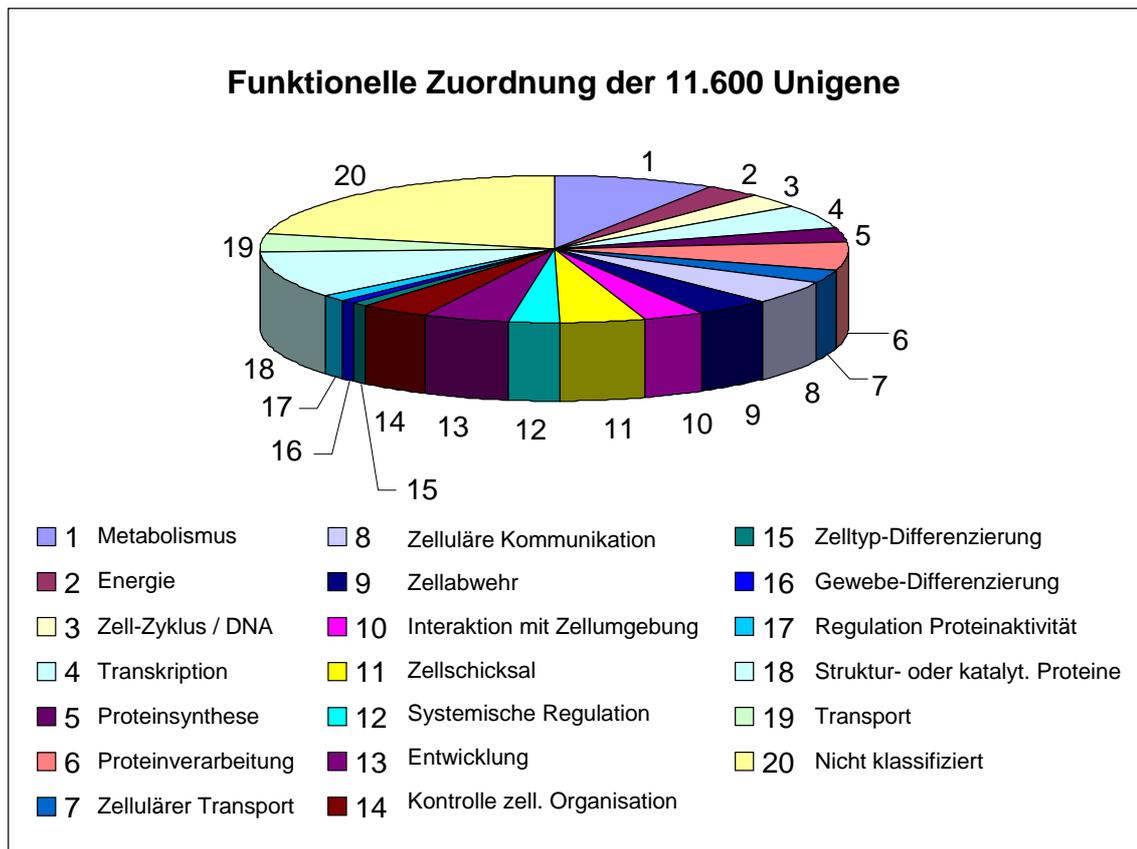


Abb. 1-6 MIPS-Kategorie Zuordnung der 11.600 Unigene der EST-Kollektion

Den 11.600 Unigenen aus der EST-Kollektion wurden nach dem unter 2.8.4.4 beschriebenen Verfahren funktionelle Kategorien nach Vorbild der MIPS-Analysen zugeordnet. Die Häufigkeit von 20 ausgewählten Kategorien innerhalb dieses Datensatzes sind hier mit Hilfe eines Tortendiagramms dargestellt.

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten aus Petalen von *Antirrhinum majus* Zielgene des Transkriptionsfaktors *DEFICIENS* isoliert und charakterisiert werden.

Über das homöotische MADS-Box Gen war bereits bekannt, das sich sein regulatorisches Potential über die gesamte Petalen- und Staminaentwicklung erstreckt und von frühen bis hinein in späte Entwicklungsphasen Interaktionen mit Zielgenen erfolgen (Zachgo *et al.*, 1995).

Zuerst sollte ein Vergleich der Transkriptome von Sepalen und Petalen die Identifizierung von Petalen-spezifischen Genen erlauben, welche unter der Annahme, dass sich Petalen und Sepalen primär durch eine vorhandene oder nicht vorhandene *DEF* Expression unterscheiden, gute Kandidaten für *DEF*-Zielgene repräsentieren. Um auch diejenigen Gene zu erfassen, deren Expression spezifisch in bestimmten Entwicklungsabschnitten reguliert wird, sollten die späten Petalendifferenzierungsphasen anhand morphologischer Kriterien in vier verschiedene Stadien eingeteilt, und deren Expressionsprofile ermittelt werden. Diese Studien sollten einerseits die Identifizierung spezifisch regulierter Gene in den definierten Entwicklungsstadien erlauben und durch funktionelle Analysen ko-regulierter Gene eine Korrelation von Genexpressionsveränderungen mit morphologischen Charakteristika der einzelnen Petalenstadien ermöglichen. Zudem sollte aufgrund der Resultate dieser Analysen eines dieser Petalenstadien für die Isolierung von *DEF*-Zielgenen ausgewählt werden.

Nach der Auswahl des am besten geeigneten Petalenstadiums sollte die Identifizierung der Zielgene durch eine kombinierte Nutzung der Makroarray Technik und einer *in vivo* induzierbaren Mutante (*def-101*) erfolgen.

Die daraus resultierenden *DEF*-Zielgene sollten funktionell eingeordnet und eine Auswahl von ihnen detaillierter charakterisiert werden. Neben einer Untersuchung der Expressionsmuster in Wildtyp und *def-101* Mutanten mittels Organ-spezifischer RT-PCR-Analysen, sollten Promotorbereiche der isolierten *DEF*-Zielgene isoliert und charakterisiert werden. Letzteres ermöglicht die Untersuchung von *in vivo* Interaktionen des *DEF* Proteins mit regulatorischen Elementen in den Promotoren der Zielgene mittels X-ChIP-PCR-Analysen und erlaubt die Identifizierung direkter Zielgene.

2 Material & Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ verwendet. Sie wurden von folgenden Firmen bezogen:

BIOMOL (Hamburg), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Fluka (Schweiz), Gibco-BRL Life Technologies (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe) Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Riedel de Häen (Hannover), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Seakem (USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (München)

Enzymatische Reaktionen wurden im Allgemeinen nach Anleitung der Hersteller durchgeführt. Die eingesetzten Enzyme stammten von den Firmen Gibco-BRL (Neu-Isenburg), Invitrogen (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), und Promega (Heidelberg).

Zwei unterschiedliche Radioisotope wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP und [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP. Ersteres wurde von der Firma Hartmann-Analytik (Braunschweig) bezogen und hatte eine spezifische Aktivität von 3000 Ci/mmol. Das [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP stammte von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) und hatte eine spezifische Aktivität von 2500 Ci/mmol.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Niederlande) und Metabion (Martinsried) bezogen, die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

2.2 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht explizit erwähnt, nach Sambrook et al. hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

Zur Plasmidpropagation wurden der *Escherichia coli* Stamm DH10B verwendet. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Plasmidvektor „pCR2.1[®]“ von Invitrogen benutzt. Die EST-Fragmente wurden in den Vektor pBluescript KS⁺ (Stratagene Cloning Systems, USA) kloniert.

2.3.2 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden *Antirrhinum majus* Pflanzen des Ecotyps WT165E verwendet, die entweder im Freiland, im Gewächshaus (18-22°C; 16h Licht) oder in Klimakammern kultiviert wurden. Pflanzenmaterial der *def-101* oder *def-101/plena* Mutanten wurde ausschließlich aus Klimakammern mit konstanter Temperatur (15°C „Kälte“ bzw. 26°C „Wärme“), identischen Lichtintensitäten (16h hell, 8h dunkel) und gleichmäßiger Luftfeuchtigkeit (60%) geerntet. Dabei wurden die Pflanzen zunächst nach der Aussaat bis zur Ausbildung von zwei bis drei Internodien unter Gewächshausbedingungen angezogen und dann in die Klimakammern transferiert.

2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach einer modifizierten Methode von Doyle und Doyle isoliert (Doyle & Doyle, 1990). Dabei wurde die DNA nach Degradation der RNA mit dem „DNeasy Plant Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die in dieser Arbeit verwendete genomische DNA aus *A. majus* Ecotyp WT165E wurde freundlicherweise von Dr. Z. Schwarz-Sommer zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Benutzung des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die in dieser Arbeit verwendete Gesamt-RNA wurde entweder mit dem „BIOMOL Total RNA Reagenzien“ der Firma BIOMOL oder dem „RNeasy Plant Mini Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentrationen der isolierten RNA-Proben wurden unter Benutzung einer Quarzküvette photometrisch bestimmt.

2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gestützte Verfahren

2.5.1 Standard PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktionen wurden in einem programmierbaren Thermoblock mit beheizbarem Deckel der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Primer-Anlagerungstemperaturen variierten je nach Länge und GC-Gehalt der Oligonukleotide zwischen 55°C und 63°C. Die Synthesezeiten waren von der zu erwartenden Fragmentgröße abhängig. Standardmäßig wurden 2.5 Units der *Taq* DNA Polymerase von Qiagen in einem 50 µl PCR-Ansatz unter folgenden Reaktionsbedingungen benutzt:

<u>Reaktionsbedingungen</u>	<u>PCR-Ansatz</u>
95°C 2 min.	1-5 ng <i>template</i> DNA
95°C 30 sek.	5 µl (10x) Qiagen PCR Puffer
56°C 30 sek.	2 µl [10 mM] dNTP-Mix
72°C 1 min.	1 µl [10 µM] Primer 1
72°C 5 min.	1 µl [10 µM] Primer 2
15°C unendlich	0.5 µl DNA Polymerase
	<i>ad</i> 50 µl H ₂ O

In der Regel wurden die mittels PCR-Reaktionen amplifizierte DNA-Fragmente gelelektrophoretisch im Agarose-Gel aufgetrennt und durch UV-Licht-Fotografie dokumentiert.

2.5.2 Genomische PCR

PCR-Reaktionen in denen 2-10 ng genomische DNA als Matrize verwendet wurde, wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Standard-PCR-Reaktionen durchgeführt mit dem Unterschied, dass zur Denaturierung der DNA-Stränge der Reaktionsansatz im ersten Schritt für 5 min auf 95°C erhitzt wurde.

2.5.3 Genomische Linker PCR zur Isolierung von genomischen DNA-Fragmenten

Die Technik der genomischen RAGE-PCR (*Rapid amplification of genomic ends*) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet genomische flankierende Bereiche der bekannten cDNA-Sequenzen von EST-Klonen zu isolieren (Siebert *et al.*, 1995; Cormack & Somssich, 1997).

Die Durchführung der Experimente folgte dem „Universal GenomeWalker™ Kit“ von Clontech. Zur Herstellung der als PCR *template* einzusetzenden Ligationsansätze wurde genomische DNA von *A. majus* benutzt, welche mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI oder *Eco*RV geschnitten wurde. Abweichend zu dem in der Anleitung von Clontech beschriebenen Verfahren wurde den zwei verschachtelten PCRs zur Amplifizierung genomischer DNA-Fragmente eine lineare PCR vorgeschaltet, in der nur der erste Gen-spezifische Primer (GSP1) eingesetzt wurde. Diese sollte die Spezifität der amplifizierten DNA-Fragmente erhöhen. Im Folgenden sind die Reaktionsbedingungen und PCR-Ansätze der drei nacheinander durchgeführten PCR-Reaktionen aufgelistet.

Lineare PCR

<u>Reaktionsbedingungen</u>	<u>PCR-Ansatz</u>
95°C 2 min.	0.5 µl DNA Ligationsansatz 5 µl (10x) PCR Puffer “High Fidelity” 1µl [10 mM] dNTP-Mix 1µl [10 µM] GSP1 1 µl “Expand High Fidelity”-Enzymmix ad 50 µl H ₂ O
95°C 30 sek.	
68°C 30 sek.	
68°C 5 min.	
68°C 10 min.	
15°C unendlich	

30x

Erste PCR

<u>Reaktionsbedingungen</u>	<u>PCR-Ansatz</u>
95°C 2 min.	1 µl (1:50) PCR-Produkt der linearen PCR 5 µl (10x) PCR Puffer “High Fidelity” 1µl [10 mM] dNTP-Mix 1 µl [10 µM] Adapterprimer nAP1 1 µl [10 µM] GSP1 1 µl “Expand High Fidelity”-Enzymmix ad 50 µl H ₂ O
95°C 20 sek.	
68°C 30 sek.	
68°C 6 min.	
95°C 20 sek.	
68°C 30 sek.	
68°C 6 min. + 20 sek./ Zyklus	
68°C 20 min.	
15°C unendlich	

11x

30x

Zweite PCR

<u>Reaktionsbedingungen</u>	<u>PCR-Ansatz</u>
95°C 2 min.	1 µl (1:50) PCR-Produkt der ersten PCR
95°C 20 sek.	5 µl (10x) PCR Puffer "High Fidelity"
68°C 30 sek.	1 µl [10 mM] dNTP-Mix
68°C 6 min.	1 µl [10 µM] Adapterprimer AP3
95°C 20 sek.	1 µl [10 µM] GSP2
68°C 30 sek.	1 µl "Expand High Fidelity"-Enzymmix
68°C 6 min. + 20 sek./ Zyklus	ad 50 µl H ₂ O
68°C 20 min.	
15°C unendlich	

Um die für die nachfolgende Klonierung benötigten Adenin-Überhänge an die doppelsträngigen PCR-Produkte anzuhängen, wurden den Ansätzen nach erfolgter zweiter PCR 0,5 µl *Taq* DNA Polymerase (Qiagen) zugegeben und sie für 10 min. bei 72°C inkubiert. Danach wurden die mit Hilfe dieser Methode amplifizierte genomischen DNA-Fragmente unter Benutzung des „NucleoSpin[®] Extract Kit“ von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers aus Agarose-Gelen extrahiert und für nachfolgende Klonierungen aufgereinigt.

2.5.4 Semiquantitative RT-PCR-Analysen

Zur semiquantitativen Gen-spezifischen Expressionsanalyse wurde zunächst Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben von *A. majus* WT Pflanzen und Mutanten isoliert (siehe 2.4.3). Die anschließende Erststrang-cDNA-Synthese und die PCR-Reaktion erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben der Firma Invitrogen, deren „SuperScript[™] II RNase H⁻ Reverse Transkriptase“ verwendet wurde. Um die erhaltenen cDNA-Mengen quantifizieren und für vergleichende PCR-Analysen abgleichen zu können, wurde der Reaktion zur Reversen Transkription der Proben eine minimale Menge an [α ³²P] dCTP zugesetzt. Der Anteil der eingebauten radioaktiv markierten Trisphosphate wurde im Scintillationszähler gemessen und als Maß für die Quantität der hergestellten cDNA benutzt.

Die hier durchgeführten RT-PCR-Analysen bestanden aus zwei Schritten: der Reversen Transkription und einer separat durchgeführten PCR-Analyse. Standardisiert wurde die

Erststrang-cDNA jeweils aus 2 µg Gesamt-RNA nach dem im Folgenden beschriebenen Verfahren hergestellt.

2 µg Gesamt-RNA ad 11 µl DEPC-H₂O
1 µl [500 µg/ml] Oligo (dT)₁₅ Primer (Roche)
0.1 µl (1:10) [α ³²P] dCTP

Die angegebenen Reagenzien werden zusammengemischt und für 5 min. auf 65°C erwärmt um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und eine Anlagerung der Primer-Moleküle zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine schnelle Abkühlung des Reaktionsansatzes auf Eis.

4 µl (5x) Erststrang Puffer (Invitrogen)
2 µl 0.1 M DTT (Invitrogen)

Nach der Zugabe der zwei oben genannten Lösungen und einer Durchmischung des Reaktionsansatzes wird dieser für 2 min. bei 43°C äquilibriert. Danach wird 1 µl (200U) des Enzyms „SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase“ hinzugegeben, gut gemischt und der Inhalt am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Es folgt eine 50 minütige Inkubation bei 43°C, in der die Reverse Transkription stattfindet. Gestoppt wird die Reaktion anschließend durch eine Hitze-Inaktivierung des Enzyms für 15 min. bei 70°C.

Die hergestellten cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract Kit“ von Macherey-Nagel aufgereinigt und in 35 µl Elutions-Puffer (Macherey-Nagel) aufgenommen.

Um sicherzustellen, dass die cDNA-Proben keine Verunreinigungen von genomischer DNA enthielten, wurde dies mittels einer genomischen Kontroll-PCR untersucht.

Für die semiquantitativen PCR-Analysen wurden die Erststrang-cDNA quantifiziert (s.o.) und in vergleichbaren Mengen als *template* eingesetzt. Zur Überprüfung dieses Abgleichs wurden bei allen RT-PCR-Analysen Kontrollen mit konstitutiv exprimierten Genen (*Ran3* oder *UPL2*) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen und der PCR-Ansatz entsprachen denen der Standard-PCR (2.5.1), nur die Zyklenzahlen wurden je nach Expressionsstärke der untersuchten Gene variiert.

2.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen erfolgten mit dem TOPO TA pCR[®]2.1-TOPO Klonierungssystem von Invitrogen. Dabei wurden die Vorgaben des Herstellers befolgt.

2.7 DNA-Sequenzierungen

Alle Sequenzierreaktionen wurden von der ADIS-Servicegruppe (*Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung*) am MPIZ durchgeführt.

2.8 Expressionsprofil-Experimente mittels Makroarray Technik

2.8.1 Die *Antirrhinum majus* EST-Kollektion

In Kollaboration mit Dr. Zsuzsanna Schwarz-Sommer, Dr. Hans Sommer und Dr. Kurt Stüber wurde eine *Antirrhinum* EST-Kollektion erstellt, welche cDNAs aus 12 verschiedenen reproduktiven und vegetativen Geweben von *Antirrhinum majus* enthält. Nach einer partiellen Sequenzierung von über 23.000 EST-Klonen konnten 11.600 Unigene ermittelt werden. Die EST-Kollektion repräsentiert ungefähr 40% der für *Antirrhinum* geschätzten Anzahl an cDNAs. Eine funktionelle Analyse der Sequenzen dieses EST-Gesamtsets bei denen ihnen funktionelle Kategorien im Stil der MIPS-Analysen von *A. thaliana* zugeordnet wurden, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Kurt Stüber durchgeführt (siehe auch 2.8.4.4). Das Resultat dieser Analyse ist in der Abbildung 1-6 (siehe Einleitung) dargestellt.

Sämtliche EST-Sequenzen sind mit den Ergebnissen ihrer Sequenzvergleiche in einer Datenbank (Genagent <http://charon.mpiz-koeln.mpg.de/GenAgent/index.php3>) gespeichert. Die letzte Aktualisierung der Sequenzvergleiche für die gesamte EST-Kollektion

fand am 22.08.2002 statt. Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich die im Ergebnisteil gezeigten Sequenzähnlichkeiten auf diese Quelle.

2.8.2 Die EST-Filter

Die so genannten „EST-Filter“ stellen 22 x 22 cm große Nylonmembranen dar, auf denen über 14.000 in Plasmidvektoren integrierte EST-Sequenzen immobilisiert wurden. Diese über 14.000 DNA-Elemente repräsentieren neben den 11.600 Unigenen zusätzliche ESTs aus großen Genfamilien. Das Aufbringen der Plasmide auf die Membranen wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) durchgeführt. Die DNA-Elemente wurden dabei als Duplikate in einem 4 x 4 Muster in sechs großen Bereichen aufgebracht. Jeder Bereich umfasst 16 Reihen und 24 Spalten von 4 x 4 Musterelementen (siehe Abb. 2-1).

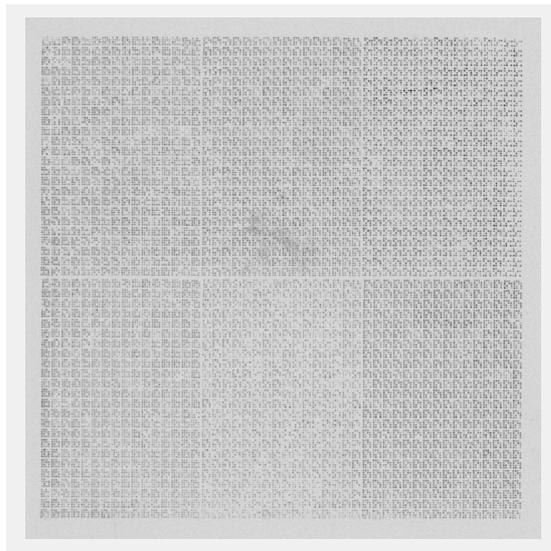


Abb. 2-1 Autoradiografie eines radioaktiv hybridisierten EST-Filters

Als Sonde wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment des pBS KS⁺-Vektors benutzt.

2.8.3 Experimentelle Durchführung der Makroarray-Experimente

Eine Übersichtsabbildung des Verlaufs der in dieser Arbeit durchgeführten Makroarray-Experimente wurde bereits in der Einleitung dargestellt. Die detaillierten Schritte dieser Analysen werden im Folgenden beschrieben.

In einem Makroarray-Experiment wird die Gesamtheit der vorhandenen mRNAs in dem zu untersuchenden Gewebe (Probe) mit der Gesamtheit der vorhandenen mRNAs einer Referenzbedingung (Kontrolle) verglichen. Dazu werden die aus dem Proben- und Kontrollmaterial extrahierten Gesamt-RNAs einer Reversen Transkription unterzogen, bei der die in der Gesamt-RNA vorhandenen mRNA-Moleküle in cDNA-Moleküle umgeschrieben werden. Gleichzeitig werden in dieser Reaktion durch Zugabe von [α ^{33}P] dCTP die entstehenden cDNAs markiert. Die so entstandenen komplexen Sonden werden zur Hybridisierung der EST-Filter benutzt.

2.8.3.1 *Erststrang-cDNA-Synthese mit radioaktiver ^{33}P -Markierung*

Das Startmaterial der Erststrang-cDNA-Synthese zur Herstellung der radioaktiven Sonden ist die nach Kapitel 2.4.3 extrahierte Gesamt-RNA. Auf Eis werden 25-30 μg der jeweiligen Gesamt-RNA mit 1 μl [500 $\mu\text{g}/\text{ml}$] Oligo (dT)₁₅ Primer (Roche) versetzt und das Volumen mit DEPC-behandelten Wasser auf 11 μl gebracht. Der Ansatz wird für 10 min. auf 70°C erhitzt und danach für weitere 10 min. bei 43°C äquilibriert. Danach werden

6 μl (5x) Erststrang Puffer (Invitrogen)

3 μl 0.1 M DTT (Invitrogen)

3 μl [10 mM] dAGT-Mix

3 μl [50 μM] dCTP

3 μl 30 μCi [α ^{33}P] dCTP

1 μl (200U) SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen)

zugegeben, der Ansatz gut gemischt, am Gefäßboden gesammelt und für eine Stunde im Wasserbad bei 43°C inkubiert. Hier findet die Reverse Transkription mit gleichzeitigem Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide statt. Nach Ablauf der Zeit wird die Reakti-

on gestoppt und die nicht mehr benötigte RNA hydrolysiert. Dies geschieht durch Zugabe von

1 μ l 1% SDS

1 μ l [0.5 M] EDTA

3 μ l [3 M] NaOH

Nach Mischen aller Komponenten wird der Ansatz ein halbe Stunde bei 65°C inkubiert und danach 15 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend wird die Probe mit 10 μ l [1 M] Tris (pH = 8.0) und 3 μ l einer 2 normalen HCL-Lösung neutralisiert.

Nun erfolgt die erste Messung, die später zur Ermittlung der Einbaurate notwendig ist. Dazu wird 1 μ l der insgesamt 48 μ l entnommen und der cpm-Wert (*counts per minute*) mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt. Den restlichen 47 μ l werden

5 μ l [3 M] Na-Acetat (pH = 5.3)

5 μ l (10 mg/ml) tRNA

60 μ l eiskalter Isopropanol

zugefügt und dadurch die synthetisierten cDNAs gefällt. Nach einer halben Stunde Inkubation bei -20°C wird die Probe für 30 min bei 13.000 rpm (*rounds per minute*) zentrifugiert. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstands wird das am Boden befindliche Pellet kurz getrocknet und dann in 96 μ l destilliertem Wasser resuspendiert. Für die zweite Messung wird von 2 μ l der resuspendierten cDNA der cpm-Wert ermittelt.

Zur Bestimmung der Einbaurate wird der Quotient aus dem ersten und zweiten Messwert berechnet und mit dem Faktor 100 multipliziert. Für die Makroarray-Hybridisierungen wurden nur Sonden eingesetzt, deren Einbaurate bei mindestens 30 Prozent lag.

2.8.3.2 Hybridisierung der EST-Filter

„Mock“- Prä- und die eigentlichen Hybridisierungen wurden in großen Hybridisierungsröhren (Biometra) in Hybridisierungsöfen der Firma Hybaid durchgeführt. Die Entfernung der radioaktiven Sonden erfolgte in größeren Flüssigkeitsvolumina in Kunststoffschalen.

Hybridisierungspuffer: [0.5 M] Na-Phosphat (pH = 7.2)
7 % SDS
[1 mM] EDTA

Wasch-Puffer: [40 mM] Na-Phosphat (pH = 7.2)
0.1 % SDS

Strip-Puffer: [5 mM] Na-Phosphat (pH = 7.2)
0.1 % SDS

„Mock“-Hybridisierung

Die „Mock“-Hybridisierung stellt eine Pseudo-Hybridisierung ohne Zugabe einer Sonde dar. Ansonsten wird sie analog einer normalen Prä-Hybridisierung mit nachfolgender Hybridisierung durchgeführt. Zweck der „Mock-Hybridisierung“ ist die Entfernung überschüssiger DNA-Mengen, die nach dem Aufbringen der DNA-Elemente zwar auf den Nylon-Membran haften, aber nicht kovalent mit ihr verbunden sind und deshalb innerhalb oder nach der ersten Hybridisierung entfernt werden.

Prä-Hybridisierung

Zur Prä-Hybridisierung werden die sich in den Hybridisierungsröhren befindlichen EST-Filter mit 25 ml Hybridisierungs-Puffer und 500 µl [5 mg/ml] denaturierter Lachssperma-DNA versetzt und damit 1-2 Stunden bei 65°C im Ofen gleichmäßig gerollt.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde die Prä-Hybridisierungslösung erneuert und dann eine zuvor für 5 min bei 100°C denaturierte radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht (16h) bei einer Temperatur von ebenfalls 65°C. Danach wurden die Filter zweimal für je 30 min mit 40 ml Wasch-Puffer bei 65°C in den Hybridisierungsröhren gewaschen.

Entfernung radioaktiver Sonden und Wiederverwendung der EST-Filter

Die in dieser Arbeit verwendeten EST-Filter konnten bis zu neunmal hybridisiert werden. Zur Entfernung der alten Sonden wurden jeweils bis zu vier Filter in einer großen Plastikschale mit einem Liter aufgekochten Strip-Puffer übergossen und für 30-60 min geschwenkt, so dass die Lösung auf Raumtemperatur herunterkühlte. Diese Prozedur wurde ein zweites Mal wiederholt. Die Effizienz der Entfernung der alten Sonden wurde über-

prüft indem die Filter erneut eingescannt und die Höhen der maximalen Intensitäten verglichen wurden. Die Filter wurden erneut hybridisiert, wenn die Signalintensitäten um mindestens 90% reduziert waren.

2.8.3.3 Detektion der Signale radioaktiv hybridisierter EST-Filter

Hybridisierte und gewaschene EST-Filter wurden kurz auf 3MM-Papier (Whatman) ange trocknet, so dass keine Flüssigkeitstropfen mehr sichtbar waren. Danach wurden sie sehr glatt und unbedingt blasenfrei in Saranfolie (Roth) eingepackt und diese dicht verschlossen. Die so eingepackten Filter wurden für 21h auf Schirme („Storage Phosphor screens“) der Firma Molecular Dynamics exponiert und die Signale mit Hilfe eines Phosphor Imagers (Typ „typhoon“) und einer Auflösung von 50 μm eingelesen. Dadurch erhielt man digitalisierte Bilder von radioaktiv hybridisierten EST-Filtern.

2.8.4 Computerunterstützte Auswertung der Makroarray-Experimente

Die Datenanalyse wurde mit den hier im einzelnen aufgeführten Programmen vollzogen. Einfache Tabellenkalkulationen und die Aufbereitungen von M-CHIPS-Analysen wurden mit dem Programm Excel v6.0 von Microsoft durchgeführt.

2.8.4.1 Quantifizierung der Signale

Die Signalintensitäten der digitalisierten Bilder von radioaktiv hybridisierten EST-Filtern wurden mit Hilfe der AIS Array Vision v5.0 Software (Imaging Research) ermittelt. Bei diesem Programm wird zunächst eine Maske erstellt, die die Größe und Form der zu quantifizierenden Signalspots hat. Zusätzlich werden die Positionen der Duplikate und einige Extra-Elemente definiert, die den lokalen Hintergrund in festgelegten Bereichen des Bildes messen. Zur Quantifizierung wird die Maske über das Bild der eingescannten Hybridisierung gelegt und zunächst automatisch angepasst. Nach einer Überprüfung, ob alle Signale richtig erfasst werden und eventuellen manuellen Korrekturen der Lage der

Maske, werden sowohl die Signalspot-Intensitäten als auch die Intensitäten der als Hintergrund definierten Bereiche quantifiziert.

Die Intensitäten werden verknüpft mit ihren Positionsinformationen als Excel-kompatible Tabelle gespeichert.

2.8.4.2 Speicherung, Prozessierung und Analyse der Makroarray-Daten mittels M-CHIPS

Da Makroarray-Experimente eine extreme Menge an Daten generieren ist, zur Verarbeitung der Ergebnisse die Benutzung von Datenbanken sinnvoll. Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Kollaboration mit Dr. Kurt Fellenberg (DKFZ) initiiert, welcher in seiner Doktorarbeit ein Konzept eines Datenbank basierten Systems entwickelt hat, das speziell für die Speicherung, Prozessierung und Analyse von Array-Daten optimiert wurde (Fellenberg *et al.*, 2002). Das M-CHIPS System (*Multi-Conditional Hybridization Intensity Processing System*) bietet neben den genannten Funktionen zusätzlich die Möglichkeit experimentelle Annotierungen der einzelnen Experimente zu erfassen was die Standardisierung der Dokumentation durchgeführter Array-Studien erlaubt und eventuelle Kombinationen separat generierter Organismen-spezifischer Array-Daten ermöglicht.

Mit Hilfe von K. Fellenberg wurde eine in dem M-CHIPS System eingebundene *Antirrhinum*-spezifische Datenbank (Am1) generiert. In dieser Datenbank wurden die experimentell annotierten Intensitäten-Tabellen sämtlicher durchgeführter Hybridisierungen mit einer eindeutigen Zuordnung bezüglich Makroarray-Studie, Kondition und Hybridisierung gespeichert. Neben der Positionsinformation und den Signalintensitäten enthalten die Einträge auch die zugehörige EST-Nummer und das beste Ergebnis des Sequenzvergleichs.

Experimentelle Annotierung

Bei einer so sensitiven Methode wie der Array Technik ist eine Durchführung der Experimente unter standardisierten Bedingungen erforderlich. Jedoch ist die Einhaltung aller Parameter bei Arbeiten mit lebenden Organismen wie z.B. Pflanzen aus dem Gewächshaus nicht immer möglich. Um eine Überprüfung eventueller Varianzen der Daten zu erleichtern, wurden deshalb sämtliche mit dem durchgeführten Experiment verbundene Daten erfasst, welche die Datenqualität beeinflussen könnten. Dazu gehörten z.B. die Me-

thode der RNA-Isolierung, der Erntezeitpunkt, die Einbaurate oder die Expositionslänge der Filter. Die komplette Auflistung der Parameter ist im Internet unter (<http://www.dkfz.de/tbi/services/mchips>) einsehbar.

Korrektur des Hintergrunds und Normalisierung

Bei der Quantifizierung der Signale mittels der Array Vision Software wurde für jeden einzelnen Quadranten (4 x 4 Muster, siehe 2.8.2) der lokale Hintergrund bestimmt. Am Anfang der Datenanalyse mittels der M-CHIPS Methode wurde der lokale Hintergrund von den Signalintensitäten subtrahiert. Danach erfolgte die Normalisierung der Daten die notwendig ist um Intensitäten verschiedener Hybridisierungen miteinander vergleichen zu können. Unter den verschiedenen Normalisierungs-Arten wurde in dieser Arbeit aufgrund der hohen Anzahl an DNA-Elementen die Methode der globalen Normalisierung über alle auf dem Filter befindliche Elemente gewählt. Bei dieser Methode wird angenommen, dass der größte Teil der Signalstärken (> 80%) einer Hybridisierung in der Größenordnung des Hintergrunds liegt und nur sehr wenige DNA-Elemente ein starkes Hybridisierungssignal aufweisen (Beissbarth *et al.*, 2000). Die Hintergrund-korrigierten und global normalisierten Hybridisierungssignale wurden für alle weiteren Datenauswertungen benutzt.

Um die Datenqualität der einzelnen Hybridisierungen zu ermitteln wurden *Pearson* Korrelationskoeffizienten berechnet und damit sowohl die Filterqualität als auch die Reproduzierbarkeit der Daten innerhalb einer Kondition überprüft. Die Berechnungen erfolgten nach der hier dargestellten Formel:

$$\begin{aligned} \rho_{xy} &= \frac{Cov(XY)}{s_x \cdot s_y} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{n-1}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}}} = \\ &= \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \end{aligned}$$

Der Pearson Korrelationskoeffizient ist ein dimensionsloses Maß um die lineare Relation zweier Datensätze zu messen. Er setzt sich zusammen aus der Kovarianz zweier Datensätze die durch die Standardabweichungen beider Elementmengen dividiert wird. Generell kann er absolute Werte zwischen 0 und 1 einnehmen und ist sehr sensitiv gegenüber Ausreißern (Draghici, 2003).

Korrespondenz-Analyse

Das Verfahren der Korrespondenz-Analyse ist eine innerhalb der M-CHIPS-Analyse eingebundene Methode zu Identifizierung differentiell exprimierter Gene. Die genauen Parameter dieser Auswertungsmethode sind in der Publikation von Fellenberg und seinen Mitarbeitern beschrieben (Fellenberg *et al.*, 2001). Neben der Ermittlung der relativen Expressionsänderungen der Gene in allen Konditionen im Vergleich zur Referenzbedingung wird die statistische Absicherung der Daten überprüft. Dabei wird unterschieden, ob die jeweiligen Expressionsdaten eines DNA-Elements dem strengen Min/Max-Kriterium oder dem nicht ganz so strengen Standardabweichungskriterium genügen (siehe Abbildung 2-2; (Beissbarth *et al.*, 2000)). Während bei einem Vergleich von zwei Datensätzen zur Erfüllung des Min/Max Kriteriums alle Werte des einen Datensatzes größer als alle Werte des anderen sein müssen, erlaubt das Standardabweichungskriterium bis zu einem gewissen Maß „Ausreißer“-Werte, solange eine Differenz zwischen den Mittelwerten zuzüglich einfacher Standardabweichung der Datensätze bestehen bleibt.

Qualitätskriterien – Filtern der Ergebnisdaten

Aus einer hier durchgeführten Makroarray-Studie gehen die Expressionsprofile von über 14.000 ESTs hervor. Allerdings ist nur ein Bruchteil von ihnen im Hinblick auf die Identifizierung differentiell exprimierter Gene wirklich interessant und verwendbar für die nachfolgenden Auswertungen. Um diese ESTs aus dem Gesamt-Datensatz zu selektieren und gleichzeitig definierte Qualitätskriterien zu überprüfen, wurden die aus der Korrespondenz-Analyse hervorgehenden Daten anhand der nachfolgenden Kriterien gefiltert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die in dieser Arbeit als reguliert definierten ESTs hinreichend exprimiert, ausreichend reproduzierbar und ihre gemessenen Expressionsunterschiede statistisch abgesichert waren.

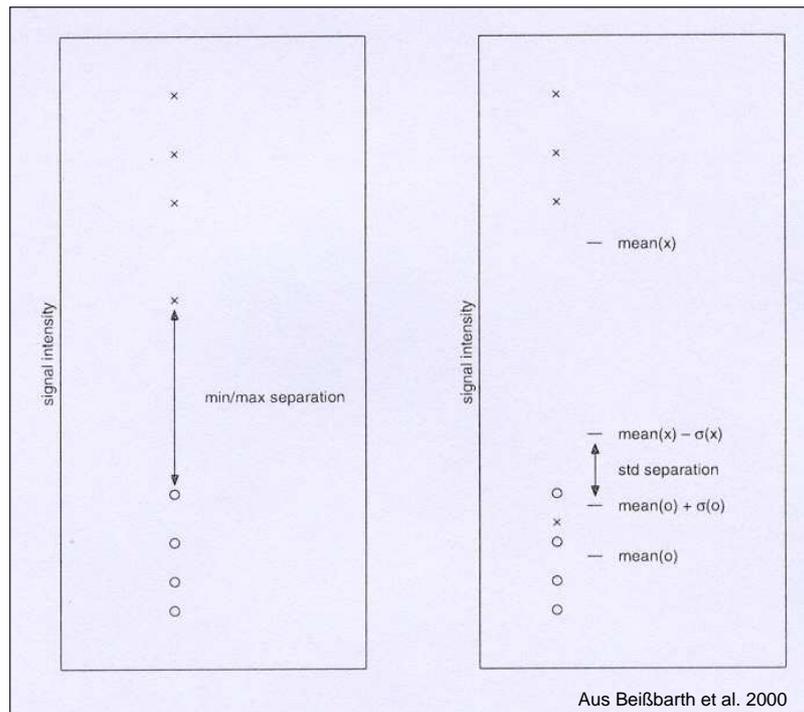


Abb. 2-2 Schematische Darstellung des Kriterien zur statistischen Absicherung der differentiell exprimierten Gene aus M-CHIPS-Analysen

x bzw o stellen Intensitätsdaten aus den zwei zu vergleichenden Datensätzen dar.

Zunächst wurden durch ein **Intensitäts-Kriterium** diejenigen Gene bestimmt, die unter den untersuchten Bedingungen ausreichend exprimiert sind. Wie bereits im Abschnitt über die Normalisierung erwähnt, zeigen bei der hier durchgeführten Art von Expressionsprofil-Experimenten nur ca. 20 % der hybridisierten DNA-Elemente eine Signalstärke, die deutlich über der des Hintergrunds liegt. Die übrigen 80% der Gene sind nur sehr schwach exprimiert und zeigen aufgrund dieser geringen Signalintensitäten oft große relative Expressions-Ratios, die sich aber in einer nur minimalen absoluten Differenz der Expressionsniveaus begründen (Beissbarth *et al.*, 2000). Dadurch stellen sie eine wesentliche Quelle für Falschpositive dar und werden deshalb von vorneherein von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Dazu wurde unter Benutzung des M-CHIPS Systems für jedes multikonditionale Expressionsprofil-Experiment (Gesamtheit aller innerhalb einer Mikroarray-Studie verglichenen Hybridisierungen) ein Intensitäts-Schwellenwert bestimmt, welcher die niedrigste absolute Intensität der 20% am stärksten exprimierten Gene darstellte. In die folgenden Datenauswertungen wurden nur solche ESTs einbezogen, deren

Expression in mindestens einer untersuchten Kondition über diesem Schwellenwert lag. Diese ESTs wurden damit gleichzeitig als „exprimiert“ definiert.

Als nächstes wurde für die Makroarray-Daten ein **Ausschlußkriterium** von 1.2 fach festgelegt, dass die minimale Expressionsabweichung als differentiell exprimiert betrachteter Gene definiert. Untersuchungen der Expressionsprofile ausgewählter ESTs mittels unabhängiger Methoden konnten über 80% der ESTs die diesem Kriterium genügten als differentiell exprimiert bestätigen (siehe 3.1.3 und 3.2.3).

Die **statistische Absicherung** erfolgte über die bereits unter dem Punkt Korrespondenz-Analyse erwähnten Kriterien (siehe auch Abb. 2-2). Es wurden nur solche Gene als differentiell exprimiert betrachtet, deren Abweichungen in mindestens einer untersuchten Kondition entweder dem Min/Max-Kriterium oder wenigstens dem Standardabweichungskriterium genügten.

2.8.4.3 Clusteranalysen mittels GENESIS

Die Software von GENESIS ist ein von der bioinformatischen Abteilung der TU Graz zur Verfügung gestelltes Werkzeug um u.a. hierarchische Clusteranalysen mit Array-Daten durchzuführen. Die dabei benutzten Algorithmen sind mit denen der 1998 von Eisen entwickelten Programme „Cluster“ und „Tree View“ vergleichbar (Eisen *et al.*, 1998). Alle hier dargestellten Analysen wurden mit der Programmversion GENESIS v1.2.2 unter Benutzung des Pearson Korrelationskoeffizienten als Distanzmatrix durchgeführt. Bei dieser Methode zur Untersuchung ähnlich regulierter Gene werden die relativen Änderungen der Expressionen zweier Datensets stärker bewertet als deren absolute Differenzen. Dadurch werden ko-regulierte Gene unabhängig von ihren absoluten Expressionsunterschieden, aufgrund ihrer ähnlichen relativen Expressionsmuster ermittelt. Die Ergebnisse werden graphisch als hierarchische Cluster formiert, in denen die unterschiedlich starken Expressionsabweichungen jedes einzelnen Gens im Bezug zur Expression der jeweiligen Referenzbedingungen farblich kodiert dargestellt werden.

2.8.4.4 Funktionelle MIPS-Kategorie-Analysen

Die MIPS-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kurt Stüber (MPIZ) durchgeführt. Die bioinformatischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe von PERL-Scripten, welche von K. Stüber erstellt wurden.

Mit dieser Methode ist es möglich unbekannte cDNAs aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten *Arabidopsis* Genen in funktionelle Kategorien einzuteilen. Diese Einteilung wurde für die im Jahr 2000 bekannten über 27.000 kodierenden Sequenzen von *A. thaliana* durchgeführt und ist im Internet zugänglich.

Die EST-Sequenzen der aus dieser Arbeit hervorgegangenen interessanten Datensets wurden zunächst mit dem Programm BLASTX mit den bekannten Proteinen aus *Arabidopsis* verglichen und dadurch die jeweiligen *Arabidopsis* Gene mit der größten Sequenzähnlichkeit für die untersuchten ESTs bestimmt. Die dem nächst ähnlichsten *Arabidopsis* Gen zugeordneten funktionellen Kategorien wurden dann für den jeweiligen EST übernommen und so die Häufigkeiten der vorkommenden MIPS-Kategorien in dem untersuchten Datensatz ermittelt. Bei den Analysen wurden alle 100 MIPS-Kategorien berücksichtigt, aus Gründen der Übersicht sind in den Abbildungen jedoch nur 20 ausgewählte Kategorien dargestellt.

2.9 Sequenzanalysen und Datenbanksuchen

Sequenzvergleiche mit Nukleinsäure- bzw. Proteindatenbanken der BLAST-Programme erfolgten im *world wide web* (www) unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Die Untersuchungen der genomischen DNA-Fragmente zur Identifizierung von cis-aktiven Elementen wurden unter Benutzung der PLACE (*Plant cis-acting regulatory DNA elements*) Datenbank durchgeführt (Higo *et al.*, 1999).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Petalenentwicklung von *Antirrhinum majus*

Die Blütengröße von *A. majus* ermöglicht es, sowohl organ- als auch stadienspezifisches Material zu ernten und damit die Genexpression in frühen bis späten Phasen der Petalenentwicklung zu analysieren.

Die MADS-Box Gene *DEFICICENS (DEF)* und *GLOBOSA (GLO)* sind Schlüsselregulatoren der Petalen- und Staminaentwicklung (siehe Einleitung). Frühere Untersuchungen wiesen bereits darauf hin, dass DEF die Expression von Zielgenen nicht nur in frühen, sondern bis in sehr späte Blütenentwicklungsphasen hinein reguliert (Bey *et al.*, 2002). Um einen Überblick über die Stärke der Regulationsaktivitäten innerhalb der Petalenentwicklung zu bekommen, wurden in dem ersten Teil der Arbeit Expressionsprofil-Experimente mit definierten Petalenentwicklungsstadien durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dann aus Stadien mit besonders hoher Expressionsdynamik mittels weiterer Transkriptomanalysen unter Benutzung eines induzierbaren Systems DEF-Zielgene aus Petalen isoliert.

3.1.1 Einteilung der Petalenentwicklung in definierte Stadien

Zur Untersuchung der temporären Regulation der Petalenentwicklung wurden die späteren Differenzierungsphasen von *A. majus* (Ecotyp WT165E) die nach dem Abschluss der Organinitiierung der Blütenblattmorphogenese erfolgen in vier verschiedene Stadien (P1 bis P4) eingeteilt (siehe Abb. 3-1). Kriterien für die Einteilung waren Blütenlänge, Grad der Petalenfärbung, Entfaltung und Zeitpunkt der Anthese. Die Zunahme der Blütenlänge im zeitlichen Verlauf ist ebenfalls graphisch in Abb. 3-1 dargestellt. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass Petalen der Stadien P1 und P2 Phasen intensiver Zellteilun-

gen sind, während in den Stadien P3 und P4 der Größenzuwachs eher auf Zellstreckungsprozesse zurückzuführen ist (Martin & Gerats, 1993).



Abb. 3-1 Einteilung der Petalentwicklung von *A. majus* (WT165E) in vier Stadien

Fotografie der Blüten von *Antirrhinum majus* aus den 4 definierten Stadien 1-4. Daneben ist der Längenzuwachs der Blüten über die Zeit während dieser Entwicklungsphasen schematisch skizziert. Blütenlängen: Stadium 1: 0.5 – 0.8 cm; Stadium 2: 0.8 – 1 cm; Stadium 3: 1 – 2 cm; Stadium 4: 2 – 4 cm.

Die Blütenblätter im Stadium P1 sind noch annähernd vollständig von den Kelchblättern umschlossen und zeigen noch keine Anthocyanproduktion. Die Gesamtblüte ist 0.5 – 0.8 cm lang, die Filamente der Stamina wie auch der Griffel sind noch nicht gestreckt.

Nach 2.5 Tagen Wachstum befinden sich die Blüten im Stadium P2 (0.8 – 1 cm Blütenlänge). Hier beginnen sich die Petalen, welche nun schon 2 - 3 mm aus der Sepalumumantelung herausragen, an den Spitzen rötlich zu färben. Die Stamina liegen in der Höhe immer noch gleichauf mit den Organen des 4. Wirtels, wobei sich sowohl die Filamente (jetzt ca. ½ cm lang) als auch der Griffel leicht gestreckt haben. In Stadium 3 beginnt die Phase des schnellen Blütenwachstums. In nur 3.5 Tagen verdoppelt sich die Blütenlänge von 1 auf 2 cm. Deutliches Elongationswachstum ist an der Basis der Petalen, bei den Filamenten und dem Griffel zu beobachten. Die Filamente überwachsen in dieser Entwicklungsphase die Karpelle und zeigen zudem abhängig von ihrer adaxialen oder abaxialen Position (siehe Abb. 1-1, Einleitung) ein unterschiedlich starkes Längenwachstum. Die Petalen des Stadiums P3 sind deutlich gefärbt, aber noch geschlossen. Im späten Stadium P3 wird die Furchung sichtbar, die die an der Basis zusammengewachsene Korolla in Ober- und Unterlippe trennt. Zum Ende des Stadiums P3 und während Stadium P4 strecken sich die einige mm längeren abaxialen Stamina, so dass ihre Theken am Ende

des Stadiums P4 über der Narbe positioniert sind. Dadurch wird eine erfolgreiche Selbstbestäubung gewährleistet. Im Stadium P4, welches bis zur Anthese dauert, verdoppelt sich die Blütenlänge abermals innerhalb von zwei bis drei Tagen von 2 auf 4 cm. Dieser Größenzuwachs geht einerseits auf ein anhaltendes Streckungswachstum, andererseits auf die Entfaltung der Blütenblätter zurück. Die Filamente erreichen ihre Endlänge, die Antheren öffnen sich und die Duftemission beginnt nachdem die Blüten 2-3 Tage geöffnet sind (Dudareva *et al.*, 2000).

3.1.2 Genexpressionsanalyse der Wildtyp Petalenentwicklung mittels Makroarray Technik

Die Stärke der Makroarray Technik ist es, mit nur einer Hybridisierung parallel das Expressionsniveau mehrerer tausend Gene in einem Gewebe zu erfassen. Hier wurden multikonditionale Expressionsprofil-Experimente unter Verwendung von Nylon-EST-Filtern durchgeführt, auf denen 11.600 Unigene in Form von Plasmiden mit klonierten cDNA-Fragmenten aus *Antirrhinum majus* immobilisiert waren (siehe Material & Methoden, Kapitel 2.8.2).

In diesem Teil der Arbeit werden die Petalenstadien P1-P4 mit einer Mischung aus Sepalenstadien verglichen (Kapitel 3.1.2.2). Dabei wurden erstens „Petalen“- und „Sepalenspezifische“ Gene identifiziert, die in diesen beiden Organen unterschiedlich reguliert sind und gleichzeitig ihre Expressionsdynamik während der Petalenmorphogenese ermittelt.

Neben dem Gesamtset der in Petalen regulierten Gene, wurden interessante Subgruppen ko-regulierter Gene bioinformatisch hinsichtlich ihrer funktionellen Zuordnung untersucht. Ziel dieser Analyse war die Korrelation differentiell exprimierter Gene mit morphologischen Differenzierungsprozessen.

In dem hier durchgeführten multikonditionalen Expressionsprofil-Experiment (im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch „WT Stadien“ genannt) wurde das Transkriptom fünf verschiedener Konditionen (Sepalenmix, Petale P1, Petale P2, Petale P3 und Petale P4) untersucht. Das parallel geerntete Pflanzenmaterial, aus welchem die Gesamt-RNA isoliert

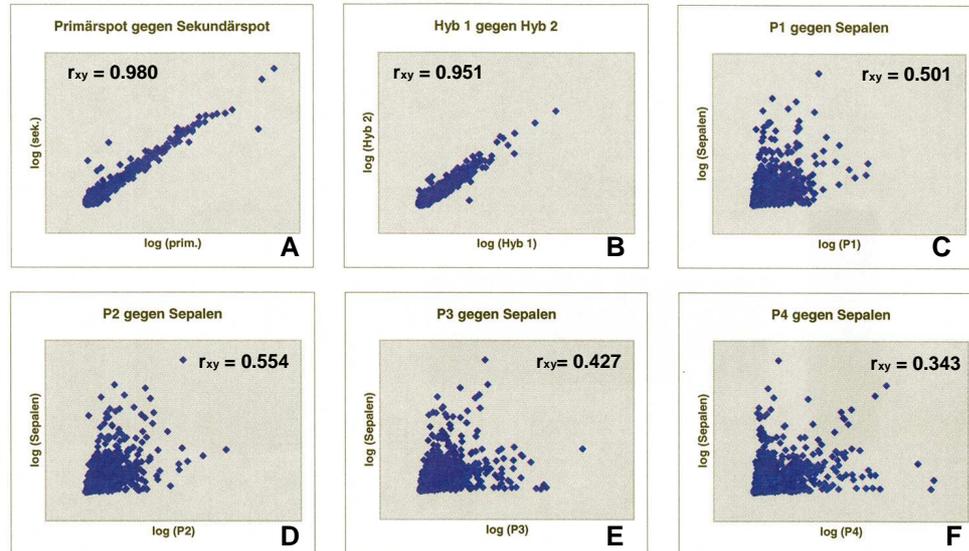
wurde, stammte von mindestens zwanzig WT165E Pflanzen, die zeitgleich unter Gewächshausbedingungen aufwuchsen. Im Gegensatz zu dem stadienspezifisch prozessierten Petalen-Material, wurden für die Sepalen-Proben Kelchblätter aller vier Entwicklungsstadien vereinigt. Für die jeweils drei Hybridisierungen pro Kondition wurde zur Generierung der radioaktiv markierten Sonden Gesamt-RNA aus mindestens zwei unabhängigen Isolationen benutzt.

3.1.2.1 Prozessierung und qualitative Prüfung der Makroarray-Daten

Die Auswertung aller Makroarray-Experimente erfolgte in Kollaboration mit Dr. Kurt Fellenberg (DKFZ). Zur Prozessierung der Daten wurde das Verfahren der M-CHIPS-Analyse (*Multi-conditional Hybridization Intensity Processing System*) (Fellenberg *et al.*, 2002) unter Benutzung der in Material & Methoden beschriebenen Kriterien angewendet (siehe Kapitel 2.8.4). Im Zuge der Prozessierung wurden sämtliche Hybridisierungen experimentell annotiert und diese Zusatzinformationen zusammen mit den Intensitäten der Hybridisierungen in einer M-CHIPS Datenbank (Am1) gespeichert (<http://www.dkfz.de/tbi/services/mchips>). Auch die vollständigen Ergebnistabellen der durchgeführten M-CHIPS Analysen sind unter der genannten Adresse abrufbar und werden deshalb nicht einzeln in dieser Arbeit aufgeführt. Die Ergebnistabellen spezieller Subdatensets, auf welche in den folgenden Kapiteln eingegangen wird, sind im Anhang aufgeführt.

Nach der Detektion und Quantifizierung der Hybridisierungssignale aller Hybridisierungen eines multikonditionalen Expressionsprofil-Experiment (hier „WT Stadien“) wurden zunächst die lokalen Hintergründe abgezogen und danach die Signalstärken normalisiert, um aus unterschiedlichen Hybridisierungen stammende Daten miteinander vergleichen zu können. Als Abgleichungsmethode wurde das Verfahren der globalen Normalisierung über alle auf dem Filter befindliche Elemente gewählt. Diese Methode eignet sich besonders für Makroarray-Experimente mit einer großen Anzahl an Elementen, da aus früheren Array-Studien hervorging, dass der größte Teil der Gene (ca. 80%) unter den jeweils un-

tersuchten Bedingungen nicht exprimiert wird und ihre Intensitäten im Bereich des Hintergrundniveaus liegen (Beissbarth *et al.*, 2000).



Korrelationskoeffizienten des Expressionsprofil-Experiments „WT Stadien“

	(G) Filterqualität	(H) Reproduzierbarkeit	(I) Kondition / Kontrolle
Petale P1	Hyb1 prim/sek 0.971	Hyb1/Hyb2 0.961	P1 / Sepale 0.501
	Hyb2 prim/sek 0.971	Hyb1/Hyb3 0.861	
	Hyb3 prim/sek 0.940	Hyb2/Hyb3 0.879	
Petale P2	Hyb1 prim/sek 0.974	Hyb1/Hyb2 0.951	P2 / Sepale 0.554
	Hyb2 prim/sek 0.976	Hyb1/Hyb3 0.886	
	Hyb3 prim/sek 0.974	Hyb2/Hyb3 0.915	
Petale P3	Hyb1 prim/sek 0.992	Hyb1/Hyb2 0.942	P3 / Sepale 0.427
	Hyb2 prim/sek 0.991	Hyb1/Hyb3 0.816	
	Hyb3 prim/sek 0.962	Hyb2/Hyb3 0.908	
Petale P4	Hyb1 prim/sek 0.995	Hyb1/Hyb2 0.982	P4 / Sepale 0.343
	Hyb2 prim/sek 0.995	Hyb1/Hyb3 0.952	
	Hyb3 prim/sek 0.980	Hyb2/Hyb3 0.953	
Sepalen	Hyb1 prim/sek 0.974	Hyb1/Hyb2 0.968	
	Hyb2 prim/sek 0.991	Hyb1/Hyb3 0.920	
	Hyb3 prim/sek 0.991	Hyb2/Hyb3 0.923	

Abb. 3-2 Korrelationskoeffizienten des Expressionsprofil-Experiments „WT Stadien“

Die Pearson Korrelationskoeffizienten wurden für die jeweils drei Hybridisierungen der fünf Konditionen (Sepale, Petale P1-P4) berechnet (siehe Material & Methoden). prim = Primärspot; sek = Sekundärspot; Hyb = Hybridisierung

Um die Qualität der Daten bezüglich Filterqualität und Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen Konditionen zu überprüfen, wurden die *Pearson* Korrelationskoeffizienten für die 15 hier durchgeführten Hybridisierungen berechnet (siehe Kapitel 2.8.4.2.). Bei einem Wert von 1 besteht eine perfekte Korrelation zwischen den Elementen der zwei verglichenen Datensets. Je kleiner der Wert (zwischen 1 und 0) ausfällt, desto größer ist die Varianz der Daten.

In Abbildung 3-2 sind die Korrelationskoeffizienten des hier durchgeführten Makroarray-Experiments aufgelistet und exemplarische *scatterplots* (= Streudiagramme) dargestellt. Die Berechnungen wurden mit den normalisierten Intensitäten aller auf dem Filter befindlichen Elemente durchgeführt. Zunächst wurden zur Abschätzung der Filterqualitäten die Intensitäten der primären Spots mit denen der aus derselben Hybridisierung stammenden sekundären Spots verglichen (Abb. 3-2 A und G). Dies zeigte, wie einheitlich die DNA-Mengen der Duplikate der auf den Filtern immobilisierten EST-Klone waren. Der durchschnittliche Wert der Korrelationskoeffizienten bei dieser Teilanalyse lag erwartungsgemäß hoch bei $r_{xy} = 0.978$.

Um die Reproduzierbarkeit der Makroarray-Analysen darzustellen, wurden nach dem gleichen Verfahren die jeweils 3 Hybridisierungen innerhalb einer Kondition miteinander verglichen (Abb. 3-2 B und H). Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient liegt hier etwas niedriger bei $r_{xy} = 0.921$. Der exemplarische *scatterplot* aus diesen Analysen zeigt, dass der allergrößte Teil der über 14.000 Datenpunkte immer noch auf oder in unmittelbarer Nähe der Diagonale liegt, welche ein konstantes Expressionsniveau anzeigt.

Ganz anders sehen die *scatterplots* aus, bei denen die gemittelten 3 Hybridisierungen einer Kondition mit denen der Kontrollkondition (Sepalen) verglichen wurden (Abb. 3-2 C,D;E;F und I). Die Datenpunkte zeigen eine große Streuung und die Korrelationskoeffizienten sind mit $r_{xy} = 0.501$ (P1), $r_{xy} = 0.554$ (P2), $r_{xy} = 0.427$ (P3) und $r_{xy} = 0.343$ (P4) deutlich niedriger. In diesen Fällen wurde nicht die Reproduzierbarkeit der Datensätze, sondern ihre Unterschiedlichkeit demonstriert. Je weiter ein Datenpunkt von der Diagonale entfernt ist, desto signifikanter variiert seine Expression zwischen den beiden Bedingungen. Der Aspekt, dass kaum noch Elemente mit höheren Intensitäten auf der Diagonale liegen zeigt, dass der größte Teil dieser Gene zwischen den zwei Organtypen reguliert wird. Am stärksten fällt die Regulation zwischen Petalen P4 und Sepalen aus.

Da für diese Arbeit primär diejenigen Gene von Interesse sind, welche signifikant unterschiedlich zwischen den untersuchten Bedingungen reguliert werden, wurden sie innerhalb der Auswertung aus dem Gesamtdatenset extrahiert. Gene, die im weiteren Verlauf als signifikant differentiell exprimiert bezeichnet werden, mussten drei Qualitätskriterien genügen (siehe auch Kapitel 2.8.4.2)

1. Intensitäts-Kriterium

Das absolute Expressionsniveau musste über dem, für jedes multikonditionale Expressionsprofil-Experiment bestimmten Intensitäts-Schwellenwert liegen.

2. Ausschlußkriterium

Die Expression musste in wenigstens einer Kondition eine minimal 1.2 fache Abweichung zu der Expression der jeweiligen Kontrollbedingung aufweisen.

3. Statistische Absicherung

Die Expressionsveränderung musste statistisch mindestens durch die Standardabweichungs-Separation abgesichert sein.

Die Festlegung des Intensitäts-Schwellenwerts ist notwendig, um Gene aus den weiteren Analysen auszuschließen, deren Expressionsstärke nur schwach über der Signalstärke des Hintergrunds liegt und welche somit eine große Quelle für falschpositive Daten sind (Beissbarth *et al.*, 2000). Das Ausschlußkriterium ist ein gesetzter Schwellenwert. Unabhängige Expressionsanalysen einer Auswahl von Genen aus Makroarray-Studien, die dort eine mehr als 1.2 fache Expressionsabweichung aufwiesen konnten im Allgemeinen mittels semiquantitativen RT-PCR-Analysen bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.3). Die statistische Absicherung der Makroarray-Daten erfolgte im Zuge der Auswertung mittels der M-CHIPS-Analyse (siehe Material & Methoden).

3.1.2.2 Vergleich der Expressionsprofile zwischen Petalen und Sepalen

Aus der Expressionsanalyse der vier Wildtyp-Petalenstadien im Vergleich zu einer Mischung aus Wildtyp-Sepalen aller Stadien mit einem Ausschlußkriterium von 1.2 gehen 537 ESTs hervor, die in mindestens einem Petalenstadium gegenüber den Sepalen differentiell exprimiert sind (siehe Tabelle 1; ausführliche Datentabelle im Anhang dieser Arbeit unter 7.4). Diese Zahl setzt sich zusammen aus 322 in Petalen aktivierten und 226 in Petalen reprimierten ESTs. 11 dieser ESTs zeigen innerhalb der Petalenentwicklung eine so starke Expressionsdynamik, dass sie in beiden Datensätzen vorkommen.

Erhöht man das Ausschlusskriterium auf eine mindestens 1.5 fache Abweichung, so reduzieren sich die Anzahlen der signifikant regulierten ESTs auf nur noch 158 (siehe Tabelle 1).

	Ausschlußkriterium 1.2	Ausschlusskriterium 1.5
Aktivierte ESTs in Petalen	322	80
Reprimierte ESTs in Petalen	226	78
Regulierte ESTs gesamt	537	158

Tabelle 1 Regulierte ESTs in Petalen im Vergleich zu Sepalen

Berücksichtigt sind alle ESTs, die in mindestens einem Petalenstadium im Vergleich zu Sepalen signifikant differentiell exprimiert sind.

Aus der genaueren Analyse des Expressionsverhaltens der 537 regulierten ESTs wird deutlich, dass der Grossteil der 226 reprimierten ESTs in allen vier Petalenstadien eine verminderte Expression gegenüber derer in Sepalen zeigt. Bei den 322 in den Petalen aktivierten ESTs erkennt man jedoch eine Dynamik: in Stadium P1 sind 104 ESTs signifikant aktiviert, in Stadium P2 nur 85, in Stadium P3 erhöht sich die Zahl auf 128 ESTs und erreicht den Höchstwert in Stadium P4 mit 174 signifikant hoch regulierten ESTs (siehe Abb. 3-3).

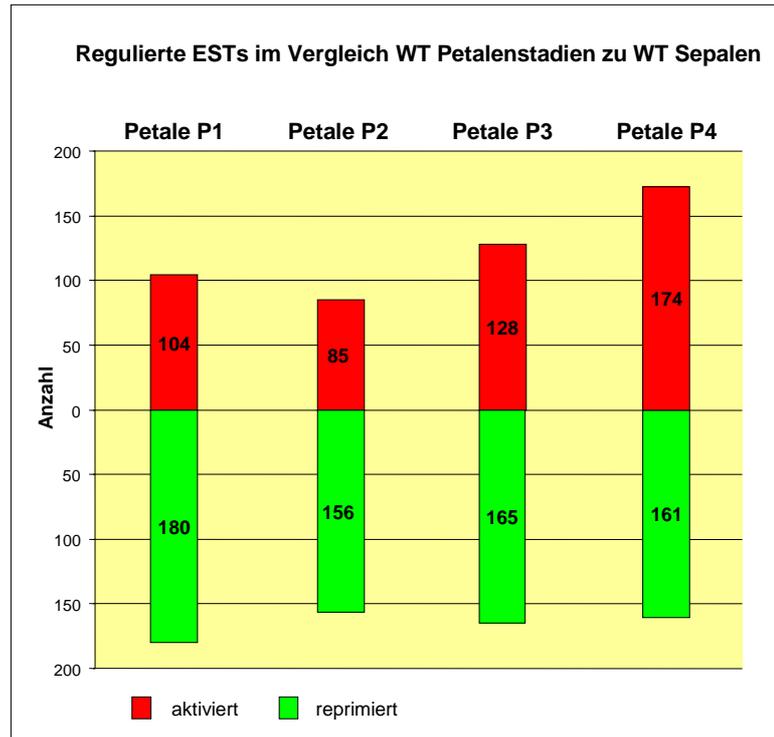


Abb. 3-3 Regulierte ESTs in WT Petalenstadien im Vergleich zu WT Sepalen

Berücksichtigt sind alle ESTs, die unter den untersuchten Bedingungen in mindestens einem Petalenstadium eine minimal 1.2 fache Abweichung zum Expressionsniveau in Sepalen zeigen.

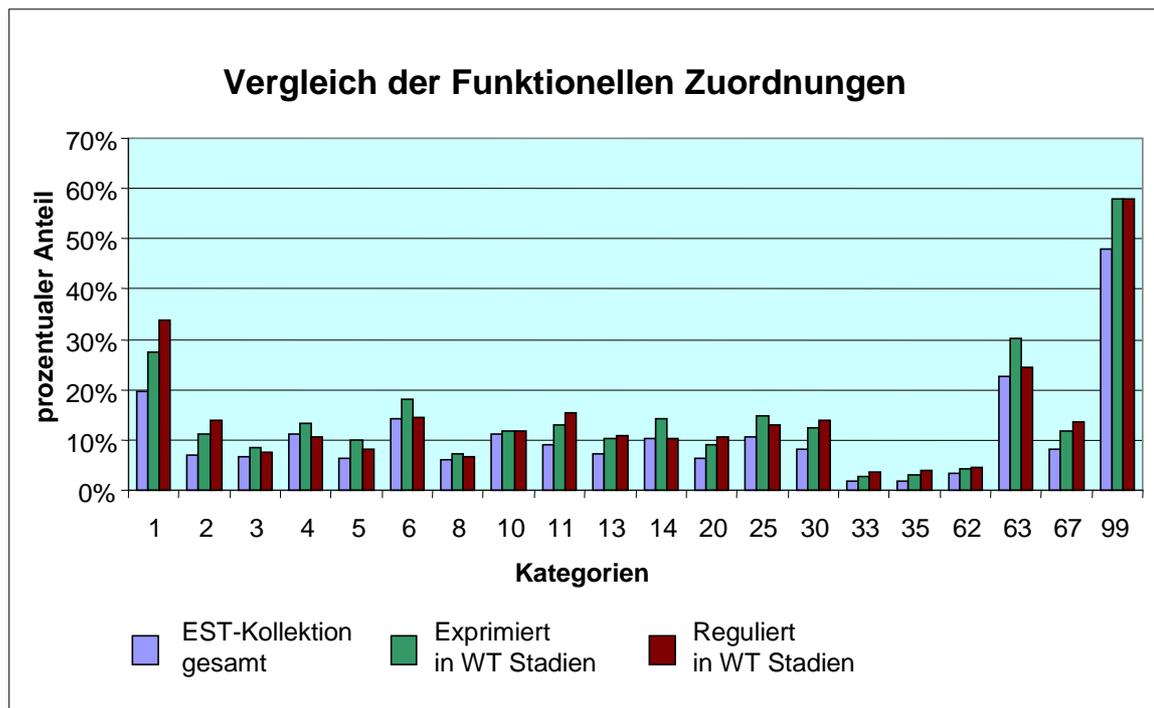
Besonders der Übergang von den zellteilungsintensiven jungen Petalenstadien (P1 und P2) zu den späten Petalenstadien (P3 und P4), bei denen das Zellwachstum hauptsächlich durch Zellstreckungsprozesse realisiert wird, ist mit einem Anstieg der Anzahlen der aktivierten Gene verbunden.

In den Kapiteln 3.1.2.2.2 und 3.1.2.2.3 werden die Expressionsprofile der 322 in Petalen aktivierten bzw. der 226 in Petalen reprimierten ESTs genauer analysiert.

Zunächst wird jedoch untersucht, welche funktionellen Aussagen über die 537 in der Petalenentwicklung regulierten Gene getroffen werden können.

3.1.2.2.1 Funktionelle Untersuchung der Expressionsdaten

Nach der Ermittlung der Anzahlen der während der Petalenentwicklung regulierten Gene wurde die biologische Relevanz dieser Genexpressionsänderungen untersucht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden den ESTs funktionelle Kategorien nach Vorbild der MIPS-Analysen für *A. thaliana* (<http://mpis.gsf.de>) zugeteilt und 20 dieser Kategorien in vergleichenden Analysen betrachtet.



MIPS-Kategorien:

1	Metabolismus	14	Zellschicksal
2	Energie	20	Systemische Regulation
3	Zell-Zyklus / DNA	25	Entwicklung
4	Transkription	30	Kontrolle zell. Organisation
5	Proteinsynthese	33	Zelltyp-Differenzierung
6	Proteinverarbeitung	35	Gewebe-Differenzierung
8	Zellulärer Transport	62	Regulation Proteinaktivität
10	Zellulärer Kommunikation	63	Struktur- oder Katalyt. Proteine
11	Zellabwehr	67	Transport
13	Interaktion mit Zellumgebung	99	Nicht klassifiziert

Abb. 3-4 Vergleich der funktionellen Zuordnungen der gesamten ESTs der *Antirrhinum*-Kollektion mit denen der in WT Petalenstadien exprimierten bzw. regulierten ESTs

Die Sequenzen der gesamten Unigene der *Antirrhinum* EST-Kollektion (11.600), der in WT Stadien exprimierten ESTs (2858) und der in WT-Petalen regulierten ESTs (537) wurden mit den Proteinsequenzen von *Arabidopsis thaliana* verglichen. Die jeweiligen MIPS-Kategorien der sequenzähnlichsten *A. thaliana* Gene wurden übernommen und die prozentualen Häufigkeiten der, in den drei Datensätzen vorkommenden MIPS-Kategorien verglichen.

Dafür war es zunächst notwendig, die Sequenzen der *Antirrhinum*-ESTs mit den verfügbaren Proteinsequenzen von *Arabidopsis thaliana* zu vergleichen. Die funktionellen Kategorien des nächst homologen Gens dieser vollständig sequenzierten Spezies wurden dann dem jeweiligen EST zugeordnet.

Dieser bioinformatische Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Kurt Stüber durchgeführt. Die dazu notwendigen Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des BLASTX-Programms unter Benutzung der Standardeinstellungen durchgeführt.

In der hier dargestellten Analyse wurde der Datensatz der gesamten *Antirrhinum* ESTs (11.600) mit dem der in WT Sepalen und Petalenstadien exprimierten ESTs (2856) und dem der in WT Petalen regulierten ESTs (537) verglichen.

In Abbildung 3-4 sind die Ergebnisse dieses Vergleichs für zwanzig ausgewählte MIPS-Kategorien dargestellt. Die prozentualen Anteile der drei Datensätze an den verschiedenen Kategorien sind für 15 von ihnen sehr ähnlich. Markante Unterschiede finden sich nur in fünf Kategorien, welche in dem Datensatz der exprimierten ESTs leicht und in dem der 573 regulierten ESTs deutlich überrepräsentiert sind. Bei den Kategorien handelt es sich um Metabolismus, Energie, Zellabwehr, Kontrolle der zellulären Organisation und Transport. Die prozentualen Anteile dieser funktionellen Kategorien der drei Datensets sind in Tabelle 2 detailliert aufgeführt.

Kategorie	ESTs gesamt	exprimiert in WT Stadien	reguliert in WT Stadien
Metabolismus	20%	27%	34%
Energie	7%	11%	14%
Zellabwehr	9%	13%	15%
Kontrolle der zell. Organisation	8%	12%	14%
Transport	8%	12%	14%

Tabelle 2 Vergleich der prozentualen Anteile der überrepräsentierten funktionellen MIPS-Kategorien des Datensets der in WT Petalenstadien regulierten ESTs

Angegeben sind jeweils die prozentualen Häufigkeiten der MIPS-Kategorien innerhalb der drei untersuchten Datensätze: EST-Gesamtset (11.600), in WT Petalenstadien exprimierte ESTs (2858); in WT Petalenstadien regulierte ESTs (537).

Während sich bei der Kategorie Metabolismus der prozentuale Anteil im Set der in Petalen P1-P4 regulierten ESTs im Vergleich zum Set der unigenen 11.600 ESTs um 70% erhöht, findet in den übrigen detailliert aufgeführten Kategorien nahezu eine Verdopplung der prozentualen Anteile statt.

Obwohl tendenzielle Unterschiede zwischen den untersuchten Datensets nachgewiesen werden konnten, ist ein Nachteil der Einteilung in funktionelle Kategorien mit dem hier benutztem Verfahren die hohe Redundanz der Daten. Ein Gen wird in den meisten Fällen nicht nur einer Kategorie zugeordnet, sondern es werden sämtliche in der translatierten Sequenz vorhandene Proteindomänen und ihre möglichen Funktionen berücksichtigt. Dadurch lässt sich auch der große prozentuale Anteil der Kategorie der unklassifizierten Gene erklären.

Zudem werden bei den hier durchgeführten Berechnungen aufgrund des alleinigen Sequenzvergleichs mit dem *Arabidopsis*-Genom Gene, von denen es keine verwandten Sequenzen in *Arabidopsis* gibt automatisch als nicht klassifiziert eingestuft. Dadurch verliert man funktionelle Informationen über *Antirrhinum*-spezifische Gene, oder solche, die nur in mit *Antirrhinum* nah verwandten Arten wie z.B. *Solanum* vorkommen.

Aus diesen Gründen wurden neben den MIPS-Kategorie Analysen für die ESTs der Subgruppen A-D, welche aus den nachfolgenden Expressionsanalysen der WT Petalenentwicklung hervorgingen (siehe Kapitel 3.1.2.2.2 Abb. 3-5 und Kapitel 3.1.2.2.3 Abb. 3-7) noch einmal separat mittels des Programms „BLASTX“ (NCBI) ein Vergleich mit allen bekannten Proteinsequenzen durchgeführt, und so Spezies-unabhängig die Gene mit der jeweils stärksten Sequenzähnlichkeit ermittelt.

3.1.2.2.2 Gene mit erhöhtem Expressionsniveau in Petalen im Vergleich zu Sepalen

In diesem und dem folgenden Kapitel werden die innerhalb der Petalenentwicklung in ihrer Expression aktivierten bzw. reprimierten ESTs (siehe Abb. 3-3) getrennt voneinander betrachtet.

Zunächst erfolgt eine Untersuchung des qualitativen Expressionsmusters der 322 in Petalenstadien aktivierten Gene. Dabei werden die ESTs gemäß der Ähnlichkeit ihres relativen Expressionsverhaltens in Petalen im Vergleich zu der Expression in Sepalen hierarchisch angeordnet. Bei dieser Darstellungsart, welche im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „hierarchisches Cluster“ bezeichnet ist, wird die Expressionsstärke der Kontrollbedingung (hier: Sepalen) eines jeden Gens gleich 1 definiert und die relativen Expressionsstärken der zu untersuchenden Bedingungen gemäß eines Farbcodes dargestellt. Rote Farben deuten auf eine erhöhte Expression (Verhältnis >1.0) hin, grüne Farbtöne auf eine verminderte Expression (Verhältnis zw. 0 und 1.0). Die Intensität des Farbtons korreliert positiv mit dem Expressionsunterschied zur Referenzbedingung.

Alle in dieser Arbeit abgebildeten hierarchischen Cluster wurden unter Benutzung des Programms GENESIS (v 1.2.2) erstellt. Den dafür erforderlichen Berechnungen wurde die Pearson Korrelation als Distanzmatrix zugrunde gelegt (siehe Material & Methoden, Kapitel 2.8.4.3), welche die relative Änderung zweier Datensets stärker bewertet als deren absoluten Differenzen.

Ferner werden in einem Venn-Diagramm die Relationen zwischen den in Petalen signifikant aktivierten ESTs dargestellt, um die Anzahlen zu erfassen, wie viele ESTs in nur einer, mehreren oder allen Konditionen aktiviert werden.

Schließlich werden besonders interessante ko-regulierte Subgruppen von Genen, die aus den genannten Analysen hervorgehen unter funktionellen Aspekten bezüglich ihrer Sequenzähnlichkeiten betrachtet.

Die aus Tabelle 1 (Kapitel 3.1.2.2) ersichtlichen 322 der 537 ESTs, welche in mindestens einem Petalenstadium im Vergleich zu den Sepalen eine signifikant erhöhte Expression zeigen, wurden in Abb. 3-5 in Form eines hierarchischen Clusters dargestellt.

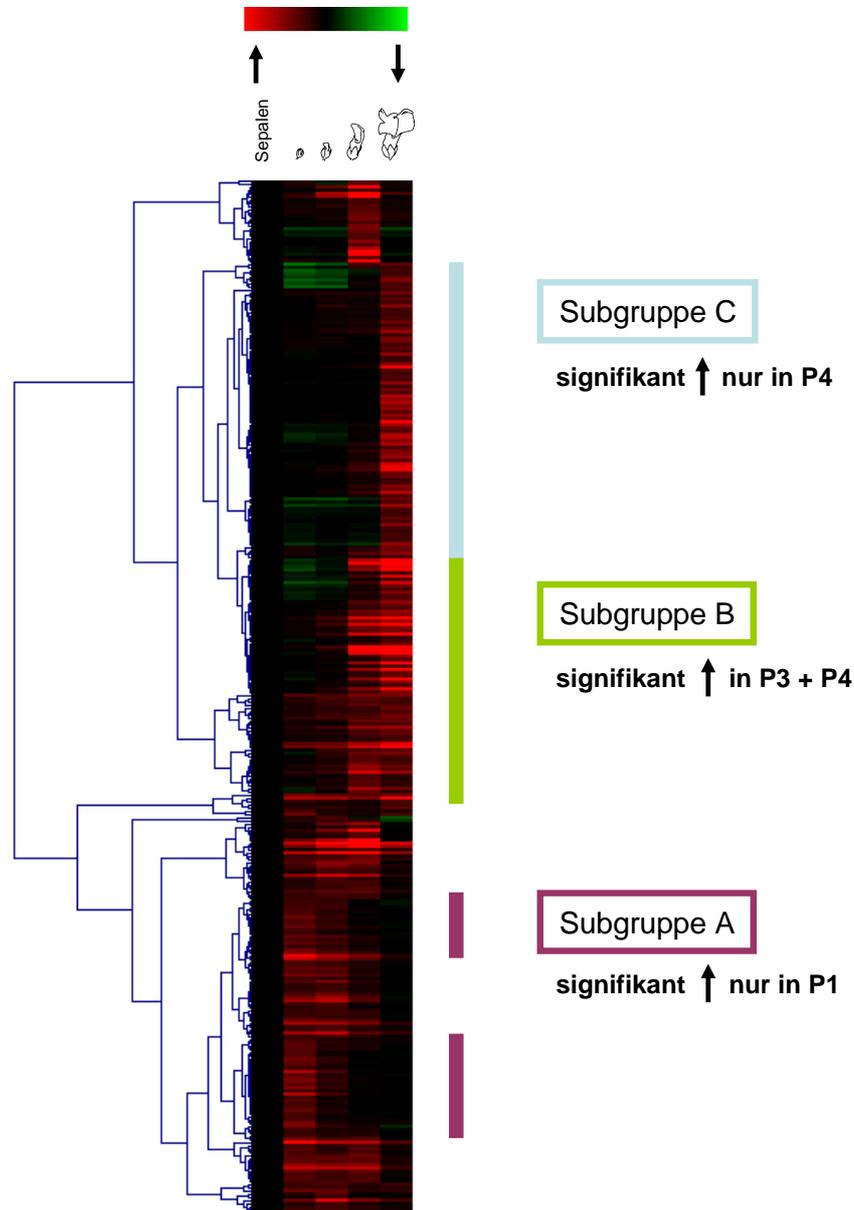


Abb. 3-5 Hierarchisches Cluster der 322 in Petalen signifikant aktivierten ESTs

Die qualitativen Änderungen der Expression sind im Bezug zur Kontrollbedingung für jedes Gen dargestellt wobei die Expressionsstärke in der Kontrollkondition (Sepale) als = 1 definiert wird. Die ESTs sind gemäß der Ähnlichkeit ihres relativen Expressionsprofils angeordnet. Einige interessante Subgruppen koregulierter Gene wurden farblich markiert und das typische Expressionsverhalten schematisch dargestellt.

↑ = Expression in Petalen erhöht; ↓ = Expression in Petalen erniedrigt (im Vergleich zu Sepalen)

Wie aus dieser Abbildung erkennbar ist, bilden die 322 ESTs mit erhöhtem Expressionsniveau in Petalen viele Subgruppen ko-regulierter Gene, deren Expression charakteristisch nur in bestimmten Petalenstadien hochreguliert ist. Drei besonders interessante Gruppen dieser ähnlich regulierten Gene (Subgruppe A-C; siehe Abb. 3-5, Abb. 3-6 und Tabelle 4), gehen auch aus den im Folgenden dargestellten detaillierten Analysen der in Petalen aktivierten ESTs hervor. Sie werden am Ende dieses Abschnitts bezüglich ihrer funktionellen Zuordnung ausführlich betrachtet. Mit diesen Datensätzen (Subgruppe A-C) separat erstellte hierarchische Cluster befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Zur exakteren Untersuchung der sich in Abb. 3-5 andeutenden Gruppen ko-regulierter Gene, wurden die Relationen zwischen den signifikant aktivierten ESTs in den vier Petalenstadien im folgenden Venn-Diagramm (Abb. 3-6) dargestellt. Dabei wurde ermittelt, welche ESTs in welchem Stadium der Petalenentwicklung reguliert werden und ob sie eine signifikante Expressionsänderung in nur einer, zwei, drei oder sogar allen vier Petalenkonditionen zeigen. Die Schnittmengen der vier Kreise geben die Anzahlen derjenigen ESTs an, die redundant in den entsprechenden Datensätzen der Stadien-spezifisch signifikant aktivierten Petalen vorkommen.

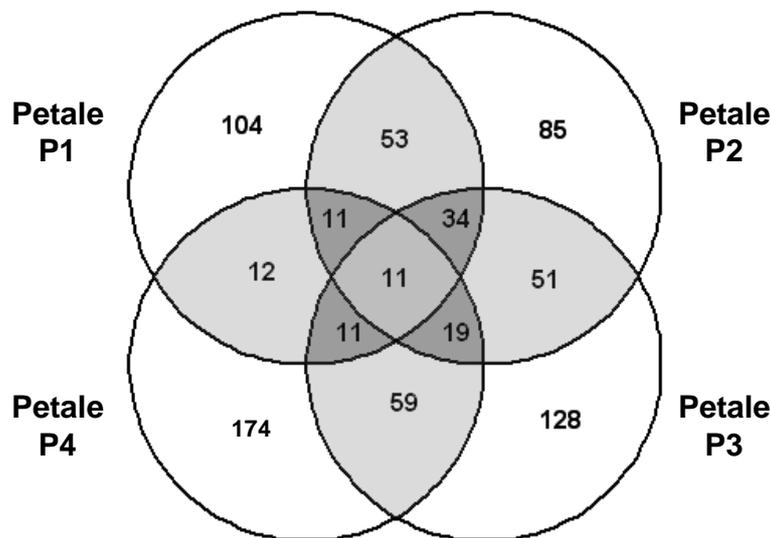


Abb. 3-6 Venn-Diagramm der ESTs deren Expression in WT Petalenstadien im Vergleich zu WT Sepalen erhöht ist.

Angegeben sind jeweils die Gesamtzahlen der Schnittmengen. Z.B. zeigen von den 104 ESTs, deren Expression in Petalen Stadium P1 im Vergleich zu der der Sepalen aktiviert ist, 53 auch in Petalen Stadium P2 und 11 in allen Petalenstadien eine erhöhte Expression.

Aus dem Venn-Diagramm ist ersichtlich, dass nur 11 der 322 ESTs in allen vier Petalenstadien eine signifikant erhöhte Expression gegenüber Sepalen aufweisen. Folglich ist ein Großteil der aktivierten ESTs zweier aufeinander folgenden Petalenentwicklungsstadien nicht redundant.

Die 11 während der gesamten Petalenentwicklung stark aktivierten ESTs sind mit den zugehörigen Makroarray-Daten und BLAST-Homologien in Tabelle 3 dargestellt. In zwei Fällen sind jeweils zwei EST-Sequenzen absolut identisch, so dass nur 9 Gene von diesen ESTs repräsentiert werden. Unter ihnen befindet sich zweimal der Transkriptionsfaktor GLOBOSA, auffallend viele Lipid Transfer Proteine, ein CER1 und ein CER1-ähnliches Protein eine Methionyl-tRNA-Synthetase, ein Calmodulin-ähnliches Protein und ein hypothetisches Protein.

EST-Nummer	Makroarray-Ratios				BLAST-Homologie
	P1	P2	P3	P4	
018_1_01_n17 018_4_11_m24	1.79 1.38	2.26 1.86	3.65 2.50	1.92 1.59	Lipid Transfer Protein
018_2_04_h01	2.15	1.81	1.74	1.32	hypothetisches Protein
018_2_04_h21	1.37	1.97	1.50	1.25	Methionyl-tRNA-Synthetase
018_2_06_h16 018_6_08_n20	1.28 1.41	1.34 1.42	1.60 1.86	1.91 2.26	CER1-ähnliches Protein
018_4_11_h12	1.77	2.17	3.16	1.57	unspezifisches Lipid Transfer Protein
018_5_02_d09	1.39	1.29	1.28	1.39	MADS Box Transkriptionsfaktor GLOBOSA
018_5_02_n08	1.66	1.65	1.45	2.07	CER1 Protein
018_5_03_c12	1.62	1.78	1.32	1.21	Calmodulin-ähnliches Protein
018_6_05_n17	1.32	1.24	1.45	1.46	MADS Box Transkriptionsfaktor GLOBOSA

Tabelle 3 ESTs die in allen vier Petalenstadien signifikant aktiviert sind

Die hier aufgeführten ESTs zeigen in allen untersuchten Petalenbedingungen (P1-P4) im Vergleich zu den Sepalen ein stark erhöhtes Expressionsniveau. Neben den Makroarray-Ratios sind die Ergebnisse der Sequenzvergleiche gegen alle bekannten Proteine angegeben.

Betrachtet man die redundant in zwei aufeinander folgenden Petalenstadien aktivierten ESTs (Abb. 3-6), so zeigt sich, dass von den 104 aktivierten ESTs in Petalen des Stadiums P1 in Stadium P2 die Expression von 51 von ihnen nicht mehr signifikant erhöht ist. Die Anzahl der neuen ESTs, die diesem Kriterium in Stadium P2 genügen, beträgt 32. Besonders hoch ist der Anteil der neu aktivierten ESTs in den adulten Petalenstadien P3 und P4. 77 der 128 in Petalen P3 aktivierten Gene (> 60%) zeigen in dem vorangehenden Entwicklungsstadium noch keine signifikante Expressions-aktivierung. Im Petalenstadium P4 kommen im Vergleich zu Stadium P3 sogar 115 neu aktivierte ESTs dazu, dies entspricht über 66 % des Datensatzes der 174 in reifen Petalen aktivierten ESTs.

Die hohe Expressionsdynamik zwischen den aufeinander folgenden Stadien und die sehr geringen Anzahlen der Schnittmengen von in drei oder vier Stadien signifikant aktivierten ESTs deuten darauf hin, dass es sehr viele Gene gibt, deren Expressionsniveau nur für einen kurzen Zeitraum während der Petalenentwicklung signifikant erhöht ist. Um dies zu überprüfen, wurden diejenigen ESTs ermittelt, die in genau einer spezifischen Entwicklungsstufe der Petalen eine signifikante Expressionserhöhung im Vergleich zu den Sepalen zeigen. Ihre Anzahl und der Anteil am Gesamtset der in diesem Petalenstadium signifikant aktivierten ESTs variiert in den vier untersuchten Petalenstadien (siehe Tabelle 4).

	Ausschlußkriterium 1.2 stadienspez. aktiviert	Anteil am Gesamtset der aktivierten ESTs des jeweiligen Stadiums
Petalen Stadium P1	47	45 %
Petalen Stadium P2	14	16 %
Petalen Stadium P3	33	26 %
Petalen Stadium P4	114	66 %

Tabelle 4 Ausschließlich in einem spezifischen Petalenstadium signifikant aktivierte ESTs

Die hier berücksichtigten ESTs zeigen nur in dem angegebenen Petalenstadium ein mindestens 1.2 fach erhöhtes Expressionsniveau zu dem der Sepalen. Sie stellen eine Teilmenge der in den einzelnen Petalenstadien aktivierten ESTs im Vergleich der vier WT Petalenstadien zu WT Sepalen dar (siehe Abb. 3-3 bzw. Abb. 3-6). Der prozentuale Anteil der spezifisch in einem Stadium aktivierten ESTs an der Anzahl der generell in diesem Stadium aktivierten ESTs ist in der rechten Spalte angegeben.

Spezifisch in einer kurzen Entwicklungsphase regulierte Gene repräsentieren oft regulative Faktoren, Gene die an Umstrukturierungsmaßnahmen des Zellmetabolismus beteiligt

sind oder gehören zu Stoffwechselwegen, die für dieses Stadium charakteristisch sind. Besonders bemerkenswert ist die hohe Anzahl an Genen, die spezifisch in Petalen (P4) aktiviert ist. Diese 114 ESTs, welche 2/3 der generell in Stadium P4 signifikant aktivierten ESTs darstellen, bilden die Subgruppe C (siehe Abb. 3-5). Ebenfalls interessant sind die spezifisch in den Petalen des Stadiums P1 aktivierten Gene, sie werden als Subgruppe A in diesem Kapitel näher betrachtet. Die dritte Subgruppe (SubgruppeB) beinhaltet alle ESTs, die signifikant in den Stadien P3 und P4 aktiviert werden (siehe Abb. 3-6). Für diese drei Datensätze wurde mit Hilfe der MIPS-Kategorien (siehe Kapitel 3.1.2.2.1) untersucht, welche funktionellen Gruppen von Genen transkriptionell reguliert werden. Zudem wurden mit Hilfe des Genagents (siehe M & M, Kapitel 2.8.1) die Informationen der einzelnen Sequenzvergleiche gegen bekannte Proteine aus allen Spezies überprüft und aktualisiert. Gerade bei den spezifisch nur in einem Stadium aktivierten Genen stellt sich die Frage, ob nachweisbare Veränderungen in der Genexpression mit den zu beobachtenden morphologischen Auffälligkeiten dieses Blütenblattstadiums korrelieren.

Die **Subgruppe A** umfasst 47 ESTs, welche im Vergleich mit den Sepalen spezifisch in Petalen des Stadiums 1 aktiviert sind. Hierunter befinden sich allein 14 Histone und 7 ESTs deren Proteinsequenzen Homologien zu ribosomalen Proteinen aufweisen. Des Weiteren enthält dieser Datensatz Gene, deren zugehörige Proteine an der Prozessierung von mRNAs beteiligt sind.

Diese Klassen von Proteinen lassen sich funktionell den Bereichen Zell-Zyklus, DNA-Prozessierung und Proteinsynthese zuordnen. Eine MIPS-Kategorie Analyse der 57 ausschließlich in Petalen P1 regulierten ESTs (spezifisch in diesem Stadium aktiviert und reprimierte ESTs) ergab, dass im Vergleich zum Gesamtset der 537 regulierten ESTs in WT-Petalen die Kategorien Zell-Zyklus (23 % statt 8%), Proteinsynthese (18% statt 8%) und Proteinverarbeitung (25 % statt 14%) stark überrepräsentiert waren.

Im gesamten weisen diese Daten auf eine hohe Zellteilungsaktivität in Petalen des Stadiums P1 hin.

Die **Subgruppe B** beinhaltet 59 ESTs, deren Expression sowohl in Petalen P3 als auch in P4 signifikant gegenüber der in Sepalen aktiviert ist. Die BLAST-Homologien von 13 von ihnen sind mit dem Zellwandmetabolismus assoziiert. Unter ihnen befinden sich Zellwandbestandteile (z.B. putatives Zellwandprotein), Membranproteine (z.B. Wasserkanal-

protein, integrierte Plasmamembranproteine) und Proteine die an der Regulation der Zellwandsynthese beteiligt sind (Chitinase, Pektinacetylerase).

Außerdem enthält diese Subgruppe 2 Gene aus dem Anthocyanstoffwechselweg, und 7 Lipid Transfer Proteine. Die Ergebnisse der MIPS-Kategorie Analysen mit diesen Datenset zeigen, dass die Kategorien zellulärer Transport (15% statt 7%), Interaktion mit der Zellumgebung (19% statt 11%) und Differenzierung des Zelltyps und des Gewebes (je 7% statt 4%) im Vergleich zu denen des Gesamtsets der 537 regulierten ESTs stärker repräsentiert waren.

Bringt man diese Beobachtungen in den Kontext mit morphologischen Differenzierungsprozessen, so lässt sich das funktionelle Spektrum an regulierten Genen in dieser Subgruppe mit dem in späten Phasen der Petalenentwicklung vorherrschenden Zellstreckungswachstum und diversen Differenzierungsprozessen korrelieren.

Die 114 spezifisch in Petalen P4 aktivierten ESTs der **Subgruppe C** repräsentieren zu einem sehr großen Teil Enzyme des pflanzlichen Sekundärmetabolismus, darunter Enzyme der Methylbenzoat-Biosynthese und des Anthocyanstoffwechsels. Des Weiteren enthält dieser Datensatz, ähnlich wie Subgruppe B viele Gene, die mit dem Zellwandmetabolismus verknüpft sind. Die Ergebnisse der mit diesem Datensatz durchgeführten MIPS-Kategorie-Analysen weisen eine Steigerung des prozentualen Anteils in der Kategorie Metabolismus (44% statt 34%) im Vergleich zu dem prozentualen Anteil der 537 gesamt regulierten Gene auf (Daten nicht aufgeführt). Auch hier zeigt sich eine starke Korrelation des funktionell untersuchten Datensatzes an regulierten Genen mit den bekannten morphologischen Differenzierungsprozessen in diesem Petalenstadium. Methylbenzoat ist der Hauptbestandteil des von *Antirrhinum*-Blüten emittierten Dufts (Dudareva *et al.*, 2000) und Anthocyane sind maßgeblich an der Färbung der Petalen beteiligt. Die große Anzahl an Genen deren Proteine Funktionen im Zellwandmetabolismus haben, spiegelt die anhaltenden Zellstreckungs- und Faltungsprozesse des ältesten Petalenstadiums wider, in dem sich die Blütenlänge noch einmal verdoppelt (siehe 3.1.2.2, Abb. 3-3).

Zusammenfassend kann über die Analyse der in Petalen P1-P4 im Vergleich zu den Sepalen aktivierten Gene gesagt werden, dass die sich bereits am Anfang dieses Kapitels andeutende starke Expressionsdynamik bzw. Regulationsaktivität zwischen den einzelnen Petalenstadien im Verlauf von detaillierteren Analysen bestätigt hat. Besonders die bei-

den ältesten hier untersuchten Petalenstadien (P3 und P4) zeigen mit jeweils über 60 Prozent an neu aktivierten ESTs in den jeweiligen Datensätzen eine sehr hohe Regulationsaktivität. Dieser Aspekt zusammen mit der hohen Anzahl an ESTs, deren Expressionsniveau in diesen beiden Stadien gegenüber dem der Sepalen signifikant erhöht ist, prädestiniert die späten Petalenstadien als geeignete Entwicklungsphasen zur Isolierung von DEF-Zielgenen.

3.1.2.2.3 Gene mit erniedrigtem Expressionsniveau in Petalen im Vergleich zu Sepalen

In diesem Kapitel wird analog zum vorherigen Kapitel zuerst eine Untersuchung der qualitativen Expressionsmuster der ESTs mit erniedrigtem Expressionsniveau in Petalen durchgeführt und danach die genauen Relationen der in einer oder mehreren Bedingungen signifikant reprimierten Gene ermittelt. Eine besonders interessante Subgruppe ko-regulierter ESTs wurde ermittelt und mittels Sequenzvergleichen unter funktionellen Aspekten betrachtet.

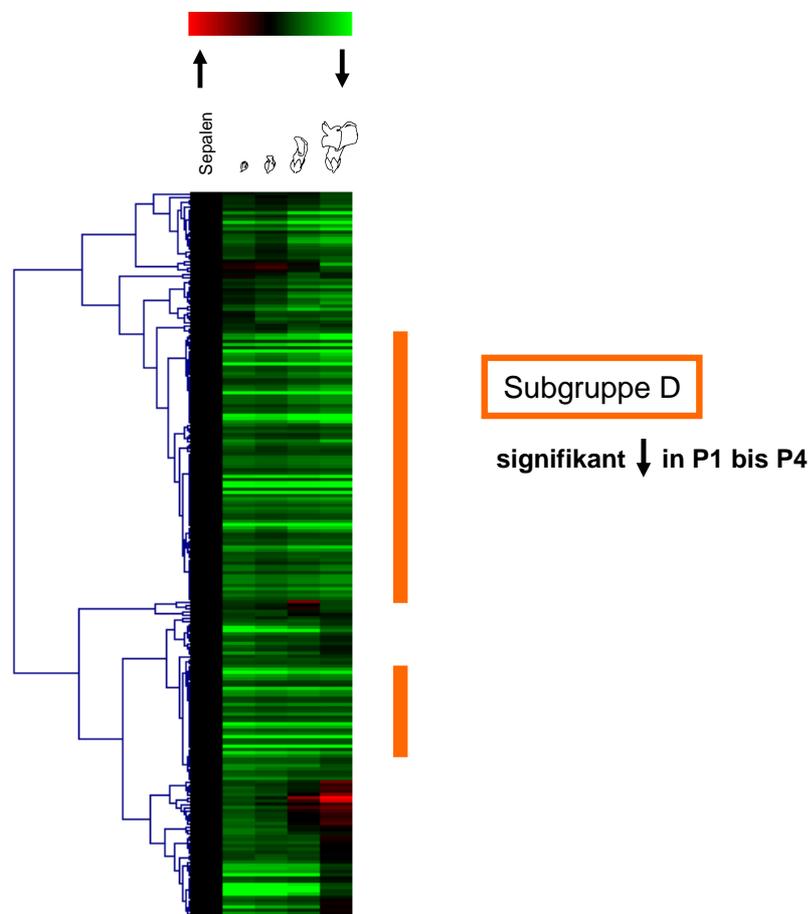


Abb. 3-7 Hierarchisches Cluster der 226 in Petalen signifikant reprimierten ESTs

Die qualitativen Änderungen der Expression sind im Bezug zur Kontrolle für jedes Gen dargestellt und die Expressionsstärke in der Kontrollkondition (Sepale) als = 1 definiert. Die ESTs sind gemäß der Ähnlichkeit ihres relativen Expressionsprofils geordnet. Eine interessante Subgruppe ko-regulierter Gene wurde farblich markiert und das typische Expressionsverhalten schematisch dargestellt.

↑ = Expression in Petalen erhöht; ↓ = Expression in Petalen erniedrigt (im Vergleich zu Sepalen)

Die 226 ESTs, deren Expression in der Petalenentwicklung (P1-P4) im Vergleich zur Expression in Sepalen signifikant vermindert ist, sind in Form eines hierarchischen Clusters in Abbildung 3-7 dargestellt. Anders als bei den in den Petalen aktivierten Genen, wo klare Subgruppen stadienspezifisch regulierter ESTs und allgemein eine große Expressionsdynamik innerhalb der Petalenentwicklung erkennbar waren, zeigt sich hier, dass die meisten ESTs dieses Datensatzes in mehreren Petalenstadien reprimiert sind.

Das Venn-Diagramm (Abb. 3-8) zeigt detailliert die Anzahlen derjenigen ESTs, welches redundant in mehreren Petalenstadien im Vergleich zu den Sepalen reprimiert sind. Auffällig ist hier der hohe Anteil an Genen, die sich in den Schnittmengen mehrerer Petalenstadien befinden. Entsprechend niedrig sind die Anzahlen der in aufeinander folgenden Stadien neu hinzukommenden reprimierten ESTs (12 in P2, 31 in P3, 28 in P4). 46 % des Gesamtsets (104 ESTs) der in Petalen reprimierten ESTs zeigen sogar in allen 4 Petalenstadien ein signifikant erniedrigtes Expressionsniveau gegenüber dem in Sepalen. Diese ESTs bilden die Subgruppe D, deren Homologien im Folgenden unter funktionellen Gesichtspunkten betrachtet werden. Ein hierarchisches Cluster dieser Subgruppe ist im Anhang aufgeführt.

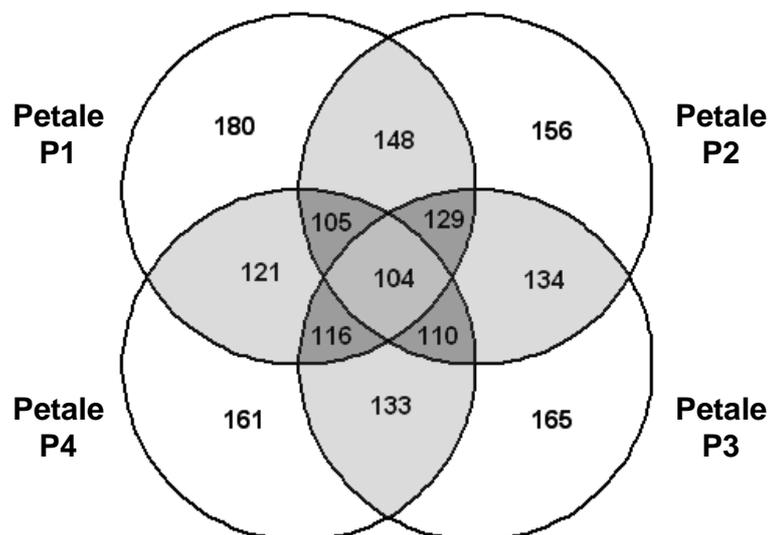


Abb. 3-8 ESTs deren Expression in WT Petalenstadien im Vergleich zu WT Sepalen erniedrigt ist Angegeben sind jeweils die Gesamtzahlen der Schnittmengen. Z.B. zeigen von den 180 ESTs, deren Expression in Petalen Stadium P1 im Vergleich zu der der Sepalen reprimiert ist, 148 auch in Petalen Stadium P2 und 104 in allen Petalenstadien eine verminderte Expression.

Die **Subgruppe D** beinhaltet 104 ESTs, deren Expression signifikant in allen 4 Petalenstadien im Vergleich zu den Sepalen reprimiert ist, also die „Sepalen-spezifischen“ Gene. Der größte Teil der Proteinsequenzen dieser Gene besitzt Homologien zu Proteinen des Photosynthesestoffwechsels und den ihm assoziierten Biosynthesewegen wie z.B. der Kohlenhydrat- oder Fettsäurestoffwechsel. Die entsprechende MIPS-Kategorie-Analyse zeigt einen zweifach erhöhten Anteil der Kategorie Energie. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Erwartungen, da ein offensichtlicher Unterschied zwischen Sepalen und Petalen in deren unterschiedlich ausgeprägten Photosyntheseaktivität liegt.

Dieses Ergebnis rundet die funktionellen Betrachtungen spezifischer Datensätze mit zwei unterschiedlichen Methoden mit einer weiteren eindeutigen Korrelation von Veränderungen in der Genexpression mit morphologisch sichtbaren Differenzierungsprozessen ab.

Die generelle funktionelle Analyse des Gesamt-Datensatzes der in WT-Petalen regulierten ESTs mit Hilfe der MIPS-Kategorien liefert Hinweise, welche funktionellen Gruppen von Genen hauptsächlich reguliert werden. Je spezifischer die untersuchten Datensätze waren, desto eindeutiger wurden auch die Ergebnisse der MIPS-Kategorie-Analysen. Besonders bei den Betrachtungen der Subgruppen B-D stimmten die Aussagen der bioinformatischen Untersuchungen gut mit den manuell nachgeprüften funktionellen Betrachtungen überein (Subgruppe A-C siehe Kapitel 3.1.2.2.2). Jedoch sind komplexe Prozesse (z.B. Zellstreckung), deren markante Gene sich in mehreren großen Kategorien wieder finden, mittels der MIPS-Analyse nicht greifbar, da deren Kategorien zu allgemein definiert sind. In diesen Fällen und wenn Spezies- oder Familien-spezifische Charakteristika eine Rolle spielen könnten (z.B. Anthocyan synthese) ist ein zusätzlicher Sequenzvergleich mit allen bekannten Proteinen und eine separate Nachprüfung der Sequenzähnlichkeiten sinnvoll.

3.1.3 Expressionsanalysen ausgewählter Gene mittels semiquantitativer RT-PCR

Aus den Untersuchungen der vorhergehenden Kapitel geht hervor, dass die Regulationsaktivität in späten Petalen P3 und P4 besonders hoch ist und sie deshalb interessante Stadien für die geplante Isolation von DEF-Zielgenen repräsentieren. Mit *DEFICIENS* und *GLOBOSA* wurden bisher bereits viele mRNA- und Protein-Expressionsstudien durchgeführt, jedoch gibt es keine detaillierte Studie über die Expression dieser Gene in späten Petalenstadien. Die Frage war nun, ob *DEFICIENS* selbst in den entsprechenden Stadien ausreichend hoch exprimiert ist, um durch einen Funktionsverlust in einem späten Stadium der *def-101* Mutante möglichst viele regulierte Zielgene zu erfassen. Die Makroarray-Daten von *DEFICIENS* zeigen eine sehr deutliche und auch von den absoluten Intensitäten her hohe Expressionsaktivierung in Petalen P1 bis P3 im Vergleich zu den Sepalen. Im Stadium P4 sinkt das Expressionsniveau jedoch wieder deutlich ab und genügt mit einem Verhältnis von 1.19 sogar nicht mehr dem Ausschlußkriterium von 1.2 fach. Die Expression von *GLOBOSA* dagegen ist durchweg in Petalen P1 bis P4 im Vergleich zu der Expression in Sepalen aktiviert.

Um diese Expressionsdaten mit Hilfe einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden in diesem Kapitel RT-PCR-Analysen dieser beiden Gene in den gleichen Sepalen- und Petalenstadien durchgeführt, wie sie für die Makroarray-Experimente verwendet wurden.

Neben *DEFICIENS* und *GLOBOSA*, die hauptsächlich in Blütenorganen des zweiten und dritten Wirtels exprimiert werden, gibt es noch einige andere Blüten-spezifische Gene, deren Expression in Petalen verschiedener Altersstufen in der Literatur beschrieben wird (siehe Einleitung; Kapitel 1.1). Ein Vergleich ihrer DNA-Sequenzen mit den in der EST-DB verfügbaren cDNA-Sequenzen ergab, dass homologe EST-Klone der Gene *PALLIDA*, *DELILA* und *BAMT* auf den EST-Filtern vorhanden waren. Diese putativen DEF-Zielgene wurden in die semiquantitativen RT-PCR-Analysen miteinbezogen, um vergleichende Aussagen über die Expressionsintensitäten der in Petalen exprimierten Gene treffen zu können.

Unter Benutzung der cDNA-Sequenzen von *DEFICIENS*, *GLOBOSA*, *PALLIDA*, *DELILA* und *BAMT* wurden Gen-spezifische Primer generiert und semiquantitative RT-PCR-Analysen in Sepalen und den Petalenstadien P1-P4 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser

unabhängigen Expressionsstudie wurden einerseits mit den Makroarray-Daten der korrespondierenden ESTs und andererseits mit den bereits aus der Literatur bekannten Expressionsdaten verglichen. Abbildung 3-9 zeigt eine Zusammenstellung der Expressionsdaten dieser fünf Gene. Als Vergleichsstandard der RT-PCR wurde ein Fragment der ubiquitär exprimierten *Ubiquitin-Protein-Ligase 2* verwendet. Auch die Makroarray-Daten des zu diesem Gen korrespondierenden ESTs sind in der Abbildung aufgeführt.

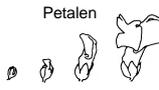
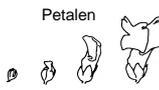
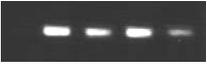
Gen	Expression in Petalen (Literatur)	RT-PCR	🔍	EST-Nummer	Makroarray-Ratios
		Sepalen  Petalen 			Sepalen  Petalen 
DEFICIENS	in allen Stadien der Petalenentwicklung		25	018_5_01_o10	1.0 1.79 1.72 1.74 1.19
GLOBOSA	in allen Stadien der Petalenentwicklung		25	018_5_02_d09	1.0 1.39 1.29 1.28 1.39
PALLIDA	in adulten und reifen Stadien		25	018_3_08_i15	1.0 1.00 1.03 1.06 1.14
DELILA	in adulten und reifen Stadien Maximum in Stadium 3		25	018_4_06_k20	1.0 0.98 1.00 0.95 0.95
BAMT	nur in den Lappen von reifen Petalen (P4) nach der Anthese		25	018_1_09_b17	1.0 0.96 0.98 0.95 1.22
UPL2 (PCR-Standard)	ubiquitär exprimiert		30	018_1_12_o09	1.0 1.00 1.00 1.01 1.01

Abb. 3-9 Vergleichende Expressionsanalysen ausgewählter Blüten-spezifischer Gene

Die Expressionsdaten Blüten-spezifischer Gene und ihrer korrespondierender EST-Klone aus der Literatur, den RT-PCR-Analysen und der Makroarray-Daten (aus Kapitel 3.1.2) wurden tabellarisch zusammengestellt. Die RT-PCR-Reaktionen wurden mit einer Primer-Anlagerungstemperatur von 56°C und einer Synthesezeit von 1 min durchgeführt. Die Anzahl der jeweilig durchgeführten Zyklen ist neben der UV-Licht-Fotografie vermerkt. Die Amplifikatlänge beträgt jeweils ca. 500 bp.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs bestätigen tendenziell die Makroarray-Expressionsdaten von *DEF* und *GLO*. Die in Petalen P1 bis P3 ansonsten sehr starke Expression von *DEFICIENS* sinkt im Stadium P4 deutlich ab. Ein anderes Bild ergibt sich bei Betrachtung der *GLOBOSA* Expression, in Sepalen kaum nachweisbar zeigt sie während der gesamten Petalenentwicklung bis hinein in die Endphase (P4) ein hohes Expressionsniveau.

Auch bei den Genen *PALLIDA* und *BAMT* lässt sich eine Übereinstimmung zwischen den Expressionsdaten aus der Literatur, der RT-PCR-Analysen und der Makroarray-Studien feststellen. Im Falle von *DELILA* sieht man eine Übereinstimmung zwischen den Daten

der RT-PCR-Analysen und denen aus der Literatur, die Makroarray-Daten können die differentiellen Expressionsniveaus dieses Gens in unterschiedlichen Petalenstadien tendenziell nicht bestätigen.

Zusammenfassend konnten die aus der Literatur bekannten Expressionsdaten der fünf Blüten-spezifischen Gene in WT-Petalen von *A. majus* mittels semiquantitativer RT-PCRs klar bestätigt werden. Zudem korrelierten die Makroarray-Daten von vier der fünf korrespondierenden ESTs mit der Expressionsdynamik der RT-PCRs.

Im Hinblick auf die Isolierung von DEF-Zielgenen aus Petalen erweist sich, unter Einbeziehung der bestätigten Expressionsdaten von *DEFICIENS* in späten Petalenstadien das Stadium P3 als am besten geeignet. In dieser Phase der Petalenentwicklung wurde sowohl eine beachtliche Regulationsaktivität Petalen-spezifischer Gene, als auch eine ausreichend hohe Expression von *DEFICIENS* selbst nachgewiesen.

3.2 Isolierung von DEF-Zielgenen aus späten Petalenstadien

Während der Petalen- und Staminaentwicklung ist für eine vollständige und korrekte Entwicklung dieser Blütenorgane das kontinuierliche Vorhandensein des DEF Proteins notwendig (siehe Einleitung). Die Zielgene, welche das regulatorische Potential dieses Transkriptionsfaktors in *Antirrhinum majus* realisieren, sind jedoch noch weitgehend unbekannt (Bey *et al.*, 2002). In dieser Arbeit sollten durch eine Kombination der Makroarray Technik und einem *in vivo* induzierbaren System, der *def-101* Mutante, DEF-Zielgene isoliert und charakterisiert werden.

Mittels Temperaturverschiebungs-Experimenten mit der *def-101* Mutante wurde gezeigt, dass Petalen und Stamina verschiedener Entwicklungsstadien unterschiedliche Sensitivitäten und Restaurationspotentiale nach Störungen der DEF-Funktion aufweisen (Zachgo *et al.*, 1995). In diesem Kapitel werden die EST-Filter verwendet, um die Änderung der Genexpression nach einer induzierten Reduktion der DEF-Funktion in *def-101* Pflanzen zu untersuchen. Als DEF-Zielgene werden diejenigen Gene definiert, deren Expressionsniveau sich signifikant in Folge der reduzierten DEF-Funktion ändert.

Aus Kapitel 3.1.2 geht hervor, dass viele Gene die in der Petalenentwicklung involviert sind eine charakteristische Expressionsdynamik aufweisen. Um zu vermeiden, dass signifikante Expressionsunterschiede innerhalb definierter Stadien aufgrund der Durchmischung mehrerer Entwicklungsstufen nicht mehr detektierbar sind, wurde für diese Makroarray-Analysen ein definiertes Petalenstadium ausgewählt. Aus den Transkriptomanalysen der Wildtyp-Petalen ist ersichtlich, dass die späte Petalenentwicklung bei *Antirrhinum majus* ein komplexer und dynamischer Prozess ist. In Kapitel 3.1.2.2 wurde gezeigt, dass die Regulationsaktivität innerhalb der Petalenentwicklung besonders hoch in den Stadien P3 und P4 ist (siehe Abb. 3-3 und Abb. 3-6). Aus den RT-PCR-Analysen (Kapitel 3.1.3 Abb. 3-9) ging hervor, dass das Expressionsniveau von *DEFICIENS* sehr stark in den Petalenstadien P1 bis P3 ist, in P4 allerdings beträchtlich sinkt. Aufgrund dieser Daten und unter der Annahme, dass *DEF* maßgeblich an der Genregulation in späten Petalenstadien beteiligt ist, wurde das Petalenstadium P3 für die Expressionsprofil-Experimente zur Isolierung von DEF-Zielgenen ausgewählt.

3.2.1 Morphologische Auswirkungen von Temperaturverschiebungs-Experimenten während der Petalenentwicklung bei *def-101* Mutanten

Zunächst wurde untersucht, inwieweit eine zeitlich begrenzte Reduktion der DEF-Funktion der Petalenentwicklung makroskopisch sichtbare Veränderungen der Petalenmorphologie verursacht.

In Temperaturverschiebungs-Experimenten mit der *def-101* Mutante konnte gezeigt werden, dass ein DEF-Impuls von nur 24h in sehr jungen Blütenstadien vor dem Erscheinen der Sepalenprimordien hinreichend ist für eine Initiierung der Karpelle im vierten Wirtel (Dr. S. Zachgo, persönliche Mitteilung). In einem anderen Experiment bewirkte die Reduktion der DEF-Funktion für 72h, dass an der Basis der Filamente der Stamina des Stadiums 3 karpelloide Strukturen ausgebildet wurden (Dr. S. Zachgo, persönliche Mitteilung).

Diese Versuche zeigen, dass erstens morphologische Auswirkungen nach Veränderungen der DEF-Funktion für nur 24h nachgewiesen werden können, und zweitens dass eine modifizierte DEF-Funktion auch in späten Blütenstadien noch sichtbare morphologische Veränderungen zur Folge hat.

Zur Untersuchung welche morphologisch sichtbaren Auswirkungen auf Petalen eine unterschiedlich lange reversible Reduktion der DEF-Funktion der *def-101* Blüten hat, wurden Temperaturverschiebungs-Experimente mit jungen *def-101* Infloreszenzen durchgeführt. Die *def-101* Pflanzen wurden in der permissiven Temperatur (15°C) angezogen bis ihre Infloreszenzen ca. 1 cm groß waren. Dann wurden jeweils 15 von ihnen für drei, sechs oder 10 Tage in der nicht-permissiven Temperatur (26°C) kultiviert, bevor die Infloreszenzen wieder bei 15°C auswuchsen.

Die Wildtyp-ähnlichen Blüten von *def-101* Pflanzen, die unter permissiven Bedingungen (15°C) kultiviert wurden zeigten allgemein ein kompakteres Wachstum und deren Petalen eine intensivere Färbung und deutlichere Furchung der Korolla im Vergleich zu WT165E Blüten (siehe Abb. 3-11 und Einleitung).

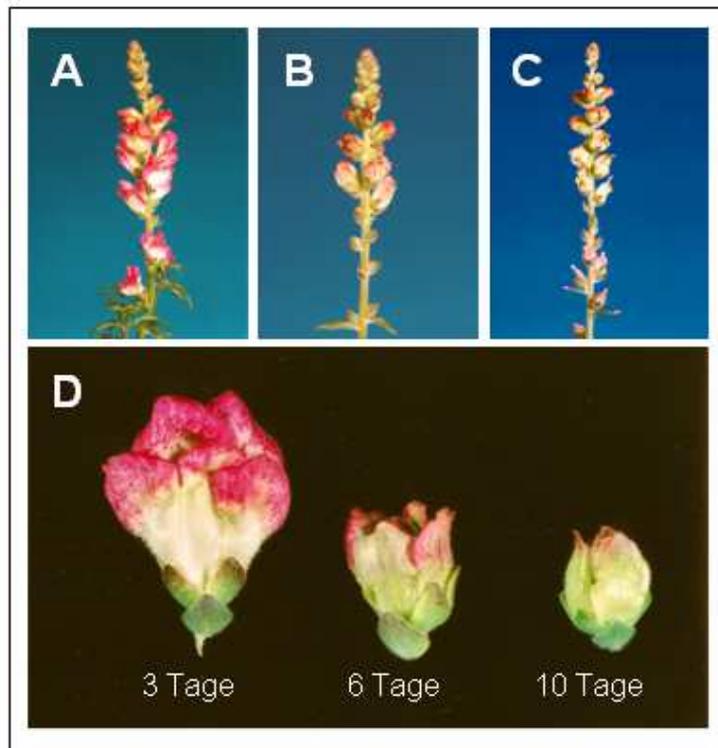


Abb. 3-10 Infloreszenzen und Einzelblüten von *def-101* Pflanzen nach unterschiedlichen Temperaturverschiebungs-Experimenten in jungen Entwicklungsstadien

Die *def-101* Pflanzen wurden unter permissiven Bedingungen (15°C) kultiviert und zu einem Zeitpunkt, als die Infloreszenzen ca. 1 cm groß waren für 3 (A), 6 (B) oder 10 Tage (C) in nicht-permissive Bedingungen (26°C) geshiftet. Die anschließende Kultivierung erfolgte wieder unter den Anfangsbedingungen. Die Einzelblüten (D) stammen aus vergleichbaren Entwicklungsstadien der unterschiedlich lang behandelten Pflanzen.

In Abbildung 3-10 werden ausgewachsene Infloreszenzen gezeigt, deren Petalen von der temporär verminderten DEF-Funktion beeinflusst wurden. Je länger die Pflanze unter nicht-permissiven Bedingungen kultiviert wurde, desto deutlicher zeigen deren Petalen sepaloide Charakteristika wie verkürztes Wachstum und grüne Sektoren. Dies zeigt, dass nach einem 72 stündigen Ausfall der DEF-Funktion die Petalenmorphogenese irreversibel gestört ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass auf transkriptioneller Ebene Veränderungen der DEF-Zielgene als Reaktion auf eine reduzierte DEF-Funktion für 72h ebenfalls nachweisbar sind. Um außerdem Zielgene zu isolieren, die sehr schnell auf eine Modifikation der DEF-Proteinkonzentration reagieren, wurden bei den folgenden Expressionsstudien auch die Transkriptomveränderungen nach einer 24 stündigen Reduktion der DEF-Funktion untersucht.

3.2.2 Expressionsprofil-Experiment mit einem späten Petalenstadium der *def-101* Mutante

Blühende Infloreszenzen der *def-101* Mutante, welche unter permissiven (15°C) Bedingungen heranwuchsen, wurden für null, 24 oder 72 Stunden in eine Klimakammer mit nicht-permissiven Temperaturbedingungen (26°C) transferiert und danach Petalen des Stadiums P3 (siehe Abb. 3-11) geerntet. Die Gesamt-RNA dieser drei Blütenblattproben diente als Vorlage zur Herstellung der Sonden, mit denen die EST-Filter jeweils dreimal hybridisiert wurden. Auch hier wurde für jede Kondition Gesamt-RNA aus mindestens zwei unterschiedlichen Isolationen zur Erzeugung der radioaktiv markierten Sonden benutzt.

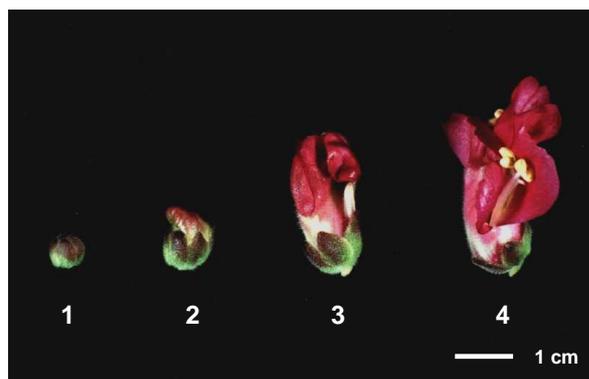


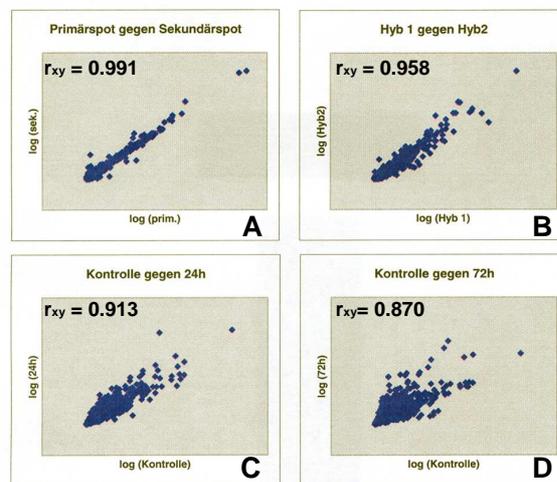
Abb. 3-11 Blütenstadien der *def-101* Mutante in Analogie zur Einteilung der Petalenstadien des Wildtyps 165E

Die Blüten der *def-101* Mutante sind im allgemeinen etwas kleiner und kompakter als die des Wildtyps 165E. Die Stadien wurden unter Berücksichtigung der morphologischen Charakteristika in Anlehnung an die Stadieneinteilung des Wildtyps definiert (siehe Kapitel 3.1.1).

Ziel war die Identifizierung aller ESTs, deren Expression sich aufgrund der abnehmenden DEF-Funktion signifikant ändert. Um Falschpositive ausschließen zu können, die nur aufgrund der Temperaturdifferenz, nicht aber wegen der verminderten DEF-Funktion reguliert werden, wurde das gleiche Expressionsprofil-Experiment parallel mit Proben von WT165E Petalen, die unter den gleichen Bedingungen aufwuchsen und geerntet wurden, durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.2).

3.2.2.1 Prozessierung und qualitative Prüfung der Makroarray-Daten

Die Prozessierung und Auswertung der Makroarray-Daten dieses Expressionsprofil-Experiments („*def-101 P3*“) erfolgte analog zu der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Makroarray-Analyse der Petalenenwicklung („WT Stadien“). Signifikant regulierte Gene wurden unter Benutzung des M-CHIPS-Analyseverfahrens ermittelt und mussten den gleichen Qualitätskriterien genügen, wie sie unter Kapitel 3.1.2.2 aufgeführt sind. Die in diesem Experiment ermittelten *Pearson* Korrelationskoeffizienten sind in Abb. 3-12 dargestellt.



Korrelationskoeffizienten des Expressionsprofil-Experiments „*def-101 P3*“

	<u>Filterqualität</u>	<u>Reproduzierbarkeit</u>	<u>Kondition / Kontrolle</u>
K→W 24h	Hyb1 prim/sek 0.992	Hyb1/Hyb2 0.958	24h / Kontrolle 0.913
	Hyb2 prim/sek 0.990	Hyb1/Hyb3 0.949	
	Hyb3 prim/sek 0.984	Hyb2/Hyb3 0.954	
K→W 72h	Hyb1 prim/sek 0.988	Hyb1/Hyb2 0.904	72h / Kontrolle 0.807
	Hyb2 prim/sek 0.985	Hyb1/Hyb3 0.922	
	Hyb3 prim/sek 0.991	Hyb2/Hyb3 0.929	
Kontrolle (K→W 0h)	Hyb1 prim/sek 0.982	Hyb1/Hyb2 0.926	
	Hyb2 prim/sek 0.968	Hyb1/Hyb3 0.892	
	Hyb3 prim/sek 0.993	Hyb2/Hyb3 0.869	

Abb. 3-12 Korrelationskoeffizienten des Expressionsprofil-Experiments „*def-101 P3*“

Die *Pearson* Korrelationskoeffizienten wurden für die jeweils drei Hybridisierungen der drei Konditionen (K→W 0h, 24h, 72h) berechnet (siehe Material & Methoden). prim = Primärspot; sek = Sekundärspot; Hyb = Hybridisierung; K = Kälte (15°C); W = Wärme (26°C)

Die hohen Werte der Korrelationskoeffizienten aus den Berechnungen bei denen die Intensitäten der Primärspots mit denen der Sekundärspots verglichen wurden oder der vergleichenden Analysen zweier Hybridisierungen innerhalb einer Kondition spiegeln eine hohe Filterqualität und zudem eine gute Reproduzierbarkeit wider (exemplarische *scatterplots* A und B, Abb. 3-12). Bei den Vergleichen der einzelnen Konditionen (K→W 24h, bzw. 72h) zur Kontrolle sieht man, dass hier die Streuung der Datenpunkte in den *scatterplots* (C und D, Abb. 3-12) bei weitem nicht so ausgeprägt ist wie die Distribution der Datenpunkte in den organübergreifenden *scatterplots* (C-F, Abb. 3-2, Kapitel 3.1.2.1) der „WT Stadien“ Analysen. Des Weiteren weisen die Korrelationskoeffizienten von $r_{xy} = 0.913$ (24h) und $r_{xy} = 0.870$ (72h) darauf hin, dass sich das Expressionsniveau der meisten untersuchten Gene kaum oder gar nicht geändert hat. Dies entspricht den Erwartungen, da hier zum einen nur Material eines Organs von einem definierten Stadium (P3) benutzt wurde. Dennoch ist hier anhand der *scatterplots* schon erkennbar, dass die Anzahl der regulierten Gene, welche potentielle DEF-Zielgene darstellen nach 72h Behandlung im Vergleich zu der 24 stündigen Behandlung ansteigt.

3.2.2.2 Regulierte ESTs nach Reduktion der DEF-Funktion in Petalen P3 der *def-101* Mutante

Insgesamt zeigen 125 ESTs in *def-101* Petalen P3 eine signifikante Expressionsveränderung innerhalb der ersten drei Tage nach Behandlung. Davon reagieren 39 ESTs auch in WT Petalen des Stadiums P3 signifikant auf eine Temperaturerhöhung für 24h oder 72h (siehe Kapitel 3.6.2). Bei genauerer Betrachtung konnte jedoch festgestellt werden, dass nur 17 dieser ESTs wirkliche Falschpositive, d.h. nur aufgrund des Temperaturunterschieds und nicht wegen der reduzierten DEF-Funktion regulierte Gene sind. Die verbleibenden 22 ESTs sind in der *def-101* Mutante im Vergleich zum WT entweder stärker reguliert (18 ESTs) oder zeigen einen konträren Regulationstrend (4 ESTs).

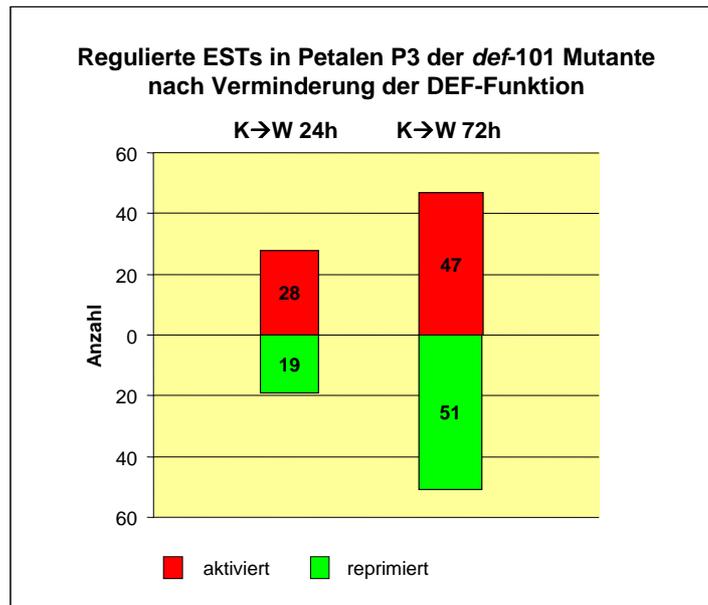


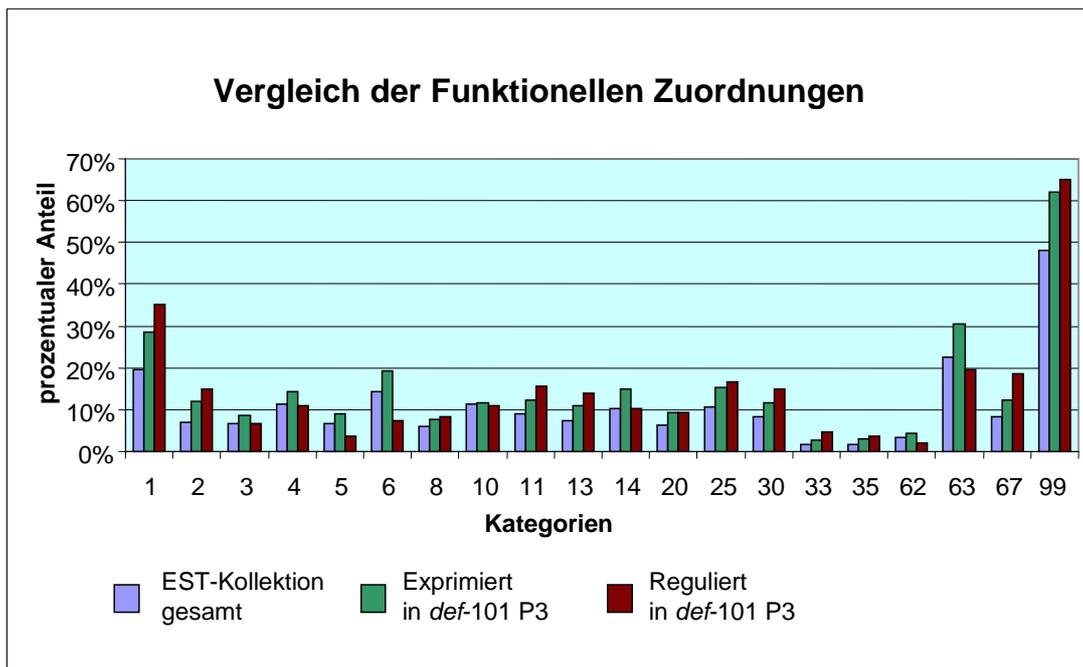
Abb. 3-13 Regulierte ESTs in *def-101* Petalen Stadium P3 nach Verminderung der DEF-Funktion. Berücksichtigt werden alle ESTs, deren Expression in den behandelten Petalen P3 (K→W 24h oder K→W 72h) eine minimal 1.2 fache Abweichung zum Expressionsniveau der nicht behandelten Petalen aufweist. K = Kälte (15°C); W = Wärme (26°C)

Nach Abzug der Falschpositiven bleiben 108 DEF-Zielgene mit einer signifikant differentiellen Expression in *def-101* Petalen P3 nach Verminderung der DEF-Funktion für 24h oder 72h (Datentabelle im Anhang unter Kapitel 7.4). Bei 55 von ihnen erhöht sich das Transkriptionsniveau im Vergleich zur Kontrollbedingung und bei 53 ESTs wird die Expression verringert. Spaltet man diese Ergebnisse weiter nach den einzelnen Untersuchungsbedingungen auf, so ist bereits nach 24h die Transkription von 47 ESTs reguliert, 60% davon zeigen eine Transkriptionsaktivierung (siehe Abb. 3-13). Nach 72h Wachstum in der permissiven Temperatur weisen 98 ESTs eine Transkriptionsregulation auf, wobei hier ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den Anzahlen der ESTs mit erhöhten bzw. erniedrigten Expressionsniveau zu beobachten ist.

Zur genaueren Analyse der 108 ermittelten DEF-Zielgene werden in den Kapiteln 3.2.2.3 und 3.2.2.4 die von DEF aktivierten bzw. reprimierten Zielgene getrennt voneinander betrachtet. Zunächst wird jedoch der gesamte Datensatz der 108 DEF-Zielgene unter funktionellen Aspekten untersucht.

3.2.2.2.1 Funktionelle Untersuchung der DEF-Zielgene

Analog zu den in Kapitel 3.1.2.2.1 durchgeführten MIPS-Analysen wurden auch hier den EST-Datensets funktionelle MIPS-Kategorien nach Vergleich mit dem Gen mit der höchsten Sequenzähnlichkeit aus *Arabidopsis* zugeordnet.



MIPS-Kategorien:

1	Metabolismus	14	Zellschicksal
2	Energie	20	Systemische Regulation
3	Zell-Zyklus / DNA	25	Entwicklung
4	Transkription	30	Kontrolle zell. Organisation
5	Proteinsynthese	33	Zelltyp-Differenzierung
6	Proteinverarbeitung	35	Gewebe-Differenzierung
8	Zellulärer Transport	62	Regulation Proteinaktivität
10	Zellulärer Kommunikation	63	Struktur- oder Katalyt. Proteine
11	Zellabwehr	67	Transport
13	Interaktion mit Zellumgebung	99	Nicht klassifiziert

Abb. 3-14 Vergleich der funktionellen Zuordnungen der gesamten ESTs der *Antirrhinum*-Kollektion mit denen der in *def-101* Petalen P3 exprimierten bzw. regulierten ESTs

Die Sequenzen der gesamten Unigene der *Antirrhinum* EST-Kollektion (11.600), der in *def-101* Petalen P3 exprimierten ESTs (2848) und der von DEF in *def-101* Petalen P3 regulierten ESTs (108) wurden mit den Proteinsequenzen von *Arabidopsis thaliana* verglichen. Die jeweiligen MIPS-Kategorien der sequenzähnlichsten *A. thaliana* Gene wurden übernommen und die prozentualen Häufigkeiten der, in den drei Datensätzen vorkommenden MIPS-Kategorien verglichen.

Auch hier wurde der Datensatz der in *def-101* Petalen P3 regulierten ESTs (108) mit dem der in diesem Petalenstadium exprimierten ESTs (2848) und dem Gesamt-Datensatz der

EST-Kollektion (11.600) verglichen und die prozentualen Anteile der Kategorien am jeweiligen Datensatzvolumen in einem Balkendiagramm dargestellt (siehe Abb. 3-14).

Die prozentualen Anteile der Hälfte der in Abbildung 3-14 dargestellten Kategorien sind auf einem vergleichbaren Niveau in allen drei Datensätzen. Die anderen 10 dieser 20 MIPS-Kategorien sind im Datensatz der von DEF regulierten Gene entweder über- oder unterrepräsentiert. Sie sind in Tabelle 5 dargestellt. Zu den Kategorien, die sowohl im Datensatz der in *def-101* Petalen P3 exprimierten als auch im Datensatz der dort regulierten ESTs (jeweils im Vergleich zum EST-Gesamtset) sichtlich überrepräsentiert sind gehören Metabolismus, Energie, Zellabwehr, Interaktion mit Zellumgebung, Entwicklung, Kontrolle der zellulären Organisation, Zelltyp-Differenzierung und Transport (siehe Tabelle 5).

Kategorie	ESTs gesamt	exprimiert in <i>def-101</i> P3	reguliert in <i>def-101</i> P3
Metabolismus	20%	29%	35%
Energie	7%	12%	15%
Proteinsynthese	6%	9%	4%
Proteinverarbeitung	14%	18%	7%
Zellabwehr	9%	12%	16%
Interaktion mit Zellumgebung	7%	11%	14%
Entwicklung	11%	15%	17%
Kontrolle der zell. Organisation	8%	12%	15%
Zelltypdifferenzierung	2%	3%	5%
Transport	8%	12%	19%

Tabelle 5 Vergleich der prozentualen Anteile der unterschiedlich repräsentierten funktionellen MIPS-Kategorien des Datensets der in *def-101* Petalen P3 regulierten ESTs

Angegeben sind jeweils die prozentualen Häufigkeiten der MIPS-Kategorien innerhalb der drei untersuchten Datensätze: EST-Gesamtset (11.600), in *def-101* Petalen P3 exprimierte ESTs (2848); in *def-101* Petalen P3 regulierte ESTs (108).

Die Kategorien Proteinsynthese und Proteinverarbeitung sind zwar auch im Set der in *def-101* Petalen P3 exprimierten Gene im Vergleich zum Gesamtset stärker vertreten (9% statt 6%, bzw. 18% statt 14%), jedoch sinken die Werte für diese Kategorien bei Betrachtung

tung der 108 DEF-Zielgene unter das Niveau der Werte für den EST-Gesamtdatensatz ab (4% statt 6%, bzw. 7% statt 14%).

Verglichen mit der MIPS-Kategorie Analyse der in WT Petalenstadien (Kapitel 3.1.2.2.1) aus der fünf Kategorien hervorgingen, die im Set der regulierten Gene deutlich überrepräsentiert waren, wurden hier zehn Kategorien beschrieben, deren prozentuale Anteile sich in dem Datensatz der von DEF regulierten ESTs ähnlich deutlich von dem EST-Gesamtdatensatz unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass sich das regulatorische Potential von DEFICIENS auf viele verschiedene Stoffwechselwege erstreckt.

Um spezifischere Aussagen über die biologische Relevanz der stark regulierten Kategorien treffen zu können, wurden genauso wie für die Subgruppen A-D (Kapitel 3.1.2.2.2 und 3.1.2.2.3) neben getrennten MIPS-Analysen für die Datensätze der in behandelten *def*-101 Petalen P3 hoch- bzw. runterregulierten ESTs, zusätzlich separate funktionelle Betrachtungen der DEF-Zielgene dieser beiden Datensätze durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4).

3.2.2.3 Zielgene, die von DEF aktiviert werden

Da dieses Experiment das Expressionsverhalten der ESTs nach einer Abnahme der DEF-Funktion untersucht, sind alle Gene, die ebenfalls ein signifikant abfallendes Expressionsniveau nach Verminderung der DEF-Funktion zeigen, direkt oder indirekt aktivierte Zielgene von DEF. Die 53 ESTs, die diesem Kriterien genügen sind in Form eines hierarchischen Clusters (Abb. 3-15) dargestellt.

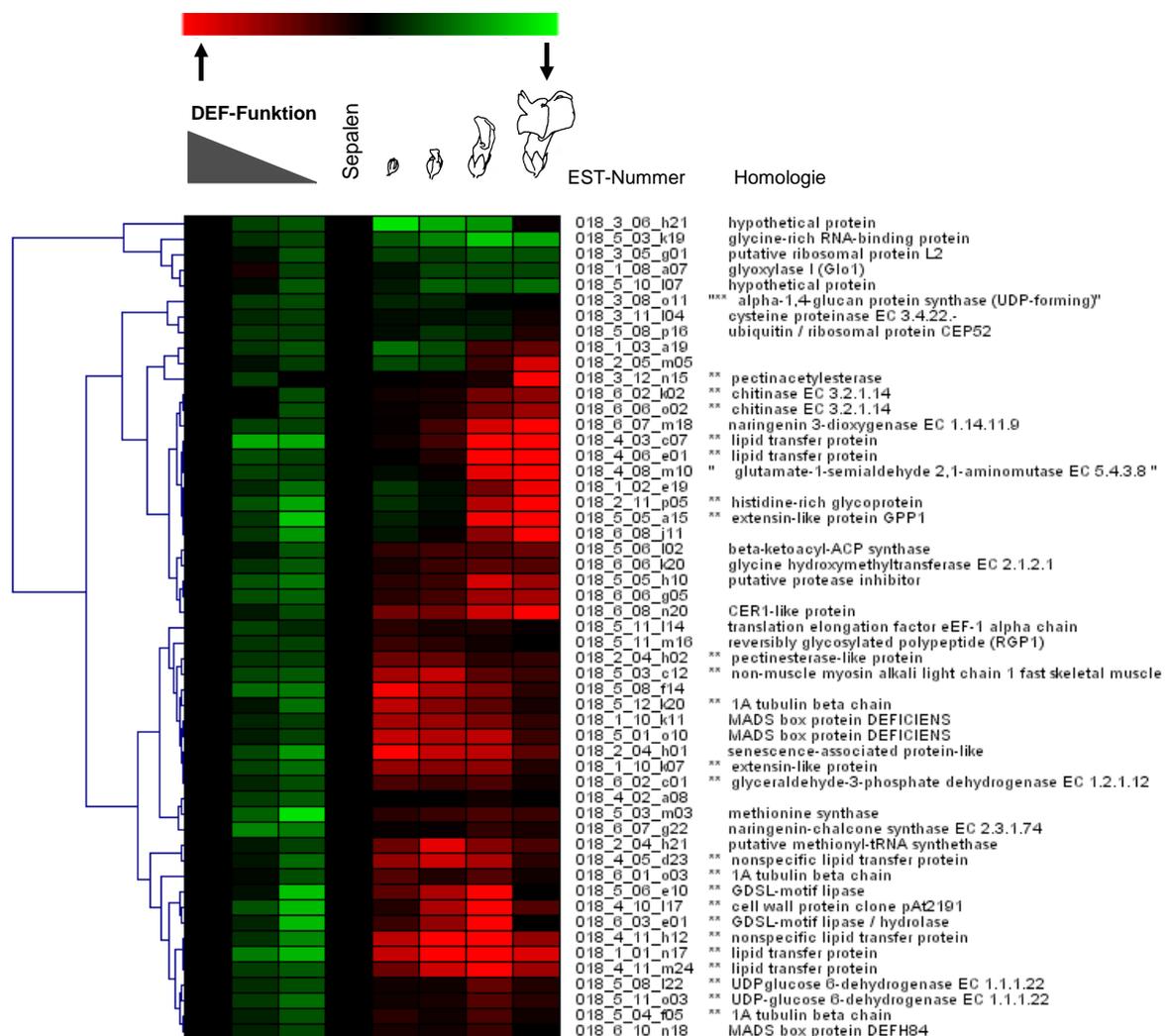


Abb. 3-15 Hierarchisches Cluster der von DEF aktivierten Zielgene in *def-101*-Petalen Stadium P3 unter Berücksichtigung ihrer Petalen-spezifischer Expressionsmuster

Die hier gezeigten ESTs zeigen nach Verminderung der DEF-Funktion mittels Temperaturänderung für 24h oder 72h (Spalte 2 und 3) in mindestens einer dieser Bedingungen einen signifikanten Rückgang ihrer Expression im Vergleich zu der Kontrollbedingung (Spalte 1). Daneben sind die Expressionsprofile dieser ESTs in den Petalenstadien P1 bis P4 (Spalten 5-8) im Vergleich zu dem Expressionsniveau in Sepalen (Spalte 4) angegeben. Die ESTs sind gemäß der Ähnlichkeit ihres relativen Expressionsprofils angeordnet.

** = Korrelation zu Zellwandmetabolismus

Innerhalb der Expressionsprofile der von DEF aktivierten Gene gibt es Unterschiede in der Schnelligkeit und der relativen Stärke der Reaktion auf eine modifizierte DEF-Funktion. Während viele ESTs mit einem stetig abfallenden Expressionsniveau innerhalb der ersten 72h nach Behandlung reagieren, gibt es einige, bei denen die maximale Regulation sehr schnell nach 24h erfolgt, oder andere, deren Expressionsniveau nach 24h verminderter DEF-Funktion kaum beeinflusst und der signifikante Effekt erst nach 72h nachweisbar ist. Im Weiteren fällt wie schon bei den hierarchischen Clustern der Subgruppen A-D (Kapitel 3.1.2.2.2 bzw. 3.1.2.2.3) auf, dass auch hier Gene mit ähnlichem Expressionsmustern ähnliche BLAST-Homologien aufweisen.

Betrachtet man die BLAST-Homologien dieser 53 ESTs unter funktionellen Aspekten, so fällt auf, dass 24 von ihnen mit dem Zellwandmetabolismus bzw. Zellstreckungswachstum korreliert werden können. Neben strukturellen Bestandteilen der Zellwand (z.B. Extensin und Tubulin) umfassen die Ergebnisse der Sequenzvergleiche außerdem Enzyme aus dem Glukosestoffwechsel (z.B. UDP-Glukose 6-Dehydrogenase), Enzyme die bei der Zellstreckung eine Rolle spielen (Pektinesterase), ein CER1-ähnliches Protein und allein sechs Lipid Transfer Proteine.

Die Untersuchungen der MIPS-Analysen für diesen Datensatz ergeben, dass im Vergleich zum Gesamtset der EST-Kollektion in die Kategorien Metabolismus (40% statt 20%), Interaktion mit der Zellumgebung (19% statt 7%) und Kontrolle der zellulären Organisation (25% statt 8%) stark überrepräsentiert sind.

3.2.2.4 Zielgene, die von DEF reprimiert werden

In Analogie zu der Aussage am Anfang von Kapitel 3.2.2.1 werden hier alle ESTs als von DEF direkt oder indirekt reprimierte Zielgene bezeichnet, die ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau nach Verminderung der DEF-Funktion in *def-101*-Petalen Stadium 3 aufweisen. Die Expressionsdynamiken der 55 ESTs die dieses Kriterium erfüllen sind in Abb. 3-16 dargestellt.

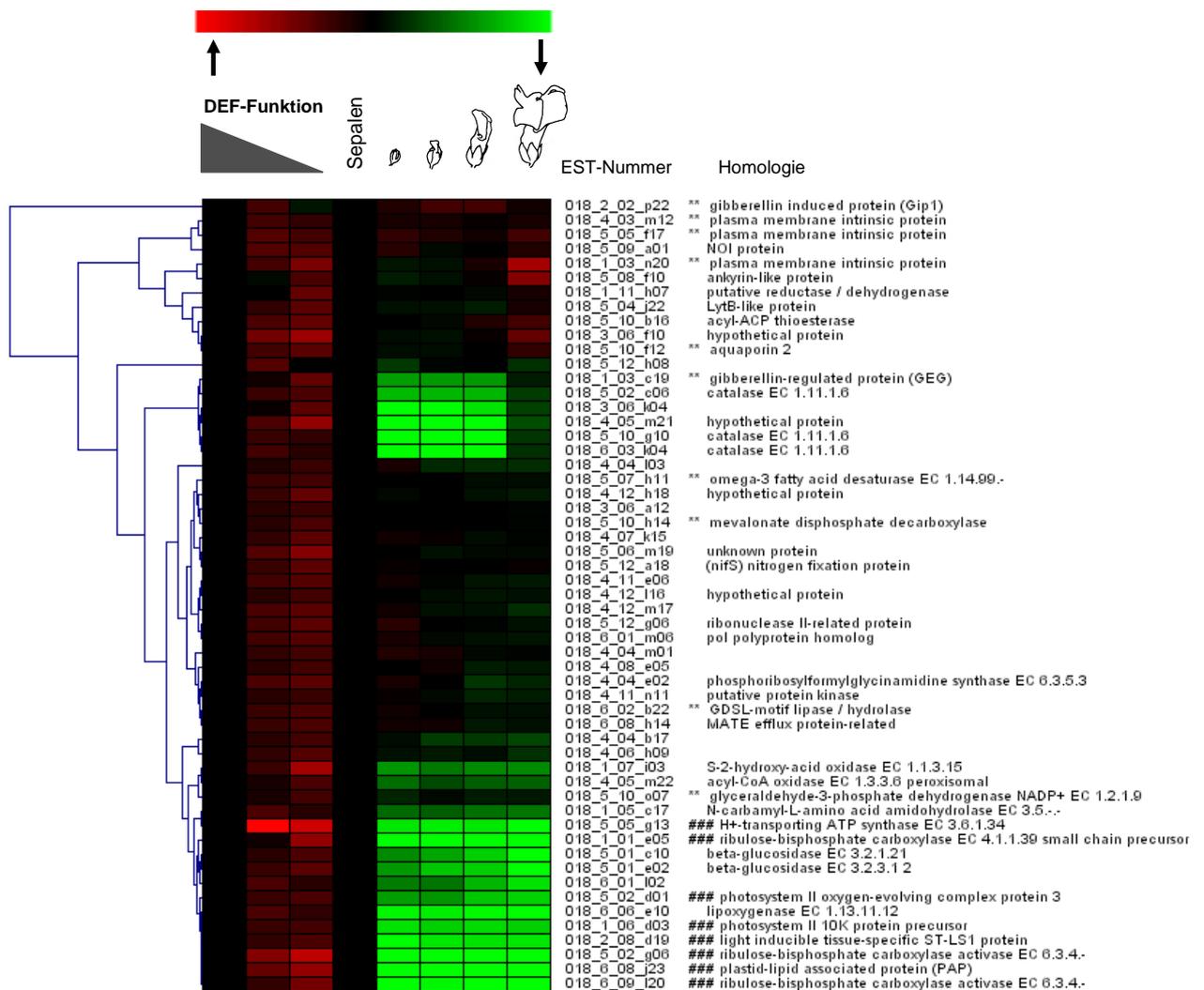


Abb. 3-16 Hierarchisches Cluster der von DEF reprimierten Zielgene in *def-101*-Petalen Stadium P3 unter Berücksichtigung ihrer Petalen-spezifischen Expressionsmuster

Die hier gezeigten ESTs zeigen nach Verminderung der DEF-Funktion mittels Temperaturänderung für 24h oder 72h (Spalte 2 und 3) in mindestens einer dieser Bedingungen einen signifikanten Anstieg ihrer Expression im Vergleich zu der Kontrollbedingung (Spalte 1). Daneben sind die Expressionsprofile dieser ESTs in den Petalenstadien P1 bis P4 (Spalten 5-8) im Vergleich zu dem Expressionsniveau in Sepalen (Spalte 4) angegeben. Die ESTs sind gemäß der Ähnlichkeit ihres relativen Expressionsprofils angeordnet.

** = Korrelation zu Zellwandmetabolismus; ### = Korrelation zu Photosynthese

Auch hier finden sich wieder einige ESTs, die entweder sehr schnell schon nach 24h oder nur später nach 72h einen signifikanten regulativen Effekt auf transkriptioneller Ebene zeigen. Bei den meisten ist jedoch, wie schon bei den von DEF aktivierten Zielgenen, eine sich verstärkende Expressionsänderung in Reaktion auf eine verlängerte Reduktion der DEF-Funktion zu beobachten.

Bis auf wenige Ausnahmen zeigen die von DEF in *def-101* Petalen des Stadiums P3 negativ regulierten ESTs in WT-Petalen Stadium P3 ein vermindertes Expressionsniveau gegenüber dem in Sepalen. Besonders zwei Subgruppen fallen in diesem hierarchischen Cluster auf: die erste beinhaltet ESTs, deren Expression in WT-Petalen P1 bis P3 äußerst stark vermindert ist, die zweite ESTs bei denen dies durchweg in allen Petalenstadien der Fall ist (siehe Abb. 3-16) Ende erstes Drittel und gesamtes letztes Drittel). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die meisten ESTs der zweiten Gruppe funktionell mit der Photosynthese assoziiert sind. Hier liegt eine eindeutige Korrelation zwischen Genregulation und Funktionalität vor. Zudem zeigen auch hier wieder viele ESTs eine Verbindung zum Zellwandmetabolismus. Darunter befinden sich neben Enzymen des Lipidstoffwechsels (z.B. Mevalonat-Disphosphat-Decarboxylase, GDSL-Lipase) zwei Gibberellin-regulierte Gene und vier Plasmamembranproteine. Außerdem befinden sich unter den von DEF reprimierten Genen ein *Ankyrin*-ähnliches Gen, dessen Genprodukt eine auf osmotischen Stress reagierende Proteinkinase darstellt und ein Transporter-Gen (*MATE-Efflux*-ähnliches Gen).

3.2.3 Bestätigung der Makroarray-Daten mittels semiquantitativer RT-PCRs

Um die mittels Makroarray-Expressionsprofil-Experimenten identifizierte DEF-Zielgene mit einer unabhängigen Expressionsanalyse-Methode zu untersuchen, wurden semiquantitative RT-PCRs mit 16 Gen-spezifischen Primerpaaren durchgeführt (Sequenzen der Oligonukleotide siehe Anhang). Hierfür wurden 15 Gene inklusive *DEFICIENS* und *GLOBOSA* aus dem Set der 108 regulierten ESTs ausgewählt und zusätzlich *Ran3* (GTPase) als PCR-Standard verwendet. Hauptkriterien für die Auswahl waren Schnelligkeit und Stärke der Expressionsveränderung der Zielgene nach Verminderung der DEF-Funktion bei möglichst geringer Reaktion auf die Temperaturänderung. Die Primer wurden so gewählt dass die durchschnittliche Amplifikatlänge 400-500 Basenpaare betrug. Eine Zusammenstellung des Vergleichs der Expressionsdaten ist in der Abbildung 3-17 dargestellt.

Hier zeigt sich, dass die Makroarray-Daten dieses Expressionsprofil-Experiments qualitativ zu über 80% mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR Technik bestätigt werden konnten (siehe teilweise auch Abb. 3-18, Kapitel 3.3.1).

EST-Nummer	RT-PCR		Makroarray-Ratios						Homologie
	<i>def-101</i> k → w 0 24 72 <i>WT165E</i> k → w 0 24 72		<i>def-101</i> k → w 0 24 72			<i>WT165E</i> k → w 0 24 72			
018_5_01_o10			1.0	0.91	0.82	1.0	0.99	0.92	DEFICIENS
018_5_12_k20			1.0	0.93	0.71	1.0	0.91	0.83	Alpha Tubulin Beta Untereinheit
018_5_05_a15			1.0	0.85	0.55	1.0	1.10	0.63	Prolin-reiches Protein GPP1 Extensin-ähnlich
018_1_01_e05			1.0	1.07	1.56	1.0	0.96	1.07	RuBisCO kleine Untereinheit EC 4.1.1.39
018_6_08_j23			1.0	1.34	1.54	1.0	1.02	1.04	Plastilipid-assoz. Protein PAP Fibrillin-Familie
018_5_01_e02			1.0	1.21	1.31	1.0	1.02	1.02	Beta-Glukosidase EC 3.2.3.1 2
018_5_02_g06			1.0	1.47	1.75	1.0	1.07	1.04	RuBisCO Aktivase EC 6.3.4.-
018_4_05_m21			1.0	1.26	1.54	1.0	0.98	1.12	Hypothetisches Protein
018_4_06_e01			1.0	0.79	0.82	1.0	1.29	1.21	Lipid Transfer Protein
018_6_07_m18			1.0	0.82	0.82	1.0	1.31	1.07	Naringenin 3-Dioxygenase EC 1.14.11.9
018_5_03_c12			1.0	0.81	0.76	1.0	1.02	0.98	Myosin, leichte Untereinheit
018_5_08_f14			1.0	0.73	0.69	1.0	0.87	0.83	Unbekanntes Protein
018_6_08_n20			1.0	0.92	0.80	1.0	1.06	1.13	CER1-ähnlich
018_5_02_d09			1.0	0.96	0.93	1.0	1.04	1.08	GLOBOSA
018_5_09_a01			1.0	1.28	1.30	1.0	1.05	1.21	NOI Protein
018_6_06_k11			1.0	1.02	1.01	1.0	1.04	1.06	<i>Ran3</i> GTPase (PCR-Standard)

Abb. 3-17 Vergleich der Genexpression einiger DEF-Zielgene mittels RT-PCR Technik und Makroarray Technik.

Neben den UV-Licht-Fotografien der Gelelektrophoresen der RT-PCR-Analysen sind die Makroarray-Daten der korrespondierenden ESTs in Mutante (*def-101*) und WT aufgelistet. Die RT-PCR-Reaktionen wurden mit einer Primer-Anlagerungstemperatur von 56°C und 1 min Syntheszeit durchgeführt. Die Anzahl der PCR-Zyklen betrug 20 (bzw. * 25). k = Kälte(15°C); w = Wärme (26°C); 0 (24, 72) = Material wurde für 0 (24, 72) Stunden behandelt.

3.3 Vergleichende Expressionsanalysen ausgewählter DEF-Zielgene in Mutante und Wildtyp

3.3.1 Auswahl einiger DEF-Zielgene für weitere Analysen

Von den über 100 DEF-Zielgenen, die in Kapitel 3.2 durch das Expressionsprofil-Experiment identifiziert werden konnten, wurden für weitere detailliertere Expressionsanalysen sechs bestätigte Zielgene und *DEFICIENS* und *GLOBOSA* als Kontrollen ausgewählt.

Hauptkriterium für die Auswahl der besten Kandidaten war eine eindeutige und schnelle Veränderung des Expressionsniveaus in *def-101*-Petalen des Stadiums P3, nachdem die DEF-Funktion für 24h bzw. 72h vermindert wurde. Zudem musste eine gleichartig starke Reaktion aufgrund von Temperatursensitivität ausgeschlossen und die Expressionsänderungen durch RT-PCR-Studien bestätigt werden können. Des Weiteren sollte sich das Expressionsniveau der entsprechenden Gene in Wildtyp-Petalen Stadium P3 deutlich von dem jeweiligen Expressionsniveau in WT Sepalen unterscheiden.

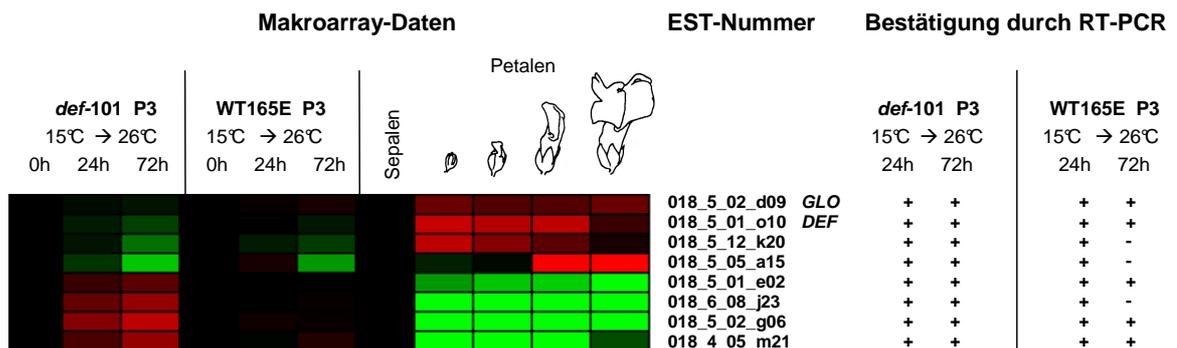


Abb. 3-18 Auswahl einiger DEF-Zielgene für weitere Analysen

Für alle ausgewählten DEF-Zielgene wurden neben den Makroarray-Daten aus den Kapiteln 3.1 und 3.2 auch die bewerteten Ergebnisse der RT-PCRs aus Kapitel 3.2.3 schematisch dargestellt. Ein „+“ bedeutet, dass die Makroarray-Daten durch die RT-PCR-Ergebnisse qualitativ bestätigt wurden, ein „-“ bedeutet, dass diese nicht bestätigt werden konnten. (rote Farbtöne: erhöhte Expression im Vergleich zu Kontrolle; grüne Farbtöne: verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle)

Abb. 3-18 fasst die bis hierher vorhandenen Expressionsdaten der interessantesten ESTs zusammen, deren Expression in induzierten Petalen Stadium P3 sowohl in Makroarray-Experimenten (siehe Kapitel 3.2.1) als auch mittels RT-PCR (siehe Kapitel 3.2.3) analysiert wurde. Zum Vergleich werden die entsprechenden Daten von *DEF* und *GLO* dargestellt, deren Expression bekanntermaßen unter einer autoregulativen Kontrolle der Protein-Heterodimere steht (Tröbner *et al.*, 1992).

Eine Auflistung der Sequenzvergleiche der ausgewählten Gene gegen die Gesamtheit der bekannten Proteine bzw. derer von *Arabidopsis thaliana* ist in Tabelle 6 zu sehen. Für die Sequenzvergleiche wurden die bis dato nur ansequenzierten cDNA-Fragmente der entsprechenden EST-Klone noch einmal vollständig nachsequenziert (siehe nächster Abschnitt 3.3.2). Um die Handhabung dieser sechs Kandidaten im weiteren Verlauf dieser Arbeit zu vereinfachen, wurden sie gemäß der Art ihrer Regulation durch DEFICIENS in *def-101* Petalen Stadium P3 benannt und durchnummeriert. Gene, die von DEF aktiviert werden, werden als *DEFTup* bezeichnet (*DEF Target-Gen upregulated*) und solche die von DEF reprimiert werden als *DEFTdown* (*DEF Target-Gen downregulated*).

DEF-Zielgen	EST-Nummer	BLAST-Homologie	„e-value“	<i>A. thaliana</i> Gen mit größter Homologie AGI I / Ä
<i>DEFTup 1</i>	018_5_05_a15	Extensin-ähnliches Protein GPP1	1e -47	At4g38770 (48% / 65%)
<i>DEFTup 2</i>	018_5_12_k20	Alpha Tubulin Beta Untereinheit	0.0	At4g14960 (91% / 94%)
<i>DEFTdown 1</i>	018_5_02_g06	RuBisCO Aktivase	0.0	At2g39730 (79% / 86%)
<i>DEFTdown 2</i>	018_5_01_e02	Beta Glukosidase	1e -102	At2g44480 (43% / 62%)
<i>DEFTdown 3</i>	018_4_05_m21	hypothetisches Protein	---	--- (- / -)
<i>DEFTdown 4</i>	018_6_08_j23	Plastidlipid-assoziiertes Protein der Fibrillin-Familie	3e -25	At3g23400 (71% / 80%)

Tabelle 6 Übersicht der ausgewählten DEF-Zielgene mit Ergebnissen der Sequenzähnlichkeitsvergleiche

Den ausgesuchten ESTs wurden zur vereinfachten Handhabung im weiteren Verlauf dieser Arbeit neue Namen gegeben (*DEFT* = *DEF* „Target“-Gen; *up* = wird in Petalen Stadium P3 von DEF aktiviert; *down* = wird in Petalen Stadium P3 von DEF reprimiert). Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche gegen alle bekannten Proteine sind mit einem Maß der Wahrscheinlichkeit („e-value“) angegeben. Je kleiner dieser Wert ist, desto größer ist der Anteil an Sequenzübereinstimmungen zwischen dem EST und dem wahrscheinlich homologen Gen. Daneben sind die AGI-Nummern der Gene mit der höchsten Sequenzähnlichkeit in *Arabidopsis thaliana* mit dem Grad der Gleichartigkeit der verglichenen Proteinsequenzen in Prozent angegeben. (I: Anteil identischer AS; Ä: Anteil ähnlicher AS)

3.3.2 Ermittlung der vollständigen EST-Sequenzen der ausgewählten DEF-Zielgene

Im Zuge der Erstellung der EST-Datenbank von *Antirrhinum majus* wurden die hergestellten EST-Klone nur einseitig, ausgehend von dem 5'-Ende ansequenziert. Die dadurch erhaltenen Sequenzen haben eine durchschnittliche Länge von 582 Basenpaaren.

Für möglichst genaue Sequenzvergleiche werden von den ausgewählten Genen die komplett verfügbaren EST-Sequenzen ermittelt werden.

Eine sukzessive Sequenzierung der entsprechenden EST-Plasmide erfolgte unter Benutzung der im Anhang aufgeführten EST-Adapterprimer und spezifischen Sequenzierprimern. Die Sequenzierreaktionen wurden von der Service-Gruppe ADIS (MPIZ) durchgeführt (siehe Material & Methoden Kapitel 2.7).

DEF-Zielgen	EST-Nummer	BLAST-Homologie	Länge cDNA	vollständiger ORF
<i>DEFTup 1</i>	018_5_05_a15	Extensin-ähnliches Protein GPP1	1779 bp	ja
<i>DEFTup 2</i>	018_5_12_k20	Alpha Tubulin Beta Untereinheit	1600 bp	ja
<i>DEFTdown 1</i>	018_5_02_g06	RuBisCO Aktivase	1597 bp	ja
<i>DEFTdown 2</i>	018_5_01_e02	Beta Glukosidase	1181 bp	nein
<i>DEFTdown 3</i>	018_4_05_m21	hypothetisches Protein	1094 bp	nicht bekannt
<i>DEFTdown 4</i>	018_6_08_j23	Plastidlipid-assoziiertes Protein der Fibrillin-Familie	952 bp	nicht bekannt

Tabelle 7 Längen der cDNA-Fragmente der ausgewählten DEF-Zielgene

Die cDNA-Insertionen der EST-Plasmide wurden unter Benutzung der jeweiligen Adapterprimer und erforderlichen Gen-spezifischen Sequenzierprimern sequenziert. Die Längen der vollständigen cDNA-Fragmente ohne Adaptern und poly(A)-Anhang sowie die Information über die Vollständigkeit des offenen Leserasters sind angegeben. (ORF = *open reading frame*)

Für drei der sechs neuen DEF-Zielgene wurden die kompletten Sequenzen der offenen Leseraster ermittelt. Im Falle des *Beta Glukosidase* Gens fehlt ein Teil des 5'-Bereichs des offenen Leserasters, demzufolge konnte das Startcodon nicht bestimmt werden. Bei den Genen *DEFTdown 3* bzw. *4* ist die Position des Stop- bzw. Startkodons unklar.

Die c-DNA Sequenzen der hier untersuchten EST-Klone sind im Anhang dokumentiert.

3.3.3 Vergleichende Expressionsanalysen ausgewählter DEF-Zielgene

In diesem Kapitel wurden zur detaillierteren Charakterisierung der Genexpression der sechs ausgewählten DEF-Zielgene zusätzlich zu den bereits in den Kapiteln 3.1 und 3.2 dargestellten Expressionsstudien, weitere RT-PCR-Experimente durchgeführt. *DEFICIENS* bzw. *GLOBOSA* wurden als Kontrollgene in diese Expressionsanalysen miteinbezogen.

Die Organspezifität der Gene wurde mittels Expressionsanalysen in sämtlichen Blütenorganen und vier vegetativen Geweben von WT165E Pflanzen untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Blütenorgane (Sepalen, Petalen, Stamina und Karpelle) im Stadium 3 und die vegetativen Organe (Brakteen, Blätter, Stängel und Wurzeln) derselben WT Pflanzenpopulation, die unter Gewächshausbedingungen aufwuchs, geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und Erststrang-cDNAs hergestellt (siehe Material & Methoden Kapitel 2.5.4). Die in diesem Versuchsteil verwendete Gesamt-RNA aus *Antirrhinum majus* Wurzeln wurde freundlicherweise von Dr. Shuping Xing zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurde mittels RT-PCR-Analysen getestet, ob die Expressionsregulation der DEF-Zielgene, die in Petalen P3 der *def-101* Mutante zu beobachten ist, auch in Stamina des gleichen Blütenstadiums der *def-101* Mutante nachgewiesen werden kann. Dazu wurden Stamina des Stadiums 3 von *def-101* Pflanzen, in denen die DEF-Funktion mittels einer Temperaturverschiebung für null, 24 oder 72 Stunden reduziert worden war geerntet, und die entsprechenden Erststrang-cDNAs hergestellt. In Analogie zu den Expressionsstudien in Kapitel 3.2.3 wurde auch hier der identische Ansatz parallel mit WT Stamina des gleichen Stadiums durchgeführt, um Regulationseffekte der Expression aufgrund von Wärmestress erkennen und gegebenenfalls ausschließen zu können.

Ein weiterer Ansatzpunkt war die Frage, ob die in adulten Petalen P3 nachgewiesene Regulation der Zielgene durch *DEFICIENS* zeitlich auf dieses Entwicklungsstadium beschränkt ist, oder ob zudem schon eine Regulation der entsprechenden Gene in sehr jungen Petalenstadien (< P1) nachweisbar ist. Für diesen Versuch wurde die induzierbare Doppelmutante *def-101/plena* genutzt, deren Blüten je nach Kultivierungsbedingung die Charakteristika einer homöotischen C-Mutante oder einer homöotischen B/C-

Doppelmutante zeigen (siehe Einleitung Kapitel 1.2). Unter permissiven Bedingungen (15°C) weisen die *def-101/plena* Blüten neben einem Wirtel Sepalen mehrere Wirtel an Petalen auf, während unter nicht-permissiven Bedingungen (26°C) nur ein Organtyp (Sepalen) in allen Wirteln zu finden ist. Die Doppelmutante wurde gewählt, um die Komplexität der aus Blütenmaterial hergestellten mRNA möglichst gering zu halten, da die zu untersuchenden Blütenstadien zu jung sind, als dass man Organ-spezifisches Blütengewebe isolieren könnte.

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob die Expression der Gene, die sich in *def-101* Mutanten nach einer Reduktion der DEF-Funktion signifikant ändert, in der Doppelmutante auf eine Restauration der DEF-Funktion ebenfalls reagiert.

Um dies zu überprüfen wurden die *def-101/plena* Pflanzen unter nicht-permissiven Bedingungen (26°C) angezogen bis ihre Infloreszenzen die Größe von 1 - 1.5 cm hatten. Durch eine Änderung der Temperatur auf 15°C (permissive Bedingungen) für null, 12, 24, 48 oder 72 Stunden wurde die DEF-Funktion induziert. Die Gesamt-RNA der unterschiedlich induzierten Infloreszenzen diente zur Herstellung der Erststrang-cDNAs für die RT-PCR-Studien (Kapitel 2.5.4). Zusätzlich wurde zum Vergleich Infloreszenzmaterial von *def-101/plena* Pflanzen geerntet und analog verarbeitet, die von Anfang an unter nicht-permissiven Bedingungen (26°C) aufwuchsen.

Aus Gründen der Übersicht wurden einzeln für jedes Gen alle in dieser Arbeit ermittelten Expressionsdaten zusammenfassend in den Abbildungen 3-19 bis 3-26 dargestellt. In den nun folgenden Abschnitten wird deshalb jedes Gen separat betrachtet.

Abb. 3-19 bis 3-26 Vergleichende Expressionsanalysen der sechs ausgewählten DEF-Zielgene und DEF und GLO in Wildtyp und Mutanten

Neben den UV-Licht-Fotografien der Gelelektrophoresen der RT-PCR-Analysen sind die vorhandenen, dazugehörigen Makroarray-Daten dargestellt. Die RT-PCR-Reaktionen wurden mit einer Primer-Anlagerungstemperatur von 56°C und 1 min. Syntheszeit durchgeführt. K = Kälte (15°C)

3.3.3.1 Expression von *DEFICIENS*

In bisherigen Expressionsstudien (Northern, *in situ* Hybridisierungen) konnte gezeigt werden, dass *DEFICIENS* sehr stark in den Organen des zweiten und dritten Wirtels und nur schwach in Sepalen und Karpellen exprimiert ist (Sommer *et al.*, 1991). Die hier durchgeführten Organ-spezifischen RT-PCR-Analysen korrelieren mit den bekannten Literaturdaten (Abb. 3-19). Innerhalb der Petalenentwicklung zeigt *DEF* in den Stadien P1-P3 ein sehr hohes Expressionsniveau, welches dann im Stadium P4 merklich abfällt (siehe auch Kapitel 3.1.3). Aus den mit induzierbaren *def-101* Mutanten durchgeführten Expressionsanalysen (Abb. 3-19) ist ersichtlich, dass *DEF* seine eigene Expression sowohl in Petalen P3 der *def-101* Mutante, als auch in jungen Petalenstadien (<P1) der *def-101/plena* Mutante autoregulativ kontrolliert. Ferner ist festzustellen, dass die vorhandenen Makroarray-Daten gut mit den Ergebnissen der RT-PCR-Analysen korrelieren.

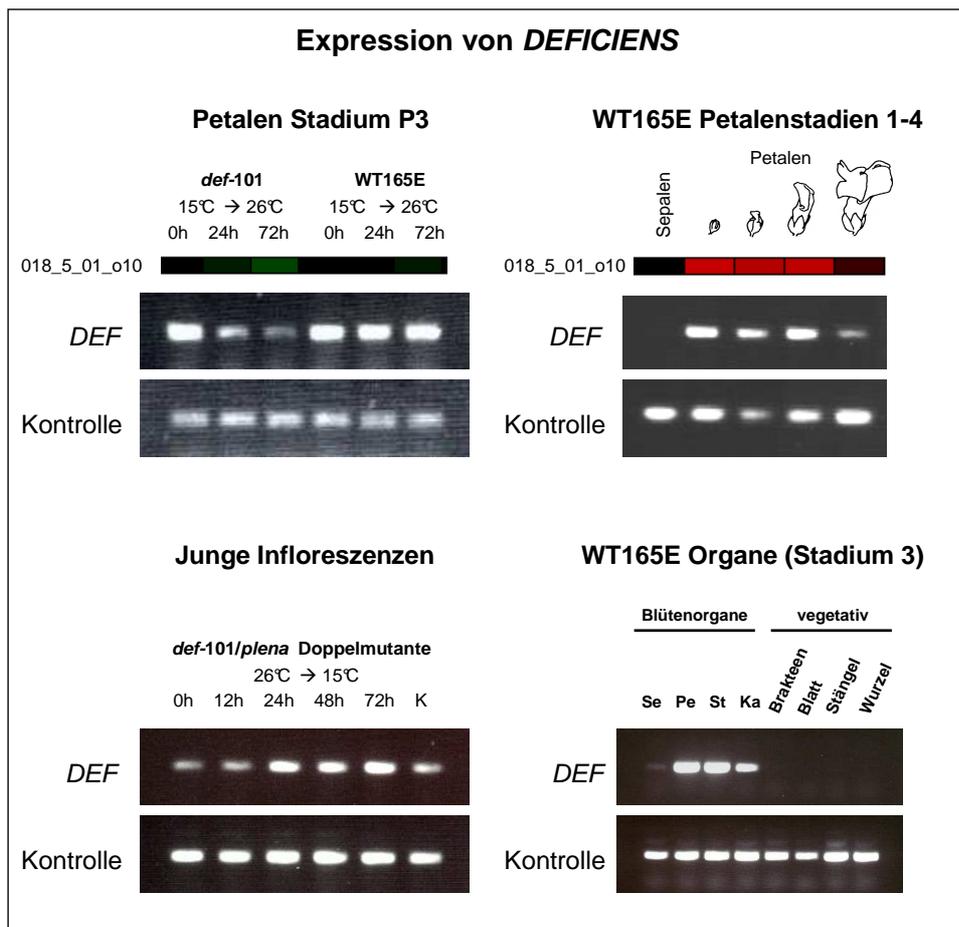


Abbildung 3-19

3.3.3.2 Expression von GLOBOSA

Die Expression von *GLO* beschränkt sich ebenfalls auf Blütenorgane des zweiten und dritten Wirtels (siehe Einleitung). Aus den hier durchgeführten RT-PCR-Analysen geht eine sehr starke Expression dieses Transkriptionsfaktors in Petalen und Stamina und eine schwache Expression in Karpellen hervor, eine Expression in Sepalen liegt im Grenzbereich des Nachweisbaren (Abb. 3-20). Innerhalb der Petalenentwicklung wird *GLO* in allen vier Stadien stark exprimiert, am stärksten im Stadium P4 (siehe auch Kapitel 3.1.3). Eine Reduktion der DEF-Funktion in *def-101* Petalen P3 zeigt kaum Einfluss auf die Expression des *GLO* Gens. In jungen Stadien der *def-101/plena* Doppelmutante ist eine Erhöhung des Expressionsniveaus sichtbar, jedoch ist die Reaktion schwächer als bei *DEFICIENS* (Abb. 3-19). Auch hier werden die vorhandenen Makroarray-Daten durch die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen tendenziell bestätigt.

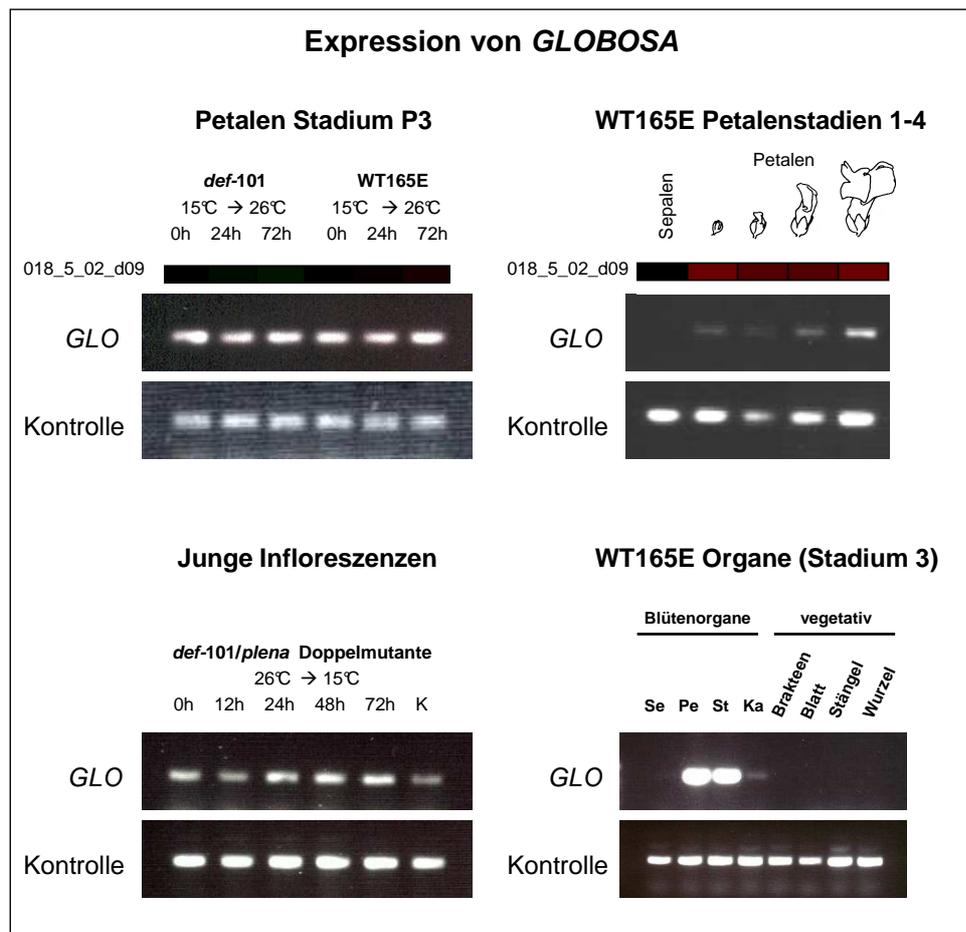


Abbildung 3-20

3.3.3.3 Expression von *DEFTup 1* (Extensin-ähnliches Gen)

Dieses DEF-Zielgen wird in allen hier untersuchten Organen des Wildtyps außer den Wurzeln exprimiert. Die Expressionsstärke variiert jedoch von sehr stark in Petalen und stark in Stamina über mäßig in Karpellen und Brakteen bis schwach in Sepalen, Blättern und Stängeln (Abb. 3-21). Innerhalb der Petalenentwicklung beobachtet man einen Expressionsanstieg in späten Petalen (P3 + P4) (siehe Abb. 3-18). In allen drei der hier untersuchten Testsysteme reagiert die Expression des von DEF aktivierten Gens signifikant und schnell auf Modifikationen in der DEF-Funktion. Wird die DEF-Funktion in *def-101* Petalen oder Stamina reduziert, so sinkt auch das Expressionsniveau von *DEFTup 1* deutlich jeweils schon nach 24h. Wird dagegen in jungen Infloreszenzen der B/C-Doppelmutante die DEF Proteinkonzentration erhöht, so steigt auch die Expression dieses Gens schwach an.

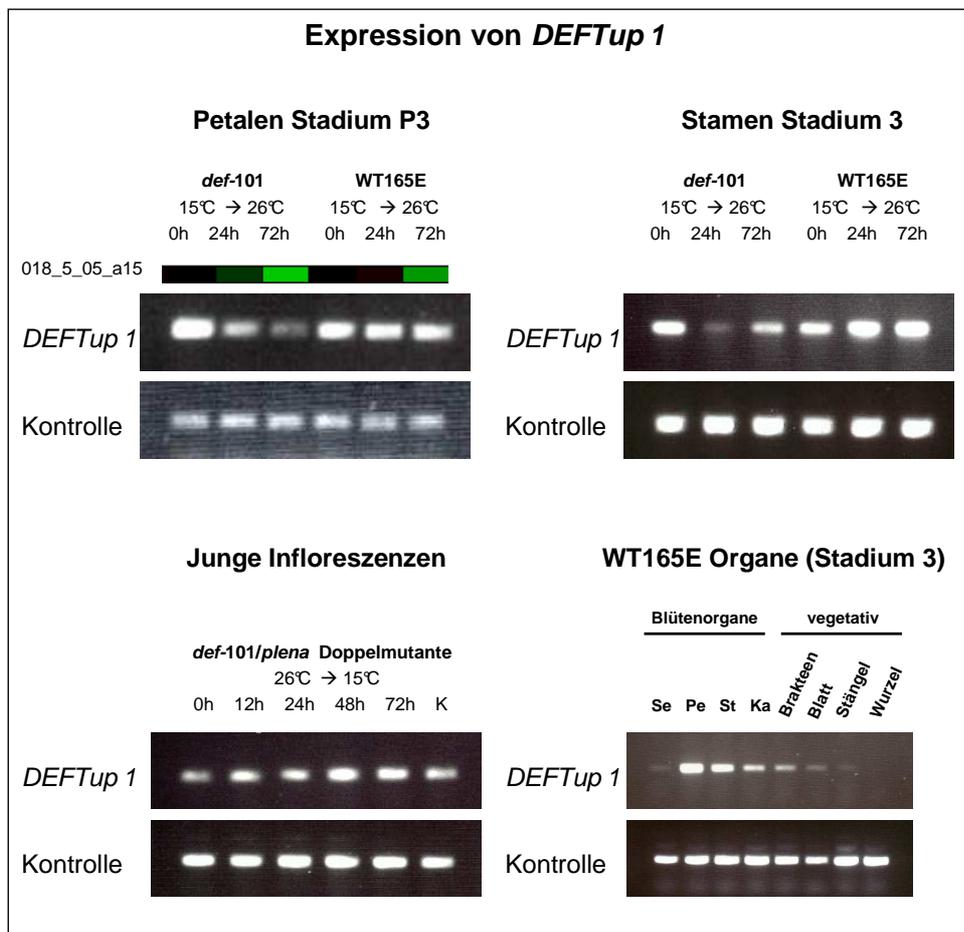


Abbildung 3-21

3.3.3.4 Expression von *DEFTup2* (*Alpha Tubulin*)

Das zweite von DEF aktivierte neue Zielgen zeigt hohe Expressionsniveaus in Petalen, Stamina, Karpellen, Stängeln und Wurzeln und niedrige in Blättern, Brakteen und Sepalen und ist damit in sämtlichen hier untersuchten Organen des Wildtyps exprimiert (Abb. 3-22). Während der Petalenentwicklung zeigt das *Alpha Tubulin* eine starke Expression in Petalen P1, welche in den weiteren Entwicklungsphasen abnimmt und in Petalen P4 fast wieder das Expressionsniveau der Sepalen erreicht (siehe Abb. 3-18). Das aus Petalen P3 der *def-101* Mutante isolierte DEF-Zielgen zeigt in diesem Organ eine starke Expressionsveränderung nach Reduktion der DEF-Funktion, in Stamina die der gleichen Behandlung unterzogen wurden ist jedoch mit der semiquantitativen PCR-Methode keine derartige Reaktion zu beobachten. Anders sieht es in jungen Infloreszenzen der Doppelmutante aus, hier wird die Expression von *DEFTup2* nach Restauration der DEF-Funktion stark aktiviert.

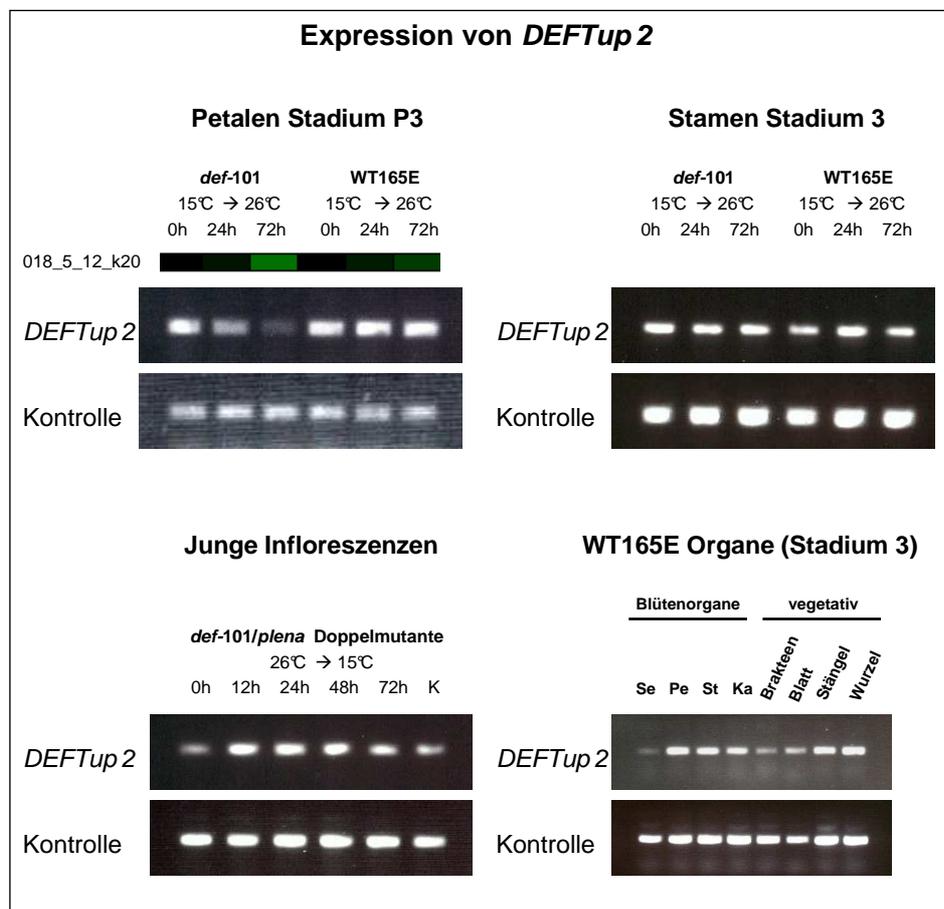


Abbildung 3-22

3.3.3.5 Expression von *DEFT_{down 1}* (*RuBisCO* Aktivase)

Das *RuBisCO* Aktivase Gen wird besonders stark in photosynthetisch aktiven Organen des Wildtyps exprimiert. Dabei zeigt sich eine besonders starke Expression in Sepalen und Brakteen und eine starke Expression in Stängeln und Blättern (Abb. 3-23). In den Blütenorganen des zweiten bis vierten Wirtels ist nur eine sehr schwache Expression zu beobachten und in Wurzeln keine. In Petalen P1-P4 ist dieses Gen sehr stark reprimiert (siehe Abb. 3-18). Die Expression dieses Gens reagiert sehr stark sowohl in Petalen, als auch Stamina der *def-101* Mutante auf eine Reduktion der DEF-Funktion, wobei die Reaktion in Stamen sogar schneller nachweisbar ist. Auch innerhalb des dritten induzierbaren Testsystems, den jungen Infloreszenzen der *def-101/plena* Mutante, ist der reprimierende Einfluss von DEF auf die Expression dieses Zielgens nachweisbar.

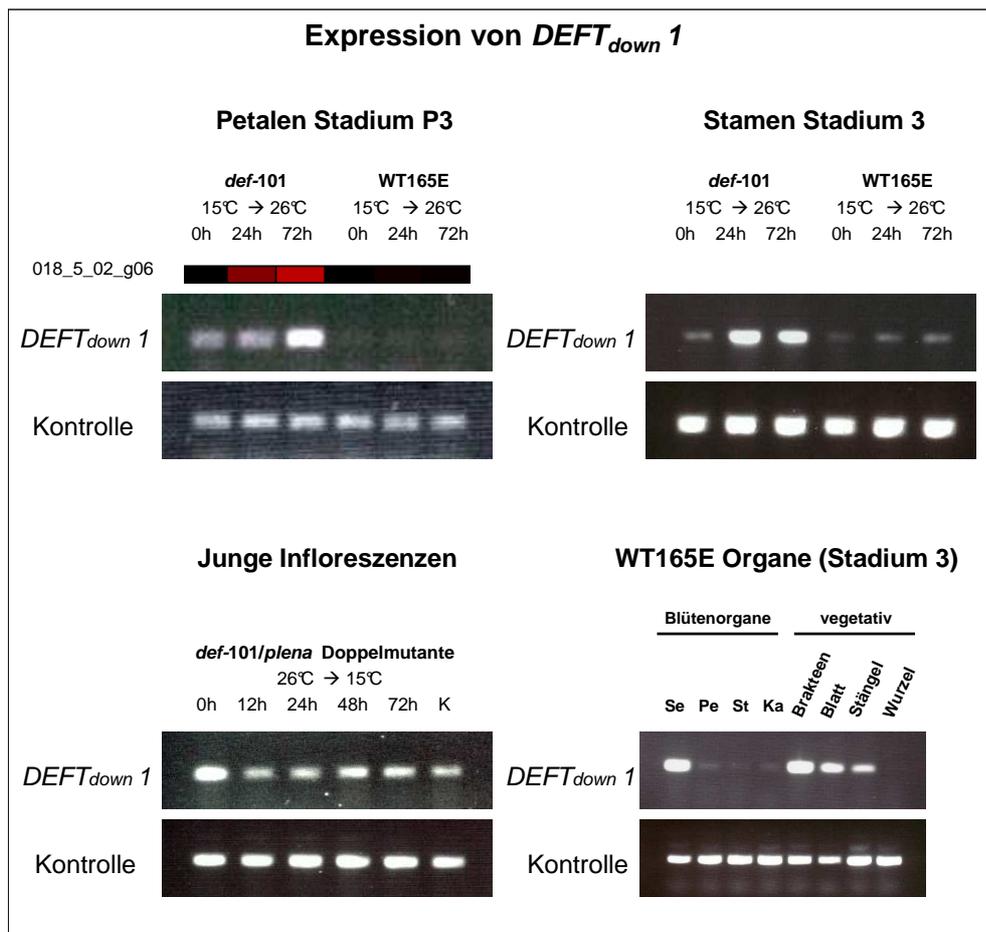


Abbildung 3-23

3.3.3.6 Expression von *DEFT_{down 2}* (*Beta Glukosidase*)

DEFT_{down 2} zeigt in den Blüten ein zu DEF komplementäres Expressionsmuster, da es nur hohe Expressionsniveaus in Karpellen und Sepalen und eine kaum nachweisbares Transkript in Brakteen aufweist (Abb. 3-24). In vegetativen Geweben ist keine Expression nachweisbar. Innerhalb der Petalenentwicklung zeigt die *Beta Glukosidase* schon in Petalen P1 ein reduziertes Expressionsniveau, welches bis hin zu den reifen Petalen (P4) stetig weiter absinkt (siehe Abb. 3-18). Bezüglich der Regulation durch DEF bietet sich in diesem Fall eine interessante Datenlage dar. Während *DEFT_{down 2}* in späten Petalen P3 der *def-101* Mutante von DEF reprimiert wird, erfährt das gleiche Gen in früheren Stadien der Doppelmutante eine Expressionsaktivierung durch DEF. Dies dokumentiert eine von der Entwicklungsphase abhängige, qualitativ unterschiedliche Regulation. In Stamina der *def-101* Mutante ist selbst nach einer 72 stündigen Induktion kein Transkript dieser *Beta Glukosidase* nachzuweisen was darauf hindeutet, dass in diesem Stadium die Organdetermination nicht mehr reversibel ist.

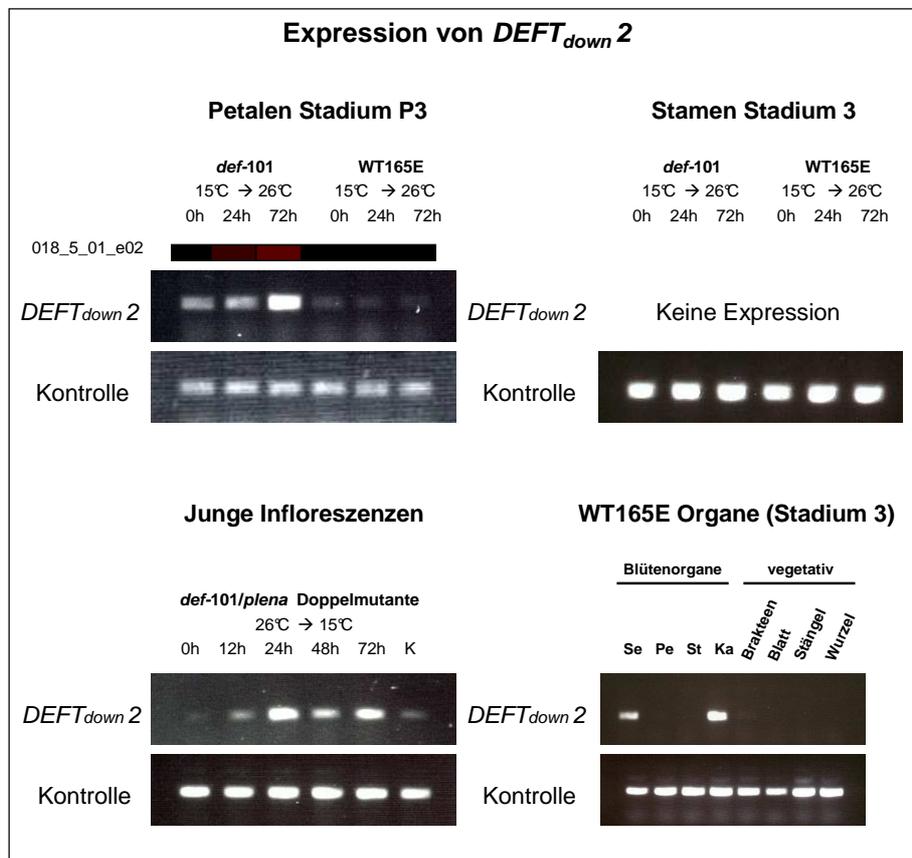


Abbildung 3-24

3.3.3.7 Expression von *DEFT_{down 3}* (hypothetisches Gen)

Das hypothetische Gen weist eine starke Expression in Brakteen, Stängeln und Sepalen des Wildtyps 165E auf. Daneben ist es in Blättern und Wurzeln exprimiert und zeigt außerdem eine schwache, über die Organe abnehmende Expression in Petalen, Stamina und Karpellen (Abb. 3-25). Innerhalb der Petalenentwicklung ist das Zielgen in allen Petalenstadien bis auf P4 sehr stark reprimiert (siehe Abb. 3-18). *DEFT_{down 3}* zeigt eine starke durch DEF induzierte Expressionsveränderung in Petalen P3 der *def-101* Mutante und eine etwas schwächere aber gleichartige Reaktion in den Stamina dieser Pflanzen. Nach einer Induktion der DEF-Funktion in Infloreszenzen der Doppelmutante lässt sich keine eindeutige Regulation der Expression dieses in älteren Blütenstadien von DEF reprimierten Zielgens nachweisen.

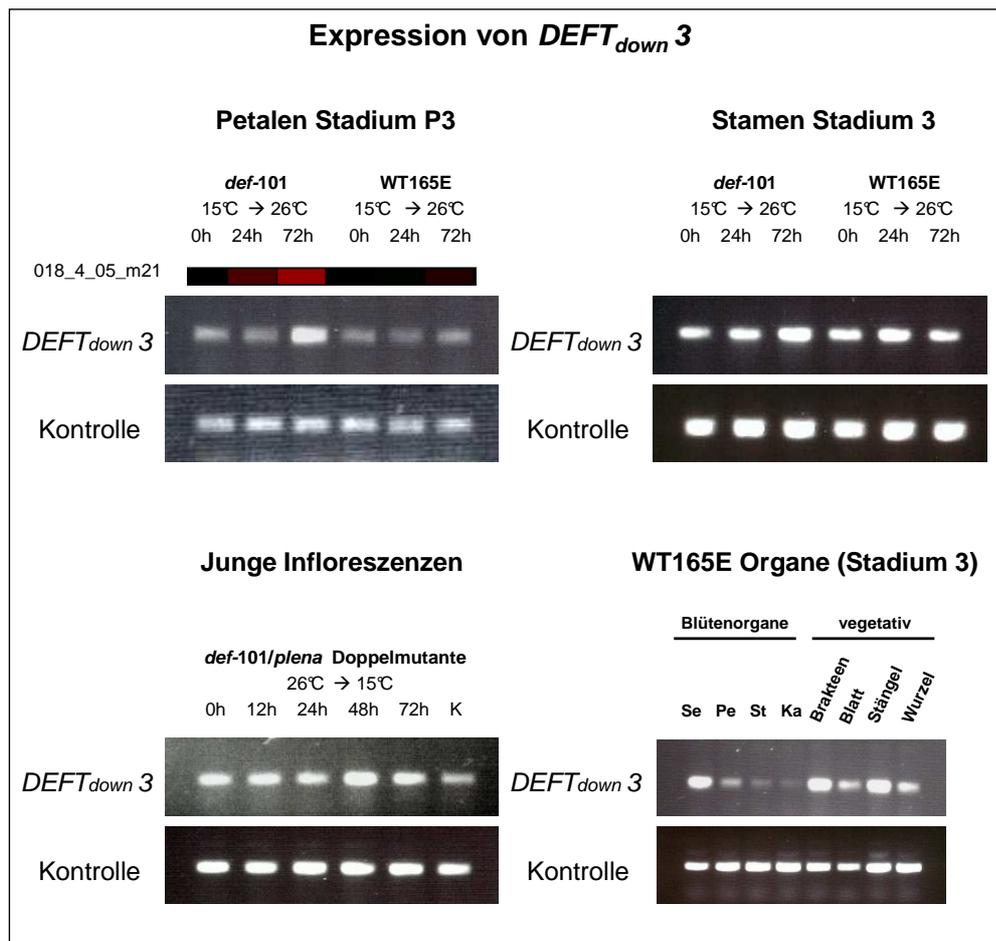


Abbildung 3-25

3.3.3.8 Expression von *DEFT_{down 4}* (PAP-ähnliches Gen)

Auch die Expression des letzten detailliert untersuchten reprimierten DEF-Zielgens ist vornehmlich in Organen mit hoher Photosyntheseaktivität zu beobachten. In diesem Falle zeigt sich eine starke Expression in Brakteen, Blättern und Sepalen gegenüber einer schwachen Expression in allen übrigen Organen des Wildtyps (Abb. 3-26). Wie schon in Abb. 3-18 gezeigt, ist die Expression von *DEFT_{down 4}* kontinuierlich während der Petalenentwicklung P1-P4 reprimiert im Vergleich zu den Sepalen. Die RT-PCR-Analysen aller drei induzierbaren Testsysteme zeigen im Falle der *def-101* Petalen und Stamina deutlich und in den Infloreszenzen etwas schwächer, dass die Expression von *DEFT_{down 4}* von DEF reprimiert wird.

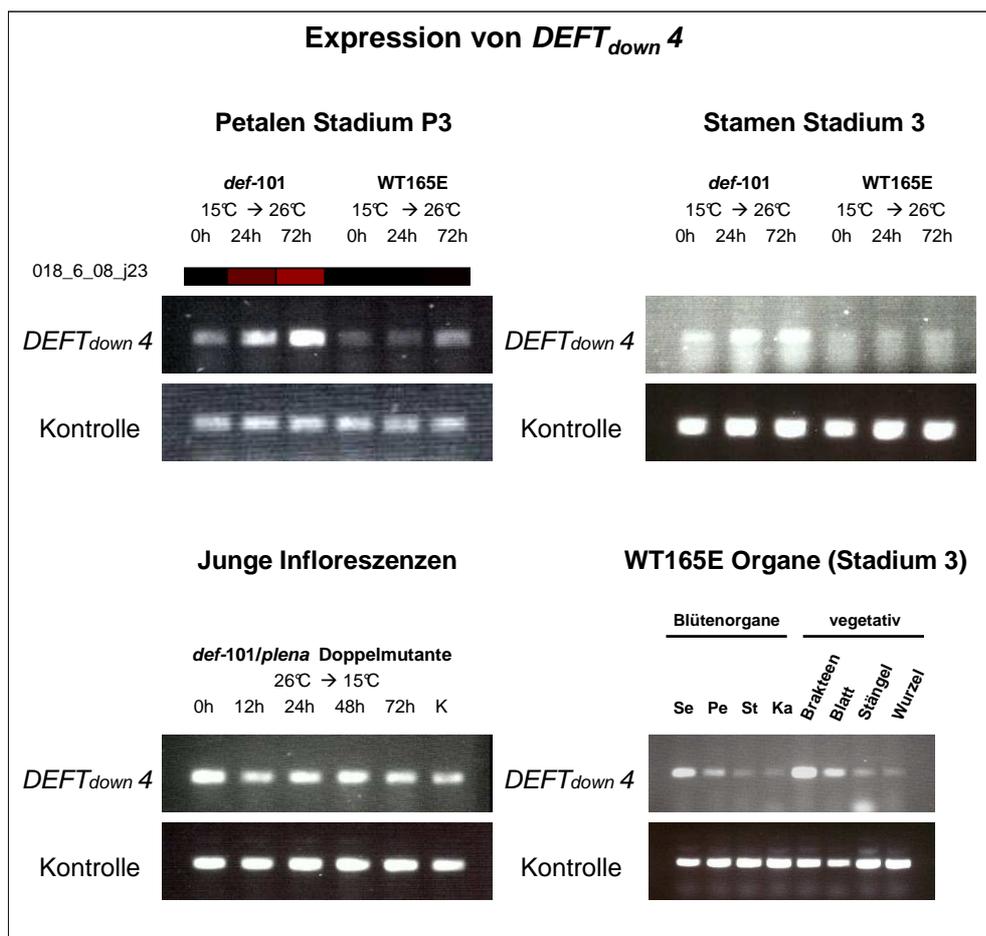


Abbildung 3-26

Zusammenfassend kann über die detaillierten Expressionsstudien der sechs neuen DEF-Zielgene gesagt werden, dass neben der Regulation durch DEF in Petalen P3 der *def-101* Mutante für vier dieser Gene eine gleichartige Regulation durch DEF in behandelten Stamina des Stadiums 3 und außerdem für fünf Gene eine Expressionsveränderung in jungen Infloreszenzen der *def-101/plena* Doppelmutante in Folge einer modifizierten DEF-Funktion nachgewiesen werden konnte. Bei fünf dieser Zielgene ist die Auswirkung der DEF-Funktion auf die Transkriptionskontrolle in allen Testsystemen gleich, nur im Falle der *Beta Glukosidase (DEFTdown 2)* zeigt sich zwischen den frühen und späten Entwicklungsstadien der Petalen eine qualitative Umkehrung der Regulationstendenz durch DEF.

3.4 Charakterisierung der Genstruktur einiger DEF-Zielgene

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die transkriptionelle Regulation der ausgewählten DEF-Zielgene nachgewiesen und detaillierte Expressionsstudien mit ihnen durchgeführt wurden, erfolgte in diesem Teil der Arbeit die Isolierung und Charakterisierung von Promotorfragmenten der vielversprechendsten Kandidaten. DEFICIENS und GLOBOSA binden bekanntermaßen als Heterodimer-Proteinkomplex an regulative Sequenzen in den Promotorregionen ihrer direkten Zielgene (siehe Einleitung; Kapitel 1.3). Die Kenntnis der genomischen DNA-Sequenz der Promotorregionen der DEF-Zielgene ermöglicht die Identifizierung von CA_rG-Box- oder anderen Bindungsmotiven, welche Hinweise auf direkte Interaktionsmöglichkeiten mit Transkriptionsfaktoren liefern.

Da *Antirrhinum majus* bislang noch nicht vollständig sequenziert ist, können die gewünschten Promotorinformationen nicht einfach *in silico* aus Sequenzdatenbanken extrahiert werden. Hier werden deshalb mit Hilfe der RAGE Technik (rapid amplification of genomic ends; (Cormack & Somssich, 1997) genomische DNA-Fragmente in Nachbarschaft von bekannten DNA-Sequenzen isoliert (siehe Material & Methoden Kapitel 2.5.3).

3.4.1 Isolierung von Promotorfragmenten der ausgewählten Zielgene mittels RAGE Technik

Die Isolierung genomischer DNA-Bereiche mit Hilfe des PCR-gestützten RAGE-Verfahrens wurde für alle in Tabelle 7 aufgelisteten DEF-Zielgene durchgeführt. Die dafür benutzten Adapter-Ligationsansätze genomischer DNA von *Antirrhinum majus* (WT165E) wurden freundlicherweise von Dr. Jong Hee Kim zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen der Gen-spezifischen Primer wurden von den 5'-Bereichen der bekannten cDNA-Sequenz des jeweiligen Gens abgeleitet. Dies geschah so, dass die zu isolierenden genomischen DNA-Fragmente überlappende Sequenzbereiche mit der bekannten EST-Sequenz hatten, anhand derer sie später überprüft werden konnten. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang (Kapitel 7.2.3) aufgeführt. Als *template* für die ersten

linearen PCRs wurden Adapter-Ligationsansätze benutzt, deren genomische Fragmente aus einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI oder *Eco*RV stammten. In den folgenden zwei verschachtelten PCR-Reaktionen wurden 1:50 Verdünnungen der vorhergehenden PCR-Reaktion als template eingesetzt.

Für alle sechs DEF-Zielgene wurden genomische DNA-Fragmente isoliert, deren Größen zwischen 600 und über 2800 Bp variieren. Sie wurden mit Hilfe des TOPO TA[®] Klonierungssystems (siehe Kapitel 2.6) kloniert und ihre DNA-Sequenzen ermittelt. Die Sequenzen der Promotorfragmente befinden sich im Anhang (Kapitel 7.1), eine schematische Übersicht ist in Abb. 3-27 dargestellt.

3.4.2 Sequenzmotivanalyse der isolierten Promotorregionen

Um Hinweise auf mögliche Binderegionen für transkriptionelle Regulatoren zu bekommen, wurden die in 3.4.1 isolierten genomischen DNA-Fragmente einer Sequenzmotivanalyse unter Nutzung der PLACE-Datenbank (Plant cis-acting regulatory DNA elements) unterzogen (Higo *et al.*, 1999). Von besonderem Interesse waren dabei CArG-Box-Motive, die mehrfach als Bindestelle für MADS-Box Transkriptionsfaktoren nachgewiesen wurden (Tröbner *et al.*, 1992; Riechmann *et al.*, 1996; Egea-Cortines *et al.*, 1999; Tang & Perry, 2003).

Abbildung 3-27 stellt eine schematische Übersicht der isolierten genomischen Fragmente der DEF-Zielgene und den darin befindlichen CArG-Box-Elementen dar. Es wurden zwei unterschiedliche CArG-Motive markiert, zum einen die „klassische“ CArG-Box „CX (A/T)₆ GX“ (Typ1), welche z.B. von den CArG-Boxen 1 und 3 des *GLO* Promotors und der CArG-Box des DEF Promotors repräsentiert wird. Zum anderen ein CArG-Motiv „C (A/T)₈ G“ (Typ2) welches als Bindestelle des MADS-Box Transkriptionsfaktors AGL15 beschrieben wurde (Tang & Perry, 2003).

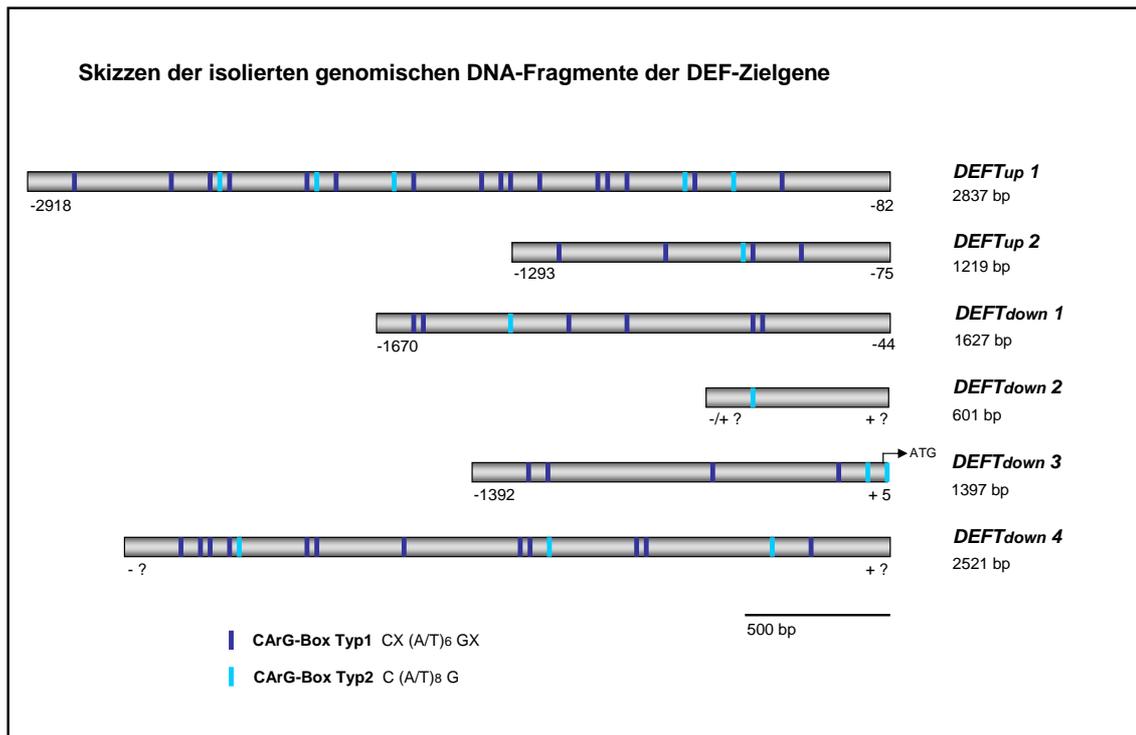


Abb. 3-27 Schematische Darstellung der isolierten genomische DNA-Fragmente der ausgewählten DEF-Zielgene mit den darin befindlichen CarG-Box-Motiven

Zwei unterschiedliche Typen von CarG-Boxen sind gemäß ihren ungefähren Positionen innerhalb der genomischen DNA-Fragmente skizziert. Die Positionsinformationen beziehen sich auf die Entfernung zum Translationsstartpunkt (→ ATG). ? = Position bzw. Translationsstartpunkt unklar

Die Sequenzanalyse der Promotorbereiche ergab, dass in jedem untersuchten DNA-Fragment CarG-Box-Elemente vorhanden waren (siehe Abb. 3-27). In einigen Fällen kommen sie gehäuft in benachbarten Sequenzbereichen vor, was ein Hinweis auf eine eventuelle regulative Funktion dieser Regionen ist (Egea-Cortines *et al.*, 1999).

Das über 2800 Basenpaare (Bp) lange Promotorfragment von *DEFTup 1* (*Extensin*-ähnliches Gen) enthält neben insgesamt 21 CarG-Motiven noch zahlreiche andere pflanzenspezifische Cis-Elemente (HD-Zip-Motiv, Bindestelle für MYB-ähnlichen TF, b-Zip TF Bindestelle, GT1-Bindestelle, WRKY-Bindestelle), die hier aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet wurden. Auf einige von ihnen wird in einer detaillierteren Ansicht partieller Bereiche des genomischen DNA-Fragments im nächsten Kapitel eingegangen (siehe Abb. 3-28). Der von *DEFTup 2* (*Alpha Tubulin*) isolierte Promotorbereich, enthält in knapp über 1200 Bp vier CarG-Boxen des Typ 1 und eine des zweiten Typs. Ansonsten wurden keine weiteren interessanten regulatorischen Elemente gefunden. Auch das 1627 Bp lange genomische DNA-Fragment der *RuBisCO Aktivase* (*DEFTdown 1*) weist neben den insgesamt sieben CarG-Motiven keine weiteren interessanten cis-aktive Ele-

mente auf. Das gleiche gilt für die klonierten Promotorbereiche von *DEFTdown 3* und *4*. Die 1397 Bp bzw. 2521 Bp langen genomischen DNA-Sequenzen enthalten sechs bzw. fünfzehn CARG-Motive. Bei dem genomischen DNA-Fragment welches von *DEFTdown 2* isoliert wurde, konnte der Translationsstart nicht eindeutig angegeben werden, da ein beträchtlicher Teil der Sequenz im 5' Bereich der cDNA des EST-Klons fehlt. Das hier verfügbare genomische Fragment enthält neben einer CARG-Box des Typs 2 eine Bindestelle für Pflanzen-spezifische *MYB*-Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 3-28 nächstes Kapitel).

3.5 Test auf direkte Bindung der isolierten Promotorregionen einiger DEF-Zielgene durch das DEFICIENS Protein

Nachdem in dem vorangegangenen Kapitel Promotorbereiche der DEF-Zielgene, die Hinweise auf eine direkt durch DEF vermittelte Regulation zeigten isoliert und ihre Sequenzen in Bezug auf cis-aktive Elemente analysiert wurden, wird in diesem Abschnitt der Arbeit mittels der X-ChIP-Methode getestet, ob eine direkte Interaktion des DEF Proteins mit den Promotorbereichen der ausgewählten Zielgene vorliegt.

Die X-ChIP Technik bietet die Möglichkeit, die *in vivo* Assoziation von Proteinen an genomischen DNA-Sequenzen zu überprüfen (Orlando, 2000). Dazu werden Protein/DNA-Komplexe aus frisch geerntetem Pflanzenmaterial mittels Formaldehyd reversibel fixiert und das so behandelte Chromatin in kleine Stücke (0.4 - 4 kB) geschert. In einer dann folgenden Immunopräzipitation mit anti-DEF Serum werden Protein/DNA-Komplexe die das DEFICIENS Protein enthalten immunopräzipitiert. Als Negativkontrolle wird der gleiche Versuch mit dem Präimmunserum durchgeführt. Nach Revertierung der Fixierung, werden Proteine und RNA-Moleküle verdaut und die aufgereinigte DNA weiter analysiert.

In den dazu durchgeführten Experimenten erfolgten PCR-Analysen mit den isolierten genomischen DNA-Fragmenten aus X-ChIP-Experimenten, welche jeweils mit anti-DEF Serum im Vergleich zu Präimmunserum (Negativkontrolle) durchgeführt wurden. Damit konnten spezifisch angereicherte Promotorfragmente nachgewiesen werden. Der dazugehörige experimentelle Teil der Arbeit, insbesondere die unter 3.5.3 beschriebenen Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit Bettina Müller durchgeführt, welche die hierfür verwendete X-ChIP-Methode (*crosslinked-chromatin immunoprecipitation*) in der Arbeitsgruppe etabliert hat.

3.5.1 Auswahl der zu testenden Promotorregionen

In ihrer Doktorarbeit konnte Bettina Müller nachweisen, dass Bereiche des *DEFICIENS* und des *GLOBOSA* Promotors, welche CARG-Box-Motive umspannten, in den aufgereinigten DNA-Fractionen aus X-ChIP-Experimenten mit *Antirrhinum majus* angereichert sind. Das galt sowohl für Immunopräzipitationen die mit α -DEF Serum durchgeführt wurden, als auch für diejenigen bei denen α -GLO Serum benutzt wurde. Dies war der erste Beweis für die direkte *in vivo* Interaktion der DEF und GLO Proteine mit ihren eigenen Promotoren.

Die als positiv getesteten Sequenzbereiche umspannten im Fall von *GLOBOSA* die CARG-Boxen 2 und 3 (ca. 100 – 200 Bp vor dem Translationsstartpunkt) (Tröbner *et al.*, 1992) und im Fall von *DEFICIENS* den Bereich um die SRF CARG-Box ca. 1300 Bp vor dem Translationsstartpunkt (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992).

Für die Analysen der Promotorregionen der in dieser Arbeit isolierten DEF-Zielgene wurden Fragmente aus Bereichen genomischer DNA gewählt, die nicht weiter als 2 kB stromaufwärts des Startkodons liegen. Außerdem wurden solche Bereiche bevorzugt, in denen sich CARG-Motive befinden.

3.5.2 Entwurf und Test Gen-spezifischer Promotorprimer

Die Gen-spezifischen Primer wurden unter Benutzung der isolierten genomischen DNA-Fragmente der DEF-Zielgene so gewählt, dass sie Sequenzbereiche von 300-600 Bp Länge umspannten. Im Durchschnitt waren sie 26-30 Nukleotide lang und wiesen einen GC-Gehalt von 38-56% auf. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt und ihre Lage innerhalb des analysierten DNA-Fragments in Abbildung 3-28 schematisch dargestellt.

Die Primer-Qualität wurde in PCR-Reaktionen mit genomischer WT165E-DNA aus *A. majus* als *template* getestet. Nur diejenigen Primer-Kombinationen, deren Fragment mit

einer Signalstärke amplifiziert werden konnte die vergleichbar mit denen der GLO Fragmente war, wurden für die X-ChIP-PCR-Analysen eingesetzt.

3.5.3 X-ChIP-PCR-Analysen mit ausgewählten Promotorfragmenten der DEF-Zielgene

Für die X-ChIP-PCR-Analysen wurden als *template* die aufgereinigten genomischen DNA-Fragmente eingesetzt, welche aus X-ChIP-Experimenten mit Wildtyp Pflanzen stammten bei denen die Immunopräzipitation mit einem polyklonalen α -DEF Serum (aus Kaninchen) durchgeführt wurde. Als Ausgangsmaterial der Versuche dienten Petalen P3 oder Stamen des Stadiums 3 des *A. majus* Ecotyps WT165E, angezogen unter Gewächshaus- oder Freilandbedingungen.

Jedes X-ChIP-Experiment beinhaltete zwei parallel laufende Ansätze: bei der einen Immunopräzipitation wurde das spezifische Anti-Serum des gewünschten Proteins (DEFICIENS) eingesetzt, bei der anderen das unspezifische Präimmunserum (Negativkontrolle). Wird mit beiden DNA-Proben eine X-ChIP-PCR-Analyse durchgeführt, so erkennt man im Falle einer direkten Interaktion des untersuchten Proteins mit dem amplifizierten Promotorbereich eine deutliche Anreicherung des PCR-Produkts im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle.

In den X-ChIP-PCR-Reaktionen wurde als *template* jeweils 4% der aus einem standardisiert durchgeführten Immunopräzipitations-Experiment erhaltenen DNA-Menge eingesetzt. Neben der internen Negativkontrolle (Präimmunserum IP) wurden zusätzlich eine positive PCR-Kontrolle mit 10 ng genomischer Wildtyp-DNA und eine negative PCR-Kontrolle mit sterilem H₂O durchgeführt.

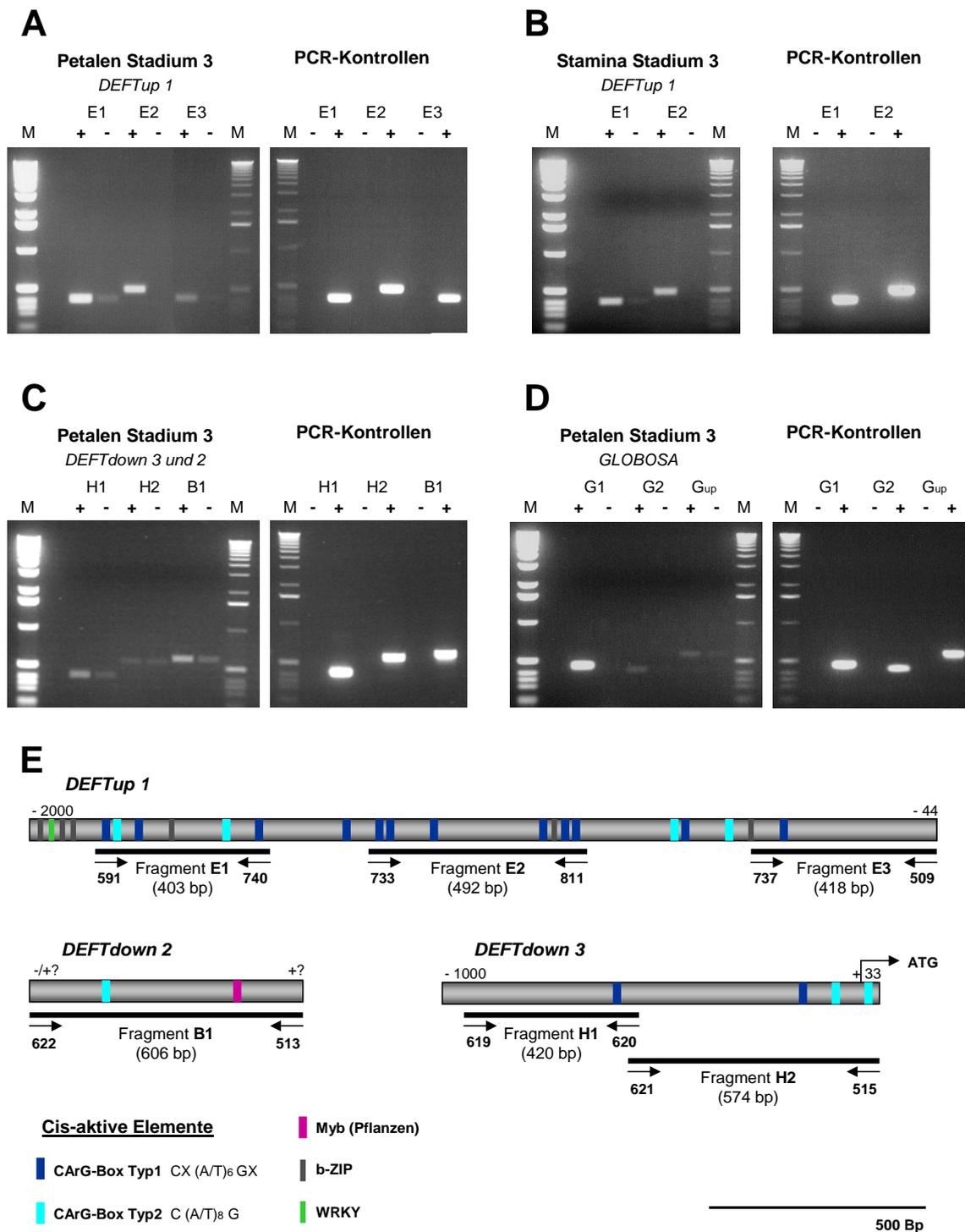


Abb. 3-28 X-ChIP-PCR-Analysen mit genomischen Fragmenten dreier DEF-Zielgene

(A-C): Gelelektrophoresen der mit genomischen Primerpaaren von drei DEF-Zielgenen durchgeführten X-ChIP-PCRs. (D): Gelelektrophoresen der mit Promotorprimerpaaren von *Globosa* durchgeführten X-ChIP-PCRs zum Vergleich. (+ = anti-DEF Serum; - = Präimmunsereum bzw. bei den PCR-Kontrollen: + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle)

Die X-ChIP-PCR-Reaktionen wurden mit jeweils 4% der aus Immunopräzipitations-Experimenten mit Petalen P3 (A,C,D) oder Stamen Stadium 3 (B) stammenden DNA als *template* durchgeführt. Für die PCR-Kontrollen wurden 10 ng genomische DNA (WT165E) bzw. steriles H₂O als *template* genommen. Alle PCR-Reaktionen wurden mit 58°C Primeranlagerungstemperatur, 1 min Synthesezeit und 34 Zyklen durchgeführt.

(E): Schematische Skizze der getesteten genomischen Regionen der DEF-Zielgene mit Lage der Primer und der cis-aktiven Elemente.

(Die hier gezeigten X-ChIP-PCR-Analysen wurden von Bettina Müller durchgeführt.)

Anhand der X-ChIP-PCR-Analysen des *GLO* Promotors (Abb. 3-28, D) sieht man eine starke und eindeutige Anreicherung des Fragments G1, welches die ersten beiden CARG-Motive (CARG 2 und 3) des *GLO* Promotors stromaufwärts des Translationsstartpunkts beinhaltet. Bei den zwei weiteren getesteten genomischen Fragmenten dieses Promotors, die stromaufwärts der G1-Region liegen und nur ein CARG-Motiv (CARG 1, Fragment G2) bzw. keine CARG-Motive enthalten (G_{up}) ist keine deutliche Anreicherung in den mit α -DEF Serum durchgeführten Immunopräzipitations-Experimenten zu beobachten (mit freundlicher Genehmigung von B. Müller).

Die ebenfalls in Abbildung 3-28, (A-C) gezeigten Ergebnisse der mit genomischen Primerpaaren drei DEF-Zielgene *DEFTup 1* (Extensin-ähnliches Gen), *DEFTdown 2* (Beta Glukosidase) und *DEFTdown 3* (Hypothetisches Gen) durchgeführten X-ChIP-PCR-Analysen wurden jeweils mit den Ergebnissen der Analyse des *GLO* Promotors verglichen. Die Fragmente E1 und E2 sind in beiden DNA-Fractionen aus X-ChIP-Experimenten, durchgeführt mit Petalen P3 bzw. Stamina des Stadiums 3, verglichen mit den DNA-Fractionen der internen Negativkontrolle angereichert (Abb. 3-28, A und B). Das weiter stromabwärts lokalisierte Fragment E3 zeigt im Vergleich zu den beiden anderen Fragmenten nur eine schwache Reaktion. Verglichen mit der Stärke der Anreicherung des *GLO*-Fragments G1, ist die Reaktion mit dem Fragment E1 fast vergleichbar, die des Fragments E2 etwas schwächer.

Das genomische Fragment H1 von *DEFTdown 3* (Abb. 3-28, C) ist in den DNA-Fractionen aus X-ChIP-Experimenten mit Petalen P3 im Vergleich zu dem *GLOBOSA*-Fragment G1 nur sehr schwach angereichert. Die Stärke der Reaktion liegt kaum über der des nicht angereicherten Fragments G_{up} (Abb. 3-28, D). Bei den Banden des weiter stromabwärts liegenden Fragment H2 ist kein quantitativer Unterschied zwischen Experiment und Kontrolle zu erkennen (Abb. 3-28, C).

Das Fragment B1 (*Beta Glukosidase*) zeigt ebenfalls nur eine leicht stärkere Amplifikation in der PCR-Reaktion, welche die mit Hilfe von α -DEF Serum isolierte X-ChIP-DNA als *template* hatte (Abb. 3-28, C). Dieses Ergebnis welches mit einem genomischen Fragment erzielt wurde, dass größtenteils stromabwärts des Translationsstartpunkts von *DEFTdown 2* lokalisiert ist, kann für nachfolgende Experimente als Hinweis, nicht aber als eine eindeutige Anreicherung gewertet werden.

In diesem Kapitel wurden sechs genomische DNA-Fragmente von drei neuen DEF-Zielgenen auf eine direkte *in vivo* Interaktion mit dem DEF Protein getestet. Für zwei Fragmente des *Extensin*-ähnlichen Gens (E1 und E2, Abb. 3-28) konnte eine Assoziation des Transkriptionsfaktors mit der genomischen DNA dieser Promotorbereiche nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die X-ChIP-Methode das Potential besitzt direkte Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Zielgenen nachzuweisen.

3.6 Weitere Aspekte der Expressionsanalyse der EST-Kollektion

Ein interessanter Aspekt von Expressionsprofil-Experimenten mit großen Datensets ist die Möglichkeit, die verfügbaren Daten auf Gene mit invariantem Expressionsniveaus in möglichst allen Bedingungen zu untersuchen. Die Identifizierung von „Haushaltsgenen“, erlaubt diese als Kontrollen für Expressionsstudien wie RT-PCRs oder Northern-Analysen einzusetzen. Des Weiteren können sie als interne Kontrollgene zur Normalisierung von Array-Experimenten genutzt werden, vor allem dann, wenn die Anzahl der DNA-Elemente auf dem Filter zu gering für eine globale Normalisierung über alle Elemente ist. Aufgrund der Ergebnisse vieler Mikro- oder Makroarray-Expressionsstudien wurde bei vielen klassischen Haushaltsgenen eine Expressionsregulierung in bestimmten Geweben oder nach gewissen Behandlungen festgestellt, was ihre Verwendbarkeit als Kontrollgene einschränkt. Gleichmaßen wurden jedoch viele neue Gene mit invarianter Expression durch die Kombination von Ergebnissen verschiedener Expressionsprofil-Experimente entdeckt. Die in dieser Arbeit ermittelten invarianten Gene werden in Kapitel 3.6.1 vorgestellt.

Der Weiteren werden in Kapitel 3.6.2 die temperatursensitiven ESTs aufgelistet und in Ansätzen funktionell betrachtet.

3.6.1 ESTs mit invariantem Expressionsniveau

Zur Ermittlung von invarianten ESTs wurden die Datensätze der Makroarray-Expressionsstudien aus den Kapiteln 3.1.2, 3.2.2 und 3.6.1.1 dieser Arbeit in Kombination genutzt. Die im weiteren Verlauf als invariant bezeichneten Gene mussten folgende Kriterien erfüllen:

1. Sie mussten in allen 3 Expressionsprofil-Experimenten exprimiert sein.
2. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung durften die Abweichungen der Expressionsniveaus in allen Bedingungen nur zwischen 0.97 – 1.03 betragen (Ausschlußkriterium)

Die Datensätze der drei in dieser Arbeit durchgeführten Makroarray-Expressionsstudien wurden zunächst für sich betrachtet und danach in allen möglichen Kombinationen auf invariante ESTs untersucht. Das Venn-Diagramm in Abbildung 3-29 stellt die Anzahlen der als invariant definierten ESTs dar. Auffällig ist die von vorneherein geringe Anzahl von 57 invarianten ESTs in dem Expressionprofil-Experiment „Wildtyp Stadien“ (Kapitel 3.1.2), gegenüber den 914 bzw. 1163 invarianten ESTs in den Makroarray-Experimenten „*def-101* P3“ (Kapitel 3.2.2) bzw. „WT P3“ (Kapitel 3.6.1.1). Anders als bei den letztgenannten Expressionsstudien („*def-101* P3“ und „WT P3“) wurden im ersten Experiment die Transkriptome sowohl verschiedener Entwicklungsstadien, als auch unterschiedlicher Organe verglichen. Dadurch werden die Anzahlen der in allen Bedingungen nicht regulierten ESTs enorm reduziert. Wurden die Daten einer der beiden organ- und stadienspezifischen Expressionsstudien mit denen der „Wildtyp Stadien“ kombiniert, so befanden sich die Anzahlen der invarianten ESTs mit 21 bzw. 27 in der gleichen Größenordnung. Nach einer Kombination aller drei Datensätze blieben elf ESTs übrig, die unter allen in dieser Arbeit vorgestellten Bedingungen eine invariante Expression aufwiesen.

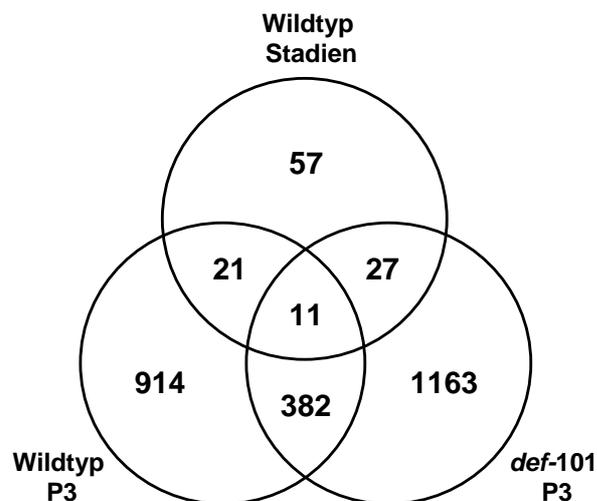


Abb. 3-29 Venn-Diagramm der invarianten ESTs aus drei Expressionsprofil-Experimenten
 Angegeben sind jeweils die Gesamtzahlen der Schnittmengen.

In Tabelle 8 sind die elf invarianten ESTs aus allen drei Expressionsprofil-Experimenten aufgelistet. Neben zwei Proteinasen befinden sich unter ihnen vier Gene, die funktionell an Translationsprozessen beteiligt sind.

EST-Nummer	„WT Stadien“				„ <i>def</i> -101 P3“		„WT P3“		BLAST-Homologie
	P1	P2	P3	P4	24h	72h	24h	72h	
018_1_02_o08	0.99	1.00	1.00	0.99	1.01	1.03	1.01	1.01	Translations Inhibitor
018_2_02_116	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	1.00	0.98	0.98	Translations Elongationsfaktor eEF-1 gamma
018_2_03_i04	1.00	1.02	1.01	1.02	0.98	1.00	0.99	1.01	exprimiertes Protein
018_4_10_g05	1.00	1.03	0.98	1.01	0.98	1.00	1.01	1.00	Glutaredoxin
018_5_01_f14	1.00	0.99	0.99	1.02	0.99	0.99	1.00	1.01	14-3-3 Protein Homolog
018_5_02_b03	1.00	1.00	1.01	1.00	0.97	0.97	1.00	0.98	ABC Transporter (ATP bindend)
018_5_11_e08	0.99	1.00	0.98	1.02	0.99	0.98	0.98	0.99	Clp Proteinase (ATP-abhängig)
018_6_01_b20	1.02	1.01	1.01	1.03	0.98	0.99	1.01	1.02	Peptidase (Chloroplast, thylakoidal)
018_6_01_015	1.01	1.00	0.97	1.00	0.99	0.99	1.01	0.98	ähnlich zu Phosphatidylinositol transferierendem Protein III
018_6_01_p15	1.02	1.02	0.99	1.03	0.99	1.00	0.97	0.98	Translations Initiationsfaktor 6
018_6_03_j20	1.01	1.01	0.98	1.02	1.00	1.03	0.99	1.02	Zink-Finger Protein

Tabelle 8 Invariante ESTs aus drei Expressionsprofil-Experimenten

Die hier aufgeführten ESTs sind unter allen Bedingungen exprimiert und zeigen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung eine Abweichung im Expressionsniveau, die zwischen 0.97 und 1.03 beträgt. Neben den Makroarray-Ratios sind die Ergebnisse der Sequenzvergleiche gegen alle bekannten Proteine angegeben.

3.6.2 Temperatursensitive ESTs in Wildtyp Pflanzen

Im Zuge der Isolierung von DEF-Zielgenen aus adulten Petalen der *def*-101 Mutante (siehe Kapitel 3.2.2) wurde parallel das gleiche Expressionsprofil-Experiment mit Petalen P3 von identisch kultivierten und behandelten Wildtyp Pflanzen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte analog und zu dem in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Expressionsprofil-Experiment und. Signifikant (Ausschlußkriterium 1.2) regulierte ESTs aus WT-Petalen P3, welche für null, 24 oder 72 Stunden einer Temperaturerhöhung von elf Grad Celsius ausgesetzt waren, wurden ermittelt und dieser Datensatz mit dem der DEF-Zielgene aus späten Petalen P3 verglichen (siehe Kapitel 3.2.2).

Insgesamt reagieren in adulten Wildtyp-Petalen 83 ESTs signifikant auf die Temperaturänderung, die Expression von 40 von ihnen wird dabei in mindestens einer Bedingung hoch reguliert, die von 44 von ihnen entsprechend reprimiert. Ein EST (018_6_08_j11) zeigt eine so starke Expressionsdynamik innerhalb der untersuchten 72h, dass er sowohl zum Set der signifikant aktivierten, als auch der signifikant reprimierten ESTs zählt. Dieses Gen wird zunächst nach 24h signifikant (1.31 fach) aktiviert und erfährt dann eine so starke Reduktion der Expression, dass das Expressionsniveau nach 72h signifikant unter dem Ausgangsniveau der Kontrolle (0h) liegt.

Eine detaillierte Aufspaltung der regulierten ESTs zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist in Tabelle 9 dargestellt. Während das Verhältnis von aktivierten und reprimierten ESTs nach 24h noch recht ausgeglichen ist, sind fast 60% der nach 72h regulierten ESTs in ihrem Expressionsniveau reduziert.

	aktiviert	reprimiert
Regulierte ESTs nach 24h	21	23
Regulierte ESTs nach 72h	30	42

Tabelle 9 Regulierte ESTs in WT-Petalen P3 nach Temperaturerhöhung

Aufgeführt sind alle in WT Petalen P3 exprimierten und nach einer Temperaturerhöhung von 24h bzw. 72h signifikant regulierten ESTs. Aktivierte ESTs zeigen ein erhöhtes Expressionsniveau im Vergleich zur Kontrollbedingung, reprimierte ESTs dementsprechend ein reduziertes.

Ein Hierarchisches Cluster der 83 in WT Petalen P3 auf Wärme reagierenden ESTs mit ihren BLAST-Homologien zu bekannten Proteinen ist im Anhang dargestellt. Unter den in ihrer Expression hochregulierten ESTs befinden sich Ionenkanalproteine, Hitzeschock-Proteine und Enzyme des Anthocyanstoffwechselwegs. Unter den ESTs, welche in ihrer Expression reprimiert werden befinden sich Enzyme diverser Biosynthesen und das Kältestressprotein SRC1.

4 Diskussion

4.1 Petalenentwicklung in *Antirrhinum majus*

4.1.1 Während der Petalenentwicklung von *A. majus* werden mindestens ein Fünftel der exprimierten Gene reguliert

Zur Untersuchung der Petalenentwicklung von *A. majus* wurde diese anhand morphologischer Merkmale in vier definierte Stadien (P1 bis P4, siehe Kapitel 3.1.1) eingeteilt und damit ein Expressionsprofil-Experiment im Vergleich zu Sepalen durchgeführt. Dies erlaubte einerseits eine Charakterisierung der Genregulation innerhalb später Differenzierungsphasen der Petalenentwicklung und ermöglichte andererseits die Auswahl des am besten zur Isolierung von DEF-Zielgenen geeigneten Petalenstadiums.

Aus den Genexpressionsanalysen der Wildtyp Petalenentwicklung geht hervor, dass 20 Prozent (537 von 2858) der in diesen Entwicklungsphasen exprimierten ESTs eine signifikant differentielle Expression (Ausschlußkriterium 1.2 fach) in mindestens einem Petalenstadium gegenüber Sepalen aufweisen. Da mit unabhängigen Methoden auch Gene als differentiiell bestätigt werden konnten, deren Abweichungen in den Makroarray-Studien geringer als 1.2 fach waren, wird Anteil regulierter Gene innerhalb der Petalenentwicklung vermutlich noch höher sein. Expressionsprofil-Experimente in denen andere Gewebedifferenzierungsprozesse wie die Xylogenese im vaskulären System von Pappeln untersucht wurden ergaben, dass über 40% der aus Pappeln isolierten ESTs innerhalb verschiedener Entwicklungsphasen des vaskulären Systems differentiiell reguliert werden (Hertzberg *et al.*, 2001). Eine andere Studie in der das männliche gametophytische Transkriptom von *A. thaliana* betrachtet wurde zeigte, dass nur 13% der analysierten Gene (Arabidopsis 8K GeneChip) in Pollen exprimiert werden, davon aber 40 % Pollenspezifisch sind (Honys & Twell, 2003). Ein direkter Vergleich der Anzahlen regulierter Gene in den dargestellten Gewebedifferenzierungsprozessen ist schwierig, da sich sowohl die Fragestellungen der Versuche, als auch die jeweils angewandten experimentellen Pa-

parameter unterscheiden. Jedoch kann man aus diesen Beobachtungen ableiten, dass die transkriptionelle Regulationsaktivität mit zunehmender Komplexität der untersuchten Gewebe steigt. Sowohl das vaskuläre System (40% Regulation) als auch die Petalen (20% Regulation) besitzen verschiedene spezialisierte Zellen und wiesen daher deutlich mehr differentiell exprimierte Gene auf als ein einzelner untersuchter Zelltyp wie Pollen (13% Regulation).

Die im weiteren Verlauf dieses Kapitels diskutierten Ergebnisse der Stadien-spezifischen Genexpressionsanalysen der Petalenentwicklung von *A. majus* unterstützen die Beobachtungen, dass die meisten der zwischen zwei Organen differentiell exprimierten Gene unter einer strikten Entwicklungsstadien-spezifischen transkriptionellen Kontrolle während der Organogenese stehen (Hertzberg *et al.*, 2001).

Funktionell betrachtet weisen die BLAST-Homologien der insgesamt regulierten Gene nach Vergleichen zu bekannten Sequenzen aus *A. thaliana* bzw. anderen Spezies darauf hin, dass die Regulation der Petalenentwicklung komplex ist und ein großes Spektrum an Stoffwechselprozessen beeinflusst wird. Dabei werden auffallend viele Gene differentiell in Sepalen und Petalen reguliert, die den Kategorien Photosynthese, Metabolismus, Zellabwehr, Kontrolle der zellulären Organisation oder Transport zuzuordnen sind. Auch die Resultate anderer Studien belegen, dass der größte Teil der etwa 2000 aus Rosen Petalen isolierten ESTs in die funktionellen Kategorien Zellabwehr (Stressantwort) und Membran-assoziierte Proteine (Zellwandmetabolismus) eingeordnet werden können (Channelière *et al.*, 2002; Guterman *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit zeigen detailliertere Untersuchungen der 537 regulierten ESTs, dass 98% von ihnen entweder überwiegend in Sepalen oder in Petalen exprimiert sind, nur 2% zeigen innerhalb der Petalenentwicklung eine so starke Expressionsdynamik, dass sie in mind. einem Petalenstadium reprimiert und in mind. einem anderen im Vergleich zum Expressionsniveau der Sepalen aktiviert werden. Aussagen über eine wirkliche Organspezifität dieser 526 ESTs können jedoch erst getroffen werden, nachdem ihre Expression in anderen Blütenorganen (Stamina, Karpelle) und in vegetativen Organen dokumentiert worden ist.

Von den insgesamt 322 innerhalb der Petalendifferenzierung hochregulierten ESTs zeigen 311 eine hohe Expressionsdynamik zwischen den definierten Petalenstadien, die oft mit

einer Stadien-spezifischen Expression einhergeht. Besonders deutlich lässt sich diese in den späten Petalenstadien P3 und P4 beobachten, wo mehr als die Hälfte der insgesamt 280 in diesen beiden Stadien aktivierten ESTs Stadien-spezifisch in nur einer dieser beiden Differenzierungsphasen reguliert werden. Eine Expressionsstudie aus dem Jahr 2001 mit einem kleinen Datensatz speziell ausgewählter ESTs aus Rosen Petalen zeigte, dass bei einem Vergleich zwischen jungen (entspricht P1) und sehr späten Petalenstadien (entspricht P4) 25% der Gene stark aktiviert und 5 % stark reprimiert werden (Guterman *et al.*, 2001). Hier in dieser Arbeit konnte für *A. majus* detailliert gezeigt werden, dass der größte Teil der Regulationsaktivität innerhalb der Petalendifferenzierung spezifisch in den späten Entwicklungsphasen (P3 und P4) stattfindet. Die dabei im speziellen regulierten Stoffwechselwege werden genauer in den Kapiteln 4.1.3.2 und 4.1.3.3 diskutiert.

Neben den vielen Stadien-spezifisch regulierten EST gibt es 11 ESTs die während den untersuchten Entwicklungsphasen kontinuierlich in allen Petalenstadien signifikant aktiviert sind. Die 9 von ihnen repräsentierten Gene umfassen den Transkriptionsfaktor *GLOBOSA*, *Lipid Transfer Protein* Gene, *CER1* und ein *CER1*-ähnliches Gen, ein Gen für eine Methionyl-tRNA-Synthetase, ein *Calmodulin*-ähnliches Gen und ein hypothetisches Gen. Bezüglich der gemessenen absoluten Expressionsintensitäten gehören sie, mit Ausnahme von *GLO*, zu den 170 am höchsten exprimierten Genen innerhalb der Petalen P1-P4.

4.1.2 *DEF* und *GLO* zeigen eine unterschiedliche Expressionsdynamik innerhalb der Petalenentwicklung

Obwohl seit über zehn Jahren die *DEF* und *GLO* Transkriptionsfaktoren intensiv erforscht werden, wurde deren Expression in späten Petalenstadien bislang nicht genauer untersucht. Die Makroarray- und RT-PCR-Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass sich die *DEF* und *GLO* Expressionsstärken in späten Petalendifferenzierungsphasen unterscheiden. Beide Transkriptionsfaktoren weisen innerhalb der Stadien P1-P3 ein sehr hohes Expressionsniveau auf und gehören nach den Makroarray-Daten in diesen Stadien zu den 3% der absolut gesehen am höchstens exprimierten Genen. Außerdem geht aus beiden Arten von Expressionsdaten hervor, dass *DEF* innerhalb der ersten drei Petalenstadien wesentlich stärker exprimiert wird als *GLO*, die ist besonders deutlich im Stadium P3

erkennbar. In dem letzten untersuchten Petalenstadium (P4) reduziert sich jedoch die Expressionsstärke von *DEF* im Gegensatz zu der von *GLO*, welche auf einem vergleichbaren Expressionsniveau bleibt. Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass nicht allein der Multiproteinkomplex aus *DEF*, *GLO* und *SQUA* Proteinen die autoregulative Kontrolle der Transkription dieser beiden Gene steuert (siehe Einleitung). Abhängig von Entwicklungsphase und lokaler Proteinumgebung könnten weitere Proteine die transkriptionelle Kontrolle von *DEF* und *GLO* unterschiedlich modulieren (Lohmann & Weigel, 2002). Eine genauere Untersuchung der Gewebe-spezifischen Expression dieser beiden Gene in späten Petalenstadien des Wildtyps würde Anhaltspunkte dafür liefern, inwieweit eine unterschiedliche mRNA-Lokalisation dieser Gene und die damit eventuell verbundene divergierende Verfügbarkeit von Ko-Faktoren die Expressionsregulation beeinflussen könnte.

4.1.3 Korrelation von Genexpressionsveränderungen mit morphologisch sichtbaren Differenzierungsprozessen

Generell zeigt sich bei einem Vergleich der in Stadium P2-P4 gemessenen Blütenlängen und der Anzahlen der in diesen Entwicklungsphasen in Petalen aktivierten Gene, dass der Zuwachs der Petalenlängen und der damit fortschreitende Differenzierungsgrad mit den gesteigerten Anzahlen der in der Petalenentwicklung aktivierten Gene korreliert.

Abgesehen von den unter 4.1.1 diskutierten Resultaten der allgemeinen funktionellen Analyse der insgesamt in Wildtyp Petalen regulierten ESTs, können wesentlich genauere Aussagen getroffen werden, wenn funktionellen Analysen für kleinere Datensätze ko-regulierter Gene durchgeführt werden. Bei der gesonderten Betrachtung der Subgruppen A, B, C und D fiel auf, dass in den Clustern benachbarte ESTs mit sehr ähnlichen Expressionsmustern oft eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen und dass für viele der ko-regulierten Gene Zugehörigkeiten zu gleichen Stoffwechselwegen nachgewiesen werden konnten. Im Folgenden werden die Charakteristika der vier aus dieser Arbeit hervorgegangenen Subgruppen ko-regulierter Gene mit Hinblick auf ihre biologische Relevanz diskutiert.

4.1.3.1 *Petalen des Stadiums P1 zeigen eine hohe Zellteilungsaktivität*

Alle ausschließlich in Stadium P1 signifikant aktivierten Gene wurden in der Subgruppe A zusammengefasst. Die Ergebnisse der funktionellen Analysen dieser ko-regulierten Gene mit Hilfe der MIPS-Kategorien belegen eindrucksvoll, dass die Kategorie Zellzyklus in dieser Entwicklungsphase stark überrepräsentiert ist. Ebenfalls gehäuft finden sich Gene aus den Kategorien Proteinsynthese und Proteinverarbeitung. Die separate Betrachtung identifiziert 14 ESTs mit BLAST-Homologien zu Histonen und weitere mit BLAST-Homologien zu ribosomalen Proteinen. Unter den Histonen befindet sich sechsmal der DNA-Replikationsmarker Histon H4 (Fobert *et al.*, 1994) dessen Expression ausschließlich im Stadium P1 stark aktiviert ist. In den späteren Petalenstadien P2-P4 sinkt die Expression dieser ESTs auf das in gemischten Sepalenstadien beobachtete Expressionsniveau ab. In einer Veröffentlichung von Coen aus dem Jahr 1986 wurde bereits postuliert, dass die jungen Blütenentwicklungsstadien (vergleichbar mit P1 bis P2) in *A. majus* Phasen mit hoher Zellteilungsaktivität darstellen (Coen *et al.*, 1986). Ferner wiesen Reale und Mitarbeiter im Jahr 2002 in Petalen von *Petunia hybrida* mittels eines Zellteilungsmarkers (Typ B1 Cyclin) und einem DNA-Replikationsmarker (Histon H4) nach, dass hohe Zellteilungsaktivitäten zeitlich auf junge Stadien der Petalenentwicklung beschränkt und in fortschreitenden Stadien die Expression dieser Markergene nur noch im Bereich der inneren Epidermis der Petalenlappen detektierbar ist (Reale *et al.*, 2002). Die Resultate der hier vorgestellten detaillierten Genexpressionsanalysen belegen in *Antirrhinum majus* zum ersten Mal, dass das durch Zellteilungen hervorgerufene Zellwachstum nach der Organinitiierung auf junge Petalenstadien (bis Ende P1) beschränkt ist.

4.1.3.2 *Der schnelle Größenzuwachs der späten Petalen (P3 und P4) wird durch Zellstreckungsprozesse realisiert*

Eine andere aus Kapitel 3.1.2.2.2 hervorgehende Subgruppe ko-regulierter Gene umfasst 59 ESTs deren Expression sowohl in P3 als auch in P4 signifikant gegenüber der Expression in Sepalen erhöht ist. Von Anfang des Petalenstadiums P3 bis zum Ende des Stadiums P4 vervierfachen die Blütenblätter des Wildtyps ihre Länge von 1 auf 4 cm. Die Abwesenheit von Zellteilungs- und DNA-Replikations-assoziierten Genen unter den signifikant in den beiden letzten Stadien aktivierten ESTs zeigt, dass diese rapide Größenzunahme innerhalb von nur fünf Tagen nicht allein durch ein Zellteilungswachstum verwirklicht wird. Stattdessen finden sich innerhalb der Subgruppe B gehäuft Gene, die an der Zellstreckung (Pektinacetylerase), am Zellwandmetabolismus allgemein (Extensin, Plasmamembranproteine) oder an Membrantransportprozessen (Lipid Transfer Proteine) beteiligt sind.

Zellvergrößerungsprozesse stellen eine energetisch ökonomische Art des schnellen Wachstums dar und gehen mit einem Massenzuwachs der Vakuole und einer irreversiblen Expansion der Zellwand einher. Der Größenzuwachs der Zelle wird dabei hauptsächlich durch die Aufnahme von Wasser realisiert, während der Zytoplasmagehalt der Zellen kaum steigt (Cosgrove, 1997). Um wachsen zu können, muss zunächst das starre Zellwandgerüst gelockert werden. Dieser Vorgang ist Turgor- und pH-Wert-abhängig und kann durch Hormone beeinflusst werden. Durch die anschließende Wasseraufnahme expandiert die Zelle physikalisch und erhält ihre endgültige Form nach Erweiterung und Festigung der zuvor aufgeweichten Zellwandbereiche (Cosgrove, 1997).

Neben den hier diskutierten Zellwachstumsaktivitäten weisen die MIPS-Daten auch auf eine erhöhte Differenzierungsaktivität in späten Petalenentwicklungsphasen hin. Tatsächlich formen sich in der inneren Epidermis dieser Petalenstadien spezielle konische Zellen aus, die den Blütenblättern ihren makroskopisch sichtbaren samtigen Glanz verleihen (siehe Einleitung; (Glover *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2002). Dieser durch den *MYB*-ähnlichen Transkriptionsfaktor *MIXTA* kontrollierte Differenzierungsprozess beginnt in den Petalen P3 und die Ausprägung der konischen Zellen dauert über P4 hinaus bis nach der Anthese an (Goodwin *et al.*, 2003). Unter den DNA-Elementen der EST-Filter befinden sich zwar einige *MYB*-ähnliche Sequenzen, jedoch keine welche eindeutig als *MIXTA* identifiziert werden und neue Expressionsdaten über diesen Transkriptionsfaktor liefern

konnten. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor in *Antirrhinum majus* überlappend mit der Lokalisation der konischen Zellen nur in der inneren Epidermis von späten Petalenstadien exprimiert wird (Glover *et al.*, 1998). *CER1*, ein Gen dass an der Wachsbiosynthese beteiligt ist (Aarts *et al.*, 1995), befindet sich gleich zweimal unter den in Subgruppe B dargestellten ESTs. Die Expressionsprofile der zugehörigen ESTs zeigen eine in allen vier Petalenstadien eine signifikant erhöhte Expression gegenüber der von Sepalen, mit dem höchsten Expressionsniveau in P4. Diese Daten korrelieren mit dem erhöhten Cuticulabedarf in Petalen, der einerseits generell in den wachstumsbedingten Zellvergrößerungen und andererseits speziell in den formbedingten Zelloberflächenvergrößerungen der konischen Zellen (siehe Einleitung) begründet ist.

4.1.3.3 *Petalen des Stadiums P4 zeigen neben Zellstreckungsprozessen eine hohe metabolische Aktivität*

Das Stadium P4 zeigte in den Untersuchungen den neben der größten Anzahl (174) an signifikant aktivierten Genen auch den mit 66% eindeutig höchsten Anteil an Stadienspezifisch regulierten ESTs. Unter den ausschließlich in diesem Entwicklungsstadium aktivierten Genen befinden sich, vergleichbar zu Subgruppe B auffallend viele ESTs mit Assoziation zum Zellwandmetabolismus. Dies verdeutlicht, dass die Verdoppelung der Blütenlänge von 2 auf 4 cm innerhalb dieses Stadiums keineswegs nur auf der Auffaltung bereits gestreckter Petalen beruht, sondern dass weiterhin ein aktives Zellstreckungswachstum nachzuweisen ist, wodurch die Petalen ihre endgültige Größe und Form erhalten.

Ein anderer charakteristischer Aspekt dieses späten Petalenstadiums ist die deutlich erhöhte Anzahl an Enzymen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus. Sehr eindeutige Korrelationen zeigen sich dabei einerseits zwischen den in der Anthocyan synthese involvierten Genen (*Flavonol 3-O-glukosyltransferase*, *Isoflavon Reduktase*) und der ausgeprägten Blütenblatffärbung (Martin & Gerats, 1993), und andererseits für ein Enzym (BAMT) des Methylbenzoat-Biosynthesewegs, da Methylbenzoat Hauptbestandteil des von *Antirrhinum* Blüten emittierten Dufts ist (Dudareva *et al.*, 2000). Weitere Enzyme aus anderen Bereichen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels könnten bei Abwehrreaktionen eine Rolle spielen. Diese Vermutung wird unterstützt von der großen Anzahl an Abwehr- und

Stress-verwandten Genen, die innerhalb der aus Rosen Petalen isolierten cDNAs gefunden wurden (Channelière *et al.*, 2002).

4.1.3.4 Die Photosynthese wird innerhalb der Petalenentwicklung kontinuierlich reprimiert

Das Datenset der Subgruppe D, welches diejenigen ESTs umfasst, deren Expression kontinuierlich in Petalen reprimiert wird zeigt von den hier speziell untersuchten Datensätzen die offensichtlichste Korrelation zwischen funktioneller Zuordnung der ko-regulierten Gene und morphologisch sichtbaren Differenzierungsprozessen. Fast alle in dieser Subgruppe vertretenen ESTs können dem Photosynthesemetabolismus oder den mit ihm verknüpften Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Diese Resultate zusammen mit der Überrepräsentation der MIPS-Kategorie Energie stehen im Einklang mit den morphologischen Beobachtungen dass Sepalen grün sind und eine hohe Photosyntheseaktivität vorweisen, dagegen aber Petalen nur in jungen Stadien eine leichte Grünfärbung besitzen und keine Stomata vorweisen. Eine Untersuchung der Plastiden-Ontogenie während der *Arabidopsis* Petalenentwicklung zeigte, dass junge Petalen aus ungeöffneten Knospen grüne Chloroplasten in allen Organbereichen besitzen. Im Laufe der Petalenstreckung beobachtet man jedoch, dass die Plastiden ihr Chlorophyll verlieren und sich zu Leukoplasten redifferenzieren. Normale grüne Chloroplasten verbleiben nur an der Basis von reifen Petalen (Pyke & Page, 1998).

4.2 Isolierung von DEF-Zielgenen

Die Makroarray Technik ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung mehrerer tausend Gene im Hinblick auf ihr Expressionsniveau in unterschiedlichen Konditionen z.B. in Organen, Entwicklungsphasen oder nach spezifischer Behandlung. Besonders für Analysen komplexer Prozesse bei denen eine vielschichtige Regulation vermutet wird, ist diese Methode geeignet um konkrete Hinweise auf die an der Regulation beteiligten Gene zu erhalten.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Genexpressionsanalyse der EST-Kollektion von *Antirrhinum majus* etabliert, mit dem die Daten hybridisierter EST-Filter unter verschiedenen Aspekten ausgewertet werden können. Die darin integrierte Benutzung der M-CHIPS-Analyse-Methode (Fellenberg *et al.*, 2002) beinhaltet zum einen eine experimentelle Annotierung und adäquate Speicherung der Hybridisierungsdaten, die den Zugriff auf die Daten und ihre Benutzung in Kombination mit zukünftig durchgeführten Expressionsexperimenten erlaubt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die aus mit den hier angewandten Prozessierungsmethoden und Qualitätskriterien produzierten Makroarray-Daten eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen und die Expressionsdaten einer Auswahl an Genen zu über 80% mittels einer unabhängigen Analysemethode bestätigt werden konnten. Bei den nicht bestätigten Genen konnten entweder die Genexpressionsveränderungen mittels der semiquantitativen und daher unsensitiveren RT-PCR-Analyse aufgrund von zu geringen absoluten Expressionsunterschieden nicht erfasst werden, oder es handelt sich um Falschpositive. Ersteres könnte durch quantitative poly(A)-Northern-Analysen detaillierter untersucht werden. Im Falle von *DELILA*, das einer großen Familie von bHLH-Transkriptionsfaktoren angehört, stimmen die Daten der RT-PCR-Analysen mit den bekannten Literaturdaten überein, jedoch ist aus den Makroarray-Daten keine gleichartige Regulation ersichtlich. Hier könnte aufgrund der kurzen EST-Sequenz eine Kreuzhybridisierung mit anderen bHLH-Genen stattgefunden und die Ergebnisse beeinflusst haben.

Die meisten der signifikant differentiell exprimierten Gene, welche aus den Makroarray-Analysen hervorgingen zeigen neben dem mehr als 1.2 fach relativen Expressionsunter-

schied auch eine große absolute Differenz der Intensitäten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich die hier verwandte Methode sehr gut dazu eignet aus einer großen Anzahl zumeist unbekannter ESTs sowohl stark exprimierte als auch stark regulierte Gene zuverlässig zu ermitteln.

4.2.1 Kombination von Makroarray Technik und temperatursensitiver *def-101* Mutante

Als Strategie zur Isolierung von DEF-Zielgenen aus *A. majus* wurde in dieser Arbeit eine Kombination aus einer Hochdurchsatz Technik mit einem *in vivo* induzierbaren System gewählt. Bei der *def-101* Mutante aus *Antirrhinum* können Modifikationen in der DEF-Funktion durch einfache Temperaturänderungen hervorgerufen werden. Gene, deren Expression nicht aufgrund der veränderten DEF-Funktion sondern durch den Temperaturstress beeinflusst wird, können klar im Rahmen von Kontrollexperimenten erkannt und ausgeschlossen werden. Dies verdeutlicht den Vorteil dieses *in vivo* Systems gegenüber artifiziellen Ansätzen. Z.B. können bei der Nutzung eines Steroid-induzierbaren Systems zur Identifizierung von Zielgenen (Sablowski & Meyerowitz, 1998; Zik & Irish, 2002), generelle Effekte auf die Genexpression auch in den nicht induzierten Pflanzen nicht ausgeschlossen werden, da das eingebrachte System in WT Pflanzen normalerweise nicht vorhanden ist.

Vorversuche zeigten, dass die Reduzierung der mRNA-Komplexitäten der untersuchten Proben durch Verwendung Organ- und Stadien-spezifischer Proben und die Einhaltung konstanter Parameter (z.B. Erntezeit, Methode der RNA-Extraktion, Expositionszeit) die Anzahl der identifizierten differentiell exprimierten Gene steigerte. Insbesondere bei der in Kapitel 3.1 beschriebenen Makroarray-Studie „WT Stadien“ wurde nachgewiesen, dass die Expression vieler in der Petalenentwicklung regulierter Gene Entwicklungsphasenspezifisch reguliert ist. Aufgrund dessen, wurde für die Isolierung von DEF-Zielgenen das Petalenstadium P3 der *def-101* Mutante ausgewählt. In dieser Entwicklungsphase der Petalenmorphogenese zeigen insgesamt 293 ESTs eine signifikant verändertes Expressionsniveau im Vergleich zu dem der Sepalen und 33 von ihnen sind ausschließlich in diesem Stadium aktiviert. Zudem liegt die Expression von *DEF* in diesem Stadium deutlich

über seinem basalen Expressionsniveau, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass eine Reduktion der DEF-Funktion sowohl autoregativ die *DEF* Expression als auch die Expressionsniveaus von DEF-Zielgenen beeinflussen wird.

4.2.2 Die Expression von über 100 ESTs reagiert auf eine ein- bis dreitägige Reduktion der DEF-Funktion

In Kapitel 3.2 wurde die mindestens 1.2 fache Änderung der Expressionsniveaus von 108 ESTs in Folge einer verminderten DEF-Funktion in *def-101* Petalen P3 im Rahmen eines Makroarray-Experiments nachgewiesen, und über 80% einer Auswahl von ihnen durch semiquantitative RT-PCR-Analysen bestätigt. Das ausgeglichene Verhältnis zwischen von DEF aktivierten (53) und von DEF reprimierten (55) ESTs zeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor sowohl als Aktivator, als auch als Repressor agiert. Zudem kann ein Anstieg der Anzahlen der regulierten ESTs nach 24h (47) im Vergleich zu 72h (98) beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass das sehr schnell vermittelte regulatorische Potential von DEF auf direkten Interaktionen beruhen könnte. Im weiteren Verlauf des DEF-Funktionsverlusts könnten diese frühen Zielgene dann vermutlich selbst auch wieder die Transkription von anderen Genen innerhalb der Regulationskaskade beeinflussen. Es ist anzunehmen, dass die Anzahl der in dem untersuchten System differentiell exprimierten Gene noch ansteigen würde, wenn man die Zeit der Behandlung über drei Tage hinaus verlängert.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die hier untersuchten 11.600 Unigene aus der EST-Kollektion ungefähr 40% der für *A. majus* geschätzten Anzahl an cDNAs repräsentieren, kann eine direkte oder indirekte Regulation von ca. 250 Genen durch DEFICIENS in diesem Petalenstadium der *def-101* Mutante angenommen werden. Diese Annahme übertrifft die aus einer Mikroarray-Studie hervorgehende Schätzung von ungefähr 200 in *Arabidopsis thaliana* vermutlich durch AP3/PI regulierte Gene (Zik & Irish, 2002). Allerdings umfasst die dort genannte Anzahl sowohl Petalen-, als auch Stamina-spezifische Zielgene, die während der gesamten Blütenentwicklung detektierbar waren. Da in dieser Arbeit nur die DEF-Zielgene eines der vier vorhandenen definierten Petalenstadien untersucht wurden ist anzunehmen, dass in *Antirrhinum* die Anzahl der von DEF regulierten Gene in der gesamten Petalen- und Staminaentwicklung wesentlich höher ist. Mittels Or-

gan- und Stadien-spezifischen Analysen können somit größere Anzahlen an differentiell exprimierten Zielgenen isoliert werden.

4.2.3 Das regulatorische Potential von DEFICIENS erstreckt sich in Petalen des Stadiums 3 auf verschiedene Stoffwechselwege

Aus den funktionellen MIPS-Analysen des Datensatzes der in *def-101* Petalen P3 regulierten ESTs ging hervor, dass 10 der 20 betrachteten Kategorien im Vergleich zu dem Datensatz der allgemein in diesem Petalenstadium exprimierten ESTs deutlich über- oder unterrepräsentiert waren. Ein Vergleich der 5 Kategorien, die sowohl innerhalb der regulierten ESTs der „WT Stadien“, als auch innerhalb der regulierten ESTs der „*def-101* P3“ überrepräsentiert sind zeigt, dass die Gene beider Datensätze fast mit jeweils identischen Anteilen den Kategorien Metabolismus, Energie, Zellabwehr oder Kontrolle der zellulären Organisation zugeordnet werden können. Die Kategorie Transport ist unter den DEF-Zielgenen mit 19% noch stärker vertreten als unter den innerhalb der WT Petalenentwicklung regulierten Genen. Diese Resultate lassen vermuten, dass die ermittelten DEF-Zielgene spezifische Aufgaben innerhalb der Petalenentwicklung besitzen. Tatsächlich befinden sich 73 der 108 DEF-Zielgene auch unter den in der WT Petalenentwicklung als reguliert identifizierten Genen.

Ferner wurde festgestellt, dass Gene die an der Proteinsynthese oder Proteinverarbeitung beteiligt sind, im Datensatz der von DEF regulierten Gene unterrepräsentiert sind. Diese Beobachtungen lassen zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.6.1, wo sich von den 11 als invariant identifizierten ESTs allein 4 in die oben genannten Kategorien einordnen lassen vermuten, dass DEF in späten Petalen, zumindest innerhalb der ersten 72h die Proteinsynthese nicht reguliert.

4.2.3.1 DEF kontrolliert das Zellstreckungswachstum während der späten Petalenentwicklung

Die detaillierten funktionellen Analysen der DEF-Zielgene ergaben dass allein 34 der 108 regulierten ESTs mit dem Zellwandmetabolismus bzw. dem Zellstreckungswachstum assoziiert sind. Die Transkription von über 70% von ihnen wird durch DEF aktiviert, die restlichen werden durch DEF reprimiert. Ähnlich wie bei den in Kapitel 4.1.3.2 und 4.1.3.3 diskutierten Genen mit einer Funktion im Zellwandmetabolismus, befinden sich auch unter den DEF-Zielgenen des Stadiums P3 strukturelle Zellwandbestandteile (Extensin, Tubulin), in die Zellstreckung involvierte Genprodukte (Pektinacetylersterase), mehrere Lipid Transfer Proteine und das an der Wachsbiosynthese beteiligte Gen *CERI* (Aarts *et al.*, 1995). Zusätzlich findet man jedoch hier zwei ESTs die Ähnlichkeiten zur Gibberellin-regulierten Genen zeigen, *GIP1* und *GEG* (Kotilainen *et al.*, 1999) und zwei ESTs, deren Genprodukte in der Weiterleitung von abiotischen Signalen involviert sind. Bei letzteren handelt es sich erstens um ein Calmodulin-ähnliches Gen, was unter Einfluß von Ca^{2+} die Aktivität von Enzymen beeinflussen kann (Alberts *et al.*, 1995) und zweitens um ein *Ankyrin*-ähnliches Gen. Für eine Ankyrin Proteinkinase aus *Alfalfa* konnte eine Induzierung der Expression aufgrund von osmotischen Stress nachgewiesen werden (Chinchilla *et al.*, 2003).

Die vier letztgenannten Gene zeigen, dass zusätzlich zu den bereits in späten Petalenstadien des Wildtyps identifizierten Genen, welche mit dem in diesen Phasen beobachteten Zellstreckungswachstum korrelieren, hier auch einige putative Regulatoren dieses Prozesses als von DEF reguliert nachgewiesen werden konnten. Speziell für *GEG* ist bereits bekannt, dass seine Expression in *Petunia hybrida* zeitlich mit der longitudinalen Zellexpansion korreliert und diese von diesem Gibberellin-stimulierten Gen reguliert wird (Kotilainen *et al.*, 1999).

Der Vergleich mit Studien in denen Zielgene des DEF Orthologen *AP3* aus *A. thaliana* zeigt, dass sowohl dem direkten Zielgen *NAP* eine Funktion während der Umschaltung von der Zellteilungs-geprägten Phase der Blütenentwicklung zur Zellexpansions-geprägten Phase zugeordnet wird (Sablowski & Meyerowitz, 1998), und sich des Weiteren unter den 47 von Zik identifizierten von AP3/PI regulierten Genen auch viele befinden, die dem Zellwandmetabolismus zugeordnet werden können (Zik & Irish, 2002).

4.2.3.2 *DEF* hemmt den Photosynthesestoffwechsel während der späten Petal-entwicklung

Wie bei den Temperaturverschiebungs-Experimenten mit *def-101* Mutanten beobachtet werden konnte, bestanden die ersten sichtbaren morphologischen Auswirkungen einer Verminderung der DEF-Funktion in Petalen in der Ausbildung von grünen Sektoren. Zudem kann ein Fünftel der von DEF in *def-101* Petalen P3 reprimierten ESTs eindeutig mit dem Photosynthesemetabolismus assoziiert werden. Alle diese Gene zeigen eine stark verminderte Expression in Petalen gegenüber dem Expressionsniveau in Sepalen. Interessanterweise sind jedoch die absoluten Intensitäten dieser Gene in den Petalenstadien immer noch recht hoch, so gehört z.B. die *RuBisCO Aktivase* (EST 018_5_02_g06) selbst in WT Petalen P3 noch zu den 600 am stärksten exprimierten Genen. Zudem wurde bei Untersuchungen von Petunien festgestellt, dass deren Korolla Chloroplasten enthält die, wenn auch mit einer stark reduzierten Effizienz, photosynthetisch aktiv sind und CO₂ fixieren (Weiss & Halevy, 1991). In *Antirrhinum* wurden die Petalen hinsichtlich ihrer photosynthetischen Aktivität noch nicht untersucht und sie zeigen nur in jungen Stadien eine grünliche Färbung. Obwohl die Chloroplasten innerhalb der Petal-entwicklung zu Leukoplasten redifferenzieren (Pyke & Page, 1998) ist noch unklar, warum anscheinend trotzdem das Expressionsniveau photosynthetischer Komponenten hoch gehalten wird, zumal Stomata in Petalen fehlen. Eventuell könnten einige Komponenten bislang noch unbekannte, nicht direkt mit der Photosynthese assoziierte Aufgaben während der Organ-differenzierung ausüben.

4.2.3.3 *DEF* und *GLO* werden unterschiedlich stark durch das DEF Protein reguliert

Bereits unter dem Punkt 4.1.2 wurden die unterschiedlichen Expressionsdynamiken und ungleichen absoluten Expressionsniveaus von *DEF* und *GLO* in WT Petalen diskutiert. Die Ergebnisse der detaillierten Expressions-Studien zeigen, dass sich außerdem auch die Auswirkungen einer veränderten DEF-Funktion auf die Transkriptionsregulation dieser beiden MADS-Box Gene unterscheiden. Während die Expression von *DEF* sowohl in

Petalen P3 der *def-101* Mutante, als auch jungen Infloreszenzen der *def-101/plena* Doppelmutante nach Reduzierung der DEF-Funktion stark beeinflusst ist, kann man für die Expression von *GLO* nur sehr geringe Änderungen in diesen beiden Testsystemen beobachten. Da die Makroarraydaten im Falle der behandelten *def-101* Petalen eine leichte Reduktion der *GLO* Expression nachweisen, könnte mit Hilfe von poly(A) RNA Northern noch einmal überprüft werden, ob die hier benutzte semiquantitative RT-PCR-Technik zur Erfassung der geringen Expressionsunterschiede nicht sensitiv genug war.

In WT Pflanzen wurde sowohl für *DEF*, als auch für *GLO in vivo* nachgewiesen, dass die DEF und GLO Proteine an den beiden Promotoren binden (B. Müller, unveröffentlichte Daten). Ein Bindungsnachweis implementiert jedoch nicht, dass dadurch auch die Transkription der betreffenden Gene kontrolliert wird.

In Petalen der *def-101* Mutante wurde eine autoregulative Kontrolle der *DEF* Expression beobachtet, jedoch reagierte die Expression von *GLO* fast gar nicht auf eine reduzierte DEF-Funktion. Die generell verminderte DEF-Funktion in *def-101* Blüten (siehe Einleitung) könnte im Fall von *GLO* zu gering sein, um die Autoregulation für dieses Gen zu gewährleisten. Demnach würden unterschiedliche DEF-Schwellenwerte für die Transkriptionsaktivierung von *DEF* und *GLO* benötigt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Art und Stärke der Transkriptionskontrolle dieser beiden Gene zusätzlich durch weitere ternäre Faktoren moduliert wird (Egea-Cortines *et al.*, 1999), welche unterschiedlich an den Promotoren der beiden MADS-Box Gene binden. Auch die Entwicklungsphasen-abhängigen Expressionsunterschiede von *DEF* und *GLO* in WT Petalenstadien weisen auf eine Beteiligung von zusätzlichen Ko-Faktoren bei der Transkriptionsregulation dieser Gene hin.

Diese Beobachtungen zeigen, dass der Nachweis eines direkten DEF-Zielgens sowohl eine *in vivo* dokumentierte Interaktion des DEF Proteins mit dem Promotor, als auch eine Bestätigung der in Folge dieser Bindung regulierten Transkriptionsaktivität bedingen. Für Letzteres stellte sich in die dieser Arbeit die *def-101* Mutante als geeignetes System heraus.

4.3 Charakterisierung der ausgewählten DEF-Zielgene

Aus den über 100 DEF-Zielgenen, die aus der Makroarray-Studie mit *def-101* Petalen P3 hervorgingen, wurden sechs unabhängig bestätigte Zielgene für weitere Analysen ausgewählt. Kriterien für die Auswahl waren dabei eine schnelle und eindeutige Expressionsveränderung in Folge einer Modifikation der DEF-Funktion in *def-101* Petalen P3 und eine deutliche differentielle Expression in WT Petalen des Stadiums P3 gegenüber WT Sepalen. Durch die komplette Sequenzierung der zugehörigen EST-Klone konnten die offenen Leseraster von drei Genen vollständig ermittelt werden, bei den restlichen Zielgenen ist entweder der Translationsstartpunkt oder das Translationsende noch nicht eindeutig bestimmt. Die Expression aller sechs Gene wurde in verschiedenen Organen und Mutanten charakterisiert, und mit Hilfe der RAGE Technik genomische DNA-Fragmente stromaufwärts des Translationsstartpunkts isoliert und charakterisiert. Abschließend wurden genomische DNA-Fragmente von drei der DEF-Zielgene dahingehend untersucht, ob ihre Regulation durch eine direkte Interaktion des DEF Proteins mit der genomischen DNA vermittelt wird.

4.3.1 *DEFTup 1* – ein *Extensin*-ähnliches DEF-Zielgen

Das Genprodukt des *Extensin*-ähnlichen DEF-Zielgens *DEFTup 1* weist ein offenes Leseraster von 454 Aminosäuren Länge auf. Das sequenzähnlichste *Arabidopsis* Gen ist At4g38770. Mit einem Anteil an identischen Aminosäuren von nur 48% repräsentiert es wahrscheinlich nicht das orthologe Gen von *DEFTup 1*.

Die detaillierten Expressionsstudien zeigen, dass dieses Gen in WT Organen des Stadiums 3 sehr stark in Petalen und Stamina und mäßig in Karpellen und Brakteen exprimiert ist. Mit seiner besonders stark aktivierten Expression in späten Petalenstadien P3 und P4 gegenüber der Expression in WT Sepalen ist es Teil des speziellen Datensatzes der Subgruppe B. Betrachtet man die in den Makroarray-Studien ermittelten absoluten Signalintensitäten dieses Gens, so gehört es sowohl in den späten Petalenstadien des Wildtyps als auch in den Petalen P3 der *def-101* Mutante zu den sechs am stärksten exprimierten Ge-

nen. Extensine gehören zu den Hydroxyprolinreichen Glykoproteinen und stellen Strukturproteine der Zellwand dar (Alberts *et al.*, 1995). Ihre erhöhte Expression, besonders in späten Petalenstadien korreliert mit dem dort beobachteten enormen Zellstreckungswachstum. Auch in anderen Untersuchungen wurde eine Funktion von Extensinähnlichen Proteinen in Geweben mit starkem Längenwachstum nachgewiesen (Bucher *et al.*, 2002).

Die Expression von *DEFTup 1* reagiert sowohl in Petalen P3 als auch Stamina des Stadiums 3 der *def-101* Mutante schon nach 24h sehr stark in Folge einer Reduktion der DEF-Funktion. Zusätzlich ist eine Expressionsaktivierung durch DEF in jungen Infloreszenzen der *def-101/plena* Doppelmutante nach 48h zu beobachten. Die schnelle und starke Transkriptionsaktivierung durch DEFICIENS zeichnete *DEFTup 1* als guten Kandidaten für eine direktes Zielgen aus.

Mittels der RAGE Technik konnte von *DEFTup 1* ein genomisches Promotorfragment von 2837 bp Länge isoliert werden, welches nach einer weit gefassten CARG-Box Definition 21 CARG-Boxen und zusätzlich einige andere cis-aktive Elemente enthält. Für dieses Gen konnte mittels X-ChIP-PCR-Analysen für zwei der drei getesteten Promotorfragmente sowohl in WT Petalen P3 als auch in Stamen des Stadiums 3 eine Anreicherung in den DNA-Fractionen aus mit dem α -DEF Serum durchgeführten Immunopräzipitationen gegenüber denen mit Prä-Immunsereum durchgeführten Immunopräzipitationen nachgewiesen werden. Die beiden Promotorfragmente E1 (403 bp) und E2 (492 bp) enthalten fünf (E1) bzw. sechs (E2) CARG-Box Motive und zusätzlich jeweils eine b-ZIP Bindestelle. Wie bereits in der Einleitung erörtert wurde können MADS-Domänen Proteine mit hoher Affinität an CARG-Box Elemente in den Promotoren ihrer Zielgene binden. Die Spezifität dieser Bindung und die Stärke bzw. Art des regulatorischen Effekts wird entweder von der Sequenz des cis-aktiven Elements selbst oder von zusätzlichen mit dem MADS-Domänen Protein interagierenden Faktoren bestimmt (Hill *et al.*, 1998; Tilly *et al.*, 1998). Proteine, die räumlich getrennte Motive von Promotoren binden, können durch Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur miteinander in Form von multimeren Proteinkomplexen interagieren (Egea-Cortines *et al.*, 1999). Dadurch können weit voneinander entfernte cis-aktive Elemente an den gleichen Regulationsprozessen beteiligt sein. Im Falle von *DEFTup 1* könnte deshalb im Rahmen von weiteren X-ChIP-Experimenten überprüft werden, ob auch noch andere der zahlreichen im Promotor vorhandenen regulatorischen Sequenzen für die Interaktion mit DEF wichtig sind.

Das hier vorgestellte *Extensin*-ähnliche Gen *DEFTup 1* ist neben *DEF* und *GLO* selbst das erste isolierte und charakterisierte direkte Zielgen von *DEFICIENS*.

4.3.2 *DEFTup 2* – ein *Alpha Tubulin* ist Zielgen von DEF

Auch für *DEFTup 2* konnte die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters von 450 Aminosäuren Länge ermittelt werden. Das Gen weist mit einem Anteil von 91% identischen Aminosäuren eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem *Alpha Tubulin* Gen At4g14960 aus *Arabidopsis* auf. Ein mittels der RAGE Technik isoliertes 1219 bp langes genomisches DNA-Fragment stromaufwärts des Translationsstartpunkts enthält 5 CArG-Boxen.

In WT Organen wird das hier untersuchte *Alpha Tubulin* stark in Petalen, Stamina, Karpellen, Stängeln und Wurzeln exprimiert. Innerhalb der Petalenenwicklung weist es eine sehr hohe Expression in jungen Petalen (P1 und P2) auf, welche im weiteren Verlauf der Petalendifferenzierung absinkt. Alpha Tubuline sind Bestandteil der Mikrotubuli die u. a. beim Aufbau der Zellwand für deren Ausrichtung sorgen (Alberts *et al.*, 1995).

Die Expression dieses DEF-Zielgens reagiert in Petalen P3 der *def-101* Mutante nach 24h schwach und nach 72h sehr stark auf eine modifizierte DEF-Funktion. In Stamina der gleichen Blüten ist jedoch keine derartige Reaktion zu beobachten. In jungen Infloreszenzen der *def-101/plena* Mutante hingegen wird die Expression von *DEFTup 2* ebenfalls durch DEF aktiviert. Die hier nicht nachweisbare Regulation von *DEFTup 2* in Stamina der *def-101* Mutante könnte einerseits in einer zu kurzen Behandlungszeit begründet sein. Wie in den Petalen der gleichen Blüten zu beobachten ist, erfolgt der größte Anteil der Expressionsregulierung erst nach 72h. Die schnelle Transkriptionsregulierung in den Infloreszenzen der Doppelmutante schon nach 12h Behandlung lässt jedoch eine andere Möglichkeit wahrscheinlicher erscheinen. Die unterschiedliche Regulation dieses Gens in Petalen und Stamina könnte in der Interaktion mit zusätzlichen Ko-Faktoren begründet sein, die die Transkriptionsaktivierung des *Alpha Tubulins* beeinflussen und in den beiden Organen differentiell exprimiert sind (Lohmann & Weigel, 2002).

4.3.3 *DEFTdown 1* – eine *RuBisCO* Aktivase ist Zielgen von DEF

Dieses von DEF reprimierte Zielgen zeigt ein 472 Aminosäure langes offenes Leseraster. Die sequenzähnlichste *RuBisCO* Aktivase aus *A. thaliana* (At2g39730) weist eine 79% ige Aminosäureidentität auf. Das Promotorfragment, welches mit Hilfe der genomischen Linker PCR-Methode isoliert werden konnte ist 1627 bp lang und enthält 7 CARG-Box Elemente.

Die aus *Antirrhinum* isolierte *RuBisCO* Aktivase wird sehr stark in photosynthetisch hoch aktiven Organen wie Sepalen, Brakteen und Blättern exprimiert. *DEFTdown 1* gehört zu dem Datensatz der Subgruppe D der im Vergleich zu Sepalen kontinuierlich während der Petalenentwicklung reprimierten Gene. Das funktionell eindeutig mit der Photosynthese assoziierte Genprodukt aktiviert das Schlüsselenzym der Photosynthese (RuBisCO) durch eine Carbamylierungsreaktion (Buchanan *et al.*, 2000).

In den behandelten *def-101* Petalen P3 steigt die Expression dieses Zielgens nach 72h stark an, was auf eine starke Reprimierung der Transkription dieses Gens durch DEF hinweist. In Stamina konnte der Regulationseffekt noch deutlicher und bereits nach 24h nachgewiesen werden. Auch in jungen Infloreszenzen der Doppelmutante zeigt sich ein durch DEF induzierter Regulationseffekt.

X-ChIP-PCR-Analysen mit Petalen-Material zeigten keine Anreicherung von Promotorfragmenten dieses Gens (Daten nicht aufgeführt). Allerdings könnte die sehr starke und schnelle Expressionsaktivierung dieses Gens in Stamina ein Hinweis für eine direkte Regulation durch DEF in den Organen des dritten Wirtels sein. Zur Klärung dieser Vermutung müssten weitere Promotorbereiche stromaufwärts der bereits bekannten Sequenzen isoliert und damit weitere X-ChIP-PCR-Analysen mit DNA-Fraktionen auch aus WT Stamina durchgeführt werden.

4.3.4 *DEFTdown 2* – eine *Beta Glukosidase* ist Zielgen von DEF

Die EST-Sequenz des zweiten von DEF reprimierten Zielgens umfasst 1181 bp, ein vollständiges offenes Leseraster konnte hier aufgrund des fehlenden 5' Bereichs der cDNA

noch nicht ermittelt werden. Auch die Genauigkeit der Sequenzvergleiche wird durch das fehlende Fragment beeinflusst, so dass bislang nur die allgemeine Enzymklasse ermittelt werden konnte. Die höchste Sequenzähnlichkeit mit 48% Aminosäureidentität zeigt bisher eine Beta Glukosidase aus *Olea europaea*. Aufgrund des nicht vorhandenen Translationsstartpunkts ist ferner für das mittels RAGE Technik isolierte 601 bp lange genomische Fragment unklar, ob es sich dabei um Promotorbereiche handelt. Diese Sequenz wies außer einer CA₁G-Box des Typs 2 noch eine Myb-Bindestelle auf.

Die Expression dieses Gens ist in den untersuchten WT Organen auf Sepalen und Karpelle begrenzt und innerhalb der Petalenentwicklung ist das Expressionsniveau im Vergleich zu Sepalen deutlich reduziert. Auch *DEFTdown 2* gehört zu den kontinuierlich in Petalen reprimierten ESTs der Subgruppe D. Pflanzliche Beta Glukosidasen stellen eine große Enzymklasse mit vielen unterschiedlichen Vertretern dar. Sie besitzen die unterschiedlichsten Funktionen die von Beteiligungen bei Abwehrreaktionen, über Aufgaben in der Farbstoffsynthese bis hin zu Rollen in der Ligninsynthese reichen. Nach Ermittlung der fehlenden cDNA-Sequenz dieses Gens z.B. mit Hilfe der RACE Technik, könnte eine genauere Einteilung des isolierten DEF-Zielgens erfolgen, und Hinweise über eine mögliche Funktion des *Antirrhinum* Gens durch Vergleiche mit bekannten ähnlichen *Beta Glukosidasen* ermittelt werden.

Bei der Expressions-Regulation der *Beta Glukosidase* zeigt sich ein komplexes Bild. Zum einen reagiert die Expression von *DEFTdown 2* mit einem starken Anstieg in Folge einer reduzierten DEF-Funktion in Petalen des Stadiums P3 der *def-101* Mutante. In sehr jungen Organstadien der Infloreszenzen der *def-101/plena* Doppelmutante zeigt sich jedoch, dass *DEFTdown 2* dort von DEF aktiviert wird. Die hier beobachtete Transkriptionsaktivierung in frühen Stadien und Transkriptionsreprimierung in späten Stadien ein und desselben Zielgens, vermittelt durch den gleichen Transkriptionsfaktor könnte einerseits in zeitlich unterschiedlich exprimierten, an der Regulation beteiligten Ko-Faktoren begründet sein. Zum andern kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die fehlende C-Funktion in der Doppelmutante auch auf die Expressionsregulation dieses Zielgens auswirkt. Um dies zu überprüfen, könnte die Expressionsregulation von *DEFTdown 2* aufgrund einer modifizierten DEF-Funktion in jungen Petalen (P1 und jünger) in der *def-101* Mutante untersucht werden.

Die mit dem 600 bp langen genomischen Fragment dieses Zielgens durchgeführten X-ChIP-PCR-Analysen zeigten eine leichte Anreicherung innerhalb der mit dem α -DEF immunopräzipitierten DNA-Fraktion. Dies kann als Hinweis für eine eventuelle Interakti-

on des DEF Proteins oder eines DEF assoziierten Proteinkomplexes mit benachbarten Bereichen dieses untersuchten Fragments ausgelegt werden. Da zumindest ein Teil dieser genomischen Sequenz stromabwärts des Translationsstartpunkts liegt, könnte hier auch eine Interaktion von regulativen Faktoren mit Intronbereichen innerhalb des Gens vorliegen, wie es z.B. schon einmal für *AGAMOUS* nachgewiesen wurde (Busch *et al.*, 1999). Um die möglicherweise direkt durch DEF vermittelte Regulation dieses Gens weiter zu untersuchen, sollten sowohl genomische Bereiche weiter stromaufwärts als auch stromabwärts des hier getesteten Fragments isoliert und in X-ChIP-PCR-Analysen untersucht werden.

4.3.5 *DEFTdown 3* – ein hypothetisches DEF-Zielgen

Das putative Genprodukt des hypothetischen Gens *DEFTdown 3* zeigt ein offenes Leseraster von 287 Aminosäuren Länge, welches in Sequenzvergleichen zu keinem bisher bekannten Protein Ähnlichkeiten zeigte. Das fast 1400 bp lange isolierte genomische Promotorfragment enthält 6 CARG-Boxen.

DEFTdown 3 zeigt in WT Organen des Stadiums 3 eine starke Expression in Brakteen, Stängeln und Sepalen. In Petalen, Stamina und Karpellen ist es nur schwach exprimiert. Im Vergleich der WT Petalenstadien zu WT Sepalen konnte eine deutlich reduzierte Expression in P1 bis P3 beobachtet werden, die jedoch in P4 fast wieder auf das Expressionsniveau der Sepalen ansteigt.

Die Expressions-Studien mit *def-101* Petalen P3 wiesen für dieses Gen eine durch DEF reprimierte Expression nach. Auch in Stamina des Stadiums 3 der gleichen Blüten konnte eine gleichartige Expressionsregulation nachgewiesen werden, jedoch nicht in jungen Infloreszenzen der Doppelmutante.

Auch von diesem DEF-Zielgen wurden zwei Promotorfragmente innerhalb von X-ChIP-PCR-Analysen auf eine direkte *in vivo* Interaktion mit DEF untersucht. Die dabei beobachtete Anreicherung für eines der beiden Fragmente (H1; 420 bp) ist in ihrer Stärke vergleichbar mit der unter 4.3.4 diskutierten Anreicherung des *Beta Glukosidase* Fragments. Auch hier kann dieses Resultat als Hinweis für nachfolgende Untersuchungen der benachbarten Promotorbereiche genutzt werden.

4.3.6 *DEFTdown 4* – ein *PAP*-ähnliches DEF-Zielgen

DEFTdown 4 zeigt als letztes hier vorgestelltes DEF-Zielgen in Sequenzvergleichen Ähnlichkeiten zu einem Plastidlipid-assoziierten Protein der Fibrillin-Familie. Die Länge des offenen Leserasters ist bei diesem Gen noch unklar. Das sequenzähnlichste Gen aus *Arabidopsis* (At3g23400) wird mit einem Anteil von 71% identischen Aminosäuren unterstützt. Im Falle von *DEFTdown 4* konnte ein über 2500 bp langes genomisches Fragment isoliert werden, das wie die anderen Fragmente zahlreiche CArG-Box Elemente besitzt.

DEFTdown 4 ist in WT Organen des Stadiums 3 stark in Sepalen, Brakteen und Blättern exprimiert. Innerhalb der gesamten Petalenentwicklung ist dieses Gen im Vergleich zu der Expression in Sepalen stark reprimiert.

Plastidlipid-assoziierte Proteine stellen strukturelle Proteine dar, die mit Carotinoiden und anderen neutralen Lipiden in Plastiden assoziiert sind. Untersuchungen der drei in *Brassica napus* vorhandenen *PAPs* zeigten, dass deren Transkripte teilweise Organ-spezifisch nachgewiesen werden konnten, u.a. fand man dabei auch das Petalen-spezifische Gen *PAP2* (Kim *et al.*, 2001).

Die Expression von *DEFTdown 4* konnte sowohl in *def-101* Petalen P3, als auch in *def-101* Stamina Stadium 3 als von DEF reprimiert nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine schwache derartige Transkriptionsregulation in jungen Infloreszenzen der Doppelmutante.

4.4 Ausblick auf weitere Experimente

In dieser Arbeit wurde durch eine Kombination der Makroarray Technik mit der temperatursensitiven *def-101* Mutante ein System zur Identifizierung von DEF-Zielgenen etabliert. Die bereits in der zur Auswertung angelegten Datenbank gespeicherten Versuchsergebnisse, können mit den Resultaten zukünftiger Expressionsprofil-Experimente kombiniert und unter neuen Aspekten ausgewertet werden. Die Makroarray-Studien können nach dem experimentellen Vorbild der *def-101* Petalen-Studie auf die Isolierung von Stamina-spezifischen DEF-Zielgenen ausgeweitet werden. Diese Analyse könnte Einblicke in die spezifische Expressionsregulation Stamina-spezifischer Gewebe wie z.B. Filament und Tapetum liefern. Des Weiteren kann zur Isolierung von frühen DEF-Zielgenen das System der Doppelmutante *def-101/plena* im Rahmen von Expressions-Studien genutzt werden. Hierbei würden die Transkriptome junger Infloreszenzen mit und ohne einer modifizierten DEF-Funktion verglichen werden. Eine Verkürzung der Behandlungszeiten in allen genannten Experimenten würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, auch direkt von DEF regulierte Zielgene zu erfassen. Weiterhin könnten noch andere der über 100 DEF-Zielgene genauer analysiert werden.

Zur weiteren Charakterisierung der bereits isolierten DEF-Zielgene können mittels *in situ* Expressionsstudien zunächst die Gewebe-spezifische Expression der sechs Gene in WT Blüten dokumentiert und im Weiteren ihre unter der Kontrolle von DEF stehende Transkriptionsregulation in *def-101* Blüten auch mit dieser unabhängigen Methode untersucht werden.

Die Funktionalität der Zielgene kann mit Hilfe von transgenen Systemen weiter aufgeklärt werden. Dabei steht zum einen das leicht und schnell zu transformierende System der Brassicaceae *Arabidopsis* und zum anderen das zu *Antirrhinum* näher verwandte System der Solanaceae Tabak zur Verfügung. Überexpressions-Studien der DEF-Zielgene unter der Kontrolle des 35S Promotors in *A. thaliana* könnten z.B. im Fall des *Extensin*-ähnlichen Gens Aufschluß darüber geben, ob allgemein die Größe der Blütenorgane beeinträchtigt wird, oder nur die Petalenlänge in Folge einer bereits in frühen Entwicklungsstadien vorhandenen Expression dieses Gens zunimmt. Zudem stellt sich die Frage, ob die

ektopische Expression von *DEFTup 1* außerhalb der Kontrolle von DEF und GLO auch vegetative Organe beeinträchtigt, oder ob sich die Funktion des Zielgens nur im Netzwerk der Blüten-spezifischen Genexpression auswirkt.

Des Weiteren können *knock-out* Mutanten homologer *Arabidopsis* Gene im Hinblick auf Blüten-spezifische Phänotypen betrachtet werden. Falls diese nicht vorhanden sein sollten, können *knock-out* ähnliche Phänotypen auch mittels der RNAi-Methode generiert werden (Chuang & Meyerowitz, 2000).

Um unabhängig *in vivo* zu zeigen, dass die direkte Interaktion von DEF mit dem Promotor des *Extensin*-ähnlichen Zielgens die Transkription von *DEFTup 1* aktiviert, können transgene Tabakpflanzen verwendet werden, in denen DEF und GLO unter dem 35S Promotor überexprimiert sind (Davies *et al.*, 1996). Diese Pflanzen könnten mit einem Zielgen-Promotor-Reportergen Vektor (z.B. *DEFTup 1::GUS*) transformiert werden. Wird eine Reportergen Expression in den Petalen, die im ersten Wirtel dieser Pflanzen gebildet werden nachgewiesen, stellt dies den Nachweis einer direkten Transkriptionskontrolle durch DEF/GLO dar.

Zukünftig könnten vergleichende Analysen der Resultate aus den Zielgen-Untersuchungen der B-Funktionsgene verschiedener Spezies einerseits Aufschluss darüber geben, inwieweit die regulatorischen Funktionen der homöotischen Gene konserviert sind. Im Weiteren würden gerade die Spezies-spezifischen Zielgene dieser Schlüsselregulatoren interessante Hinweise liefern, worin die zu beobachtende Formenvielfalt der Blütenblätter begründet ist und Spekulationen über die Evolution der Petalen zulassen.

5 Zusammenfassung

DEFICIENS (DEF) ein homöotisches MADS-Box Gen, reguliert die Organogenese der Petalen und Stamina, welche sich in zwei benachbarten Wirteln der *A. majus* Blüte entwickeln. Die Zielgene, durch die das regulatorische Potential von *DEF* während der Entwicklung der Blütenorgane realisiert wird, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Für die korrekte Ausprägung von Petalen und Stamina ist die kontinuierliche *DEF* Expression von Phasen der Organinitiierung bis in späte Entwicklungsstadien hinein notwendig. Daher wird angenommen, dass *DEF* die Expression von unterschiedlichen Zielgenen sowohl in frühen, als auch in späten Phasen reguliert.

Auf der Basis morphologischer Kriterien wurden die späten Differenzierungsphasen der Petalenentwicklung in vier definierte Stadien (P1-P4) eingeteilt. Aus den mit ihnen durchgeführten Expressionsprofil-Experimenten ging hervor, dass mindestens ein Fünftel der in Sepalen und Petalen exprimierten Gene während der Petalenentwicklung reguliert werden. Funktionelle Analysen definierter Subgruppen von ko-regulierten Genen zeigten, dass Veränderungen in der Genexpression morphologischen Differenzierungsprozessen zugeordnet werden können. Zudem unterliegt der größte Teil der Petalen-spezifisch exprimierten Gene einer hohen zeitlichen Regulation. Die frühe Petalenentwicklung bis Ende des Stadiums P1 ist Zellteilungs-geprägt. Der enorme Längenzuwachs der späten Petalenstadien P3 und P4 wird dagegen durch Zellstreckungsprozesse realisiert.

Das Petalenstadium P3 wurde aufgrund der dort festgestellten hohen Regulationsaktivität von *DEF* zur Isolierung von Zielgenen ausgewählt. Mittels der konditionellen *def-101* Mutante wurden in weiteren Expressionsprofil-Experimenten 108 ESTs ermittelt, deren Expression in Folge einer reduzierten *DEF*-Funktion reguliert wird. Dabei zeigte sich, dass *DEF* zu gleichen Teilen als Aktivator und Repressor agiert. In unabhängigen Expressions-Studien konnten von einer Auswahl dieser Gene über 80% als differentiell exprimiert bestätigt werden. Funktionelle Analysen dieser *DEF*-Zielgene zeigten, dass *DEF* in dem untersuchten Petalenstadium P3 hauptsächlich Prozesse des Zellwandmetabolismus aktiviert und notwendig ist, um die Expression von Genen die an der Photosynthese beteiligt sind, zu reprimieren.

Darüber hinaus wurde die Expression von sechs ausgewählten dieser über 100 *DEF*-Zielgene detailliert charakterisiert. Neben semiquantitativen RT-PCR-Analysen in WT

Organen, wurde die durch DEF vermittelte Transkriptionsregulation der aus Petalen P3 isolierten Gene auch in Stamina des gleichen Stadiums und jungen Infloreszenzen untersucht.

Abschließend wurde eine *in vivo* Interaktion des DEF Proteins mit isolierten Promotorfragmenten der ausgewählten DEF-Zielgene mittels X-ChIP-PCR-Analysen überprüft. Dabei konnte für das *Extensin*-ähnliche Gen *DEFTup 1*, dessen Transkription nachweislich durch die DEF-Funktion reguliert wird gezeigt werden, dass DEF direkt oder als Bestandteil eines Proteinkomplexes mit dem Promotor des Zielgens interagiert.

In dieser Arbeit wurde somit ein System kombinierter Methoden zur Isolierung von DEF-Zielgenen etabliert, mit dem über 100 neue, unter der Kontrolle des homöotischen Transkriptionsfaktors stehende Gene isoliert wurden. Abgesehen von der autoregulativen Transkriptionskontrolle von *DEF* und *GLO* durch das Heterodimer ihrer eigenen Proteine, konnte mit *DEFTup 1* das erste direkte Zielgen von DEFICIENS nachgewiesen werden.

5.1 Abstract

DEFICIENS (DEF), a homeotic MADS-Box gene controls petal and stamen organogenesis in the second and third whorl of the *A. majus* flower. Target genes that realize the regulatory potential of DEF during flower development are almost unknown. Constant *DEF* expression from the time of organ initiation to late developmental stages is crucial for proper development of both floral organs. This lead to the assumption that *DEF* expression regulates different target genes in early and late stages of flower development.

The late phases of differentiation in petal development were divided into four stages (P1-P4) based on their morphological characteristics. Expression profiling experiments demonstrated that at least one fifth of sepal and petal genes are regulated differentially during petal development.

Functional analysis of defined subgroups of co-regulated genes revealed that changes in gene expression correlate with processes of morphological differentiation. Additionally, many petal-specific genes exhibit a distinct temporal expression pattern. Early petal development until the end of stage P1 is dominated by cell division. The dramatic growth in length of petals during stages P3 and P4 is predominantly based on cell expansion processes.

The developmental phase P3 showed high regulation activity and was chosen for the isolation of DEF target genes. In additional expression profiling experiments conducted with the conditional *def-101* mutant 108 ESTs with altered expression as a consequence of a reduced DEF-function were identified. By that DEF was shown to act both as transcriptional activator or repressor. Independent expression studies on a selection of these genes confirmed that 80% are differentially expressed. Functional analysis of these stage P3 petal target genes revealed that DEF activates cell wall metabolism and represses genes involved in photosynthesis.

Furthermore six of about 100 DEF target genes were selected and characterized in detail. In addition to semi-quantitative RT-PCR analyses in WT organs, the DEF-mediated transcription regulation of the isolated genes was analyzed in stamens stage 3 and young inflorescences.

Finally, X-ChIP-PCR-analyses were carried out to investigate the *in vivo* interaction of DEF protein with isolated promoter fragments of selected DEF target genes. In case of the the *extensin*-like gene *DEFTup 1* it was demonstrated, that its transcription is regulated by

DEF and that DEF interacts directly or as part of a protein complex with the promoter of this target gene.

In this work a system of combined methods for the isolation of DEF target genes was established. More than 100 genes were identified to be transcriptionally controlled by DEF. Apart from the auto-regulative transcription control of *DEF* and *GLO* by their corresponding protein heterodimer, *DEFTup 1* was shown to be the first direct target gene of DEFICIENS.

6 Literaturverzeichnis

- Aarts, M.G.M., Keijzer, C.J., Stiekema, W.J., and Pereira, A. (1995).** Molecular Characterization of the CER1 Gene of Arabidopsis Involved in Epicuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility. *Plant Cell* **7**, 2115-2117.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1995)** *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Weinheim.
- Almeida, J., Carpenter, R., Robbins, T.P., Martin, C., and Coen, E.S. (1989).** Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*. *Genes and Development* **3**, 1758-1767.
- Beissbarth, T., Fellenberg, K., Brors, B., Arribas-Prat, R., Boer, J.M., Hauser, N.C., Scheideler, M., Hoheisel, J.D., Schütz, G., Poustka, A., and Vingron, M. (2000).** Processing and quality control of DNA array hybridization data. *Bioinformatics* **16**, 1014-1022.
- Bey, M., Müller, B.M., Lauri, A., and Zachgo, S. (2002).** Downstream of *DEFICIENS*: Towards the Isolation of Target Genes. *Flowering Newsletter* **34**, 19-26.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M. (1991).** Genetic interactions among floral homeotic gene of Arabidopsis. *Development* **112**, 1-20.
- Buchanan, Gruissem, and Jones (2000)** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland.
- Bucher, M., Brunner, S., Zimmermann, P., Zardi, G.I., Amrhein, N., Willmitzer, L., and Riesmeier, J.W. (2002).** The Expression of an Extensin-Like Protein Correlates with Cellular Tip Growth in Tomato. *PLANT PHYSIOLOGY* **128**, 911-923.
- Busch, M.A., Bomblies, K., and Weigel, D. (1999).** Activation of a floral homeotic gene in Arabidopsis. *Science* **285**, 585-587.
- Chanelière, S., Rivière, S., Scalliet, G., Szecsi, J., Jullien, F., Dolle, C., Vergne, P., Dumas, C., Bendahmane, M., Hugueney, P., and Cock, J.M. (2002).** Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. *FEBS Letters* **515**, 35-38.
- Chinchilla, D., Merchan, F., Megias, M., Kondorosi, A., Sousa, C., and Crespi, M. (2003).** Ankyrin protein kinases: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Mol. Biol.* **51**, 555-566.
- Chuang, C.F. and Meyerowitz, E.M. (2000).** Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4985-4990.
- Coen, E.S., Carpenter, R., and Martin, C. (1986).** Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* **47**, 285-296.
- Coen, E.S. and Meyerowitz, E.M. (1991).** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.
- Cormack, R.S. and Somssich, I.E. (1997).** Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA. *Gene* **194**, 273-276.
- Cosgrove, D.J. (1997).** Relaxation in a High-Stress Environment: The Molecular Bases of Extensible Cell Walls and Cell Enlargement. *Plant Cell* **9**, 1031-1041.
- Davies, B., Di Rosa, A., Eneva, T., Saedler, H., and Sommer, H. (1996).** Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS-box genes. *The Plant Journal* **10**, 663-677.

- Doyle, S.J. and Doyle, J.L. (1990).** Isolation of plant DNA fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Draghici, S. (2003)** *Data Analysis Tools for DNA Microarrays*. Chapman & Hall/CRC.
- Dudareva, N., Murfitt, L.M., Mann, C.J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C.M., Bonham, C., and Wood, K. (2000).** Developmental Regulation of Methyl Benzoate Biosynthesis and Emission in Snapdragon Flowers. *The Plant Cell* **12**, 949-961.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., and 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*. *The EMBO Journal* **18**, 5370-5379.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998).** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14863-14868.
- Fellenberg, K., Hauser, N.C., Brors, B., Hoheisel, J.D., and Vingron, M. (2002).** Microarray data warehouse allowing for inclusion of experiment annotations in statistical analysis. *Bioinformatics* **18**, 423-433.
- Fellenberg, K., Hauser, N.C., Brors, B., Neutzner, A., Hoheisel, J.D., and Vingron, M. (2001).** Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10781-10786.
- Fobert, P.R., Coen, E.S., Murphy, G.J., and Doonan, J.H. (1994).** Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *The EMBO Journal* **13**, 616-624.
- Friemert, C., Erfle, V., and Strauss, G. (1989).** Preparation of radiolabeled cDNA probes with high specific activity for rapid screening of gene expression. *Methods Mol. Cell. Biol.* **1**, 143-153.
- Galego, L. and Almeida, J. (2002).** Role of *DIVARICATA* in the control of dorsoventral asymmetry in *Antirrhinum* flowers. *Genes and Development* **16**, 880-891.
- Glover, B.J., Perez-Rodriguez, M., and Martin, C. (1998).** Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development* **125**, 3497-3508.
- Goodrich, J., Carpenter, R., and Coen, E.S. (1992).** A Common Gene Regulates Pigmentation Pattern in Diverse Plant Species. *Cell* **68**, 955-964.
- Goodwin, S.M., Kolosova, N., Kish, C.M., Wood, K., Dudareva, N., and Jenks, M.A. (2003).** Cuticle characteristics and volatile emissions of petals in *Antirrhinum majus*. *Physiologia Plantarum* **117**, 435-443.
- Guterman, I., Dafny-Yelin, M., Shalit, M., Emanuel, M., Shaham, N., Piestun, D., Zuker, A., Ovadis, M., Lavi, M., Lavid, N., Lewinsohn, E., Pichersky, E., Vainstein, A., Zamir, D., Adam, Z., and Weiss, D. (2001).** An integrated genomic approach to discovering fragrance-related genes in rose petals. *Flowering Newsletter* **32**, 31-37.
- Guterman, I., Shalit, M., Menda, N., Piestun, D., Dafny-Yelin, M., Shalev, G., Bar, E., Davydov, O., Ovadis, M., Emanuel, M., Wang, J., Adam, Z., Pichersky, E., Lewinsohn, E., Zamir, D., Vainstein, A., and Weiss, D. (2002).** Rose Scent: Genomics Approach to Discovering Novel Floral Fragrance-Related Genes. *Plant Cell* **14**, 2325-2338.
- Hertzberg, M., Aspeborg, H., Schrader, J., Andersson, A., Erlandsson, R., Blomqvist, K., Bhalerao, R., Uhlen, M., Teeri, T.T., Lundeberg, J., Sundberg, B., Nilsson, P., and Sandberg, G. (2001).** A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14732-14737.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999).** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE). *Nucleic Acid Research* **27**, 297-300.
- Hill, T.A., Day, C.D., Zondlo, S.C., Thackeray, A.G., and Irish, V.F. (1998).** Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA3. *Development* **125**, 1711-1721.

- Honma, T. and Goto, K. (2000).** The Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* **127**, 2021-2030.
- Honys, D. and Twell, D. (2003).** Comparative Analysis of the Arabidopsis Pollen Transcriptome. *PLANT PHYSIOLOGY* **132**, 640-652.
- Ito, T., Takahashi, N., Shimura, Y., and Okada, K. (1997).** A Serine/Threonine Protein Kinase Gene Isolated by an in vivo Binding Procedure Using the Arabidopsis Floral Homeotic Gene Produkt, AGAMOUS. *Plant Cell Physiol.* **38**, 248-258.
- Jackson, D., Roberts, K., and Martin, C. (1992).** Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant Journal* **2**, 425-434.
- Kay, Q.O.N. (1988).** More than the eye can see: the unexpected complexity of petal structure. *Plants today* 109-114.
- Kay, Q.O.N., Daoud, H.S., and Stirton, C.H. (1981).** Pigment distribution, light reflexion and cell structure in petals. *Bot. J. Linn. Soc.* **83**, 57-84.
- Kim, H.U., Wu, S.S.H., Ratnayake, C., and Huang, A.H.C. (2001).** Brassica rapa has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *PLANT PHYSIOLOGY* **126**, 330-341.
- Kotilainen, M., Helariutta, Y., Mehto, M., Pollanen, E., Albert, V.A., Elomaa, P., and Teeri, T.H. (1999).** GEG Participates in the Regulation of Cell and Organ Shape during Corolla and Carpel Development in *Gerbera hybrida*. *The Plant Cell* **11**, 1093-1104.
- Lohmann, J.U. and Weigel, D. (2002).** Building Beauty: The genetic control of floral patterning. *Developmental Cell* **2**, 135-142.
- Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., and Coen, E.S. (1999).** Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell* **99**, 367-376.
- Martin, C., Bhatt, K., Baumann, K., Jin, H., Zachgo, S., Roberts, K., Schwarz-Sommer, Z., Glover, B.J., and Perez-Rodrigues, M. (2002).** The mechanics of cell fate determination in petals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **357**, 809-813.
- Martin, C. and Gerats, T. (1993).** Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development. *The Plant Cell* **5**, 1253-1264.
- Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P., and Martin, C. (1994).** Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* **369**, 661-664.
- Orlando, V. (2000).** Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *TIBS* **25**, 99-104.
- Paxton, J. (1838).** Paxton's Magazine of Botany and Register of Flowering Plants. (*periodical Publications, London*) **5**, 55-56.
- Pyke, K.A. and Page, A.M. (1998).** Plastid Ontogeny during Petal Development in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* **116**, 803.
- Reale, L., Porceddu, A., Lanfaloni, L., Moretti, C., Zenoni, S., Pezzotti, M., Romano, B., and Ferranti, F. (2002).** Patterns of cell division and expansion in developing petals of *Petunia hybrida*. *Sex. Plant. Reprod.* **15**, 123-132.
- Riechman, J.L., Krizek, B.A., and Meyerowitz, E.M. (1996).** Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 4793-4798.

- Riechmann, J.L., Wang, M., and Meyerowitz, E.M. (1996).** DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research* **24**, 3134-3141.
- Sablowski, R.W.M. and 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, F. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Schwarz-Sommer, Z., Davies, B., and Hudson, A. (2003).** An everlasting pioneer: the story of *Antirrhinum* research. *Nature* **4**, 655-664.
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P., Hansen, H., Tetens, F., Lönnig, W.E., Saedler, H., and 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. *The EMBO Journal* **11**, 251-263.
- Shalon, D., Smith, S.J., and Brown, P.O. (1996).** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* **6**, 639-645.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., and Lukyanov, S.A. (1995).** An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **23**, 1087-1088.
- Sommer, H., Beltran, P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.E., Saedler, H., and 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. *The EMBO Journal* **9**, 605-613.
- Sommer, H., Nacken, W., Beltran, P., Huijser, P., Pape, H., Hansen, H., Flor, P., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z. (1991).** Properties of *deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*. *Development Supplement* **1**, 169-175.
- Sommer, H. and Saedler, H. (1986).** Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 429-434.
- Stubbe, H. (1966)** *Genetik und Zytologie von Antirrhinum L. sect. Antirrhinum*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Tang, W. and Perry, SE. (2003).** Binding site selection for the plant MADS-domain protein AGL15: an in vitro and in vivo study. *J Biol Chem.*
- Tilly, J.J., Allen, D.W., and 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.
- Tröbner, W., Raminéz, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönnig, W.E., Saedler, H., Sommer, H., and Schwarz-Sommer, Z. (1992).** GLOBOSA: a homeotic gene which interacts with DEFICIENS in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *The EMBO Journal* **11**, 4693-4704.
- Weiss, D. and Halevy, A.H. (1991).** The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in *Petunia* corollas. *Physiologia Plantarum* **81**, 127-133.
- Zachgo, S., de Andrade Silva, E., Motte, P., Tröbner, W., Saedler, H., and 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.
- Zik, M. and Irish, V.F. (2002).** Global Identification of Target Genes Regulated by *APETALA3* and *PISTILLATA* Floral Homeotic Gene Action. *The Plant Cell* **15**, 207-222.

7 Anhang

7.1 Sequenzen der Oligonukleotide

7.1.1 RT-PCR-Primer (nach Genen sortiert)

*DEFICIENS***Primer 275**

5' - TGAGAGCTTGAACGATCTGGGCTACG - 3'

Primer 276

5' - CAGAACACGCCAACATATTGTCATGG - 3'

*GLOBOSA***Primer 269**

5' - ACTACCACAAGCTCTCTGGGAAGAGG - 3'

Primer 270

5' - CCTGAAGATTAGGCTGCATTGGCTGG - 3'

*PALLIDA***Primer 271**

5' - CGAGAAGGAACCCATTTTGAATTCCC - 3'

Primer 272

5' - CAAAGTAAGTTCAATGATCGCCGTGG - 3'

*DEFT_{up} 1***Primer 455**

5' - TTCCCTTTGTAGTCGTGTGTTTC - 3'

Primer 456

5' - TCCAAGGATGGATTTTGGGAAG - 3'

*DEFT_{up} 2***Primer 467**

5' - GCTTTCACCTCTCTCCTTCTC - 3'

Primer 468

5' - GCAACAGAGATCCGAGACCG - 3'

*DELILA***Primer 273**

5' - CTTGAGAGGGCTTGAGAGGAAAGTCG - 3'

Primer 274

5' - CACTTGCTGATGCAACCTTCAATCCC - 3'

*BAMT***Primer 267**

5' - GGATGCAAGTGACTACACAGATGACG - 3'

Primer 268

5' - GCTGATCAGTTCACACCTCTGCAAC - 3'

*UPL2***Primer UPL2(F)**

5' - GCCGATGGAAGTATATGTTTGGACATC - 3'

Primer UPL2(R)

5' - CAAGTCTTACAAGACCTAGAAGCTCAA - 3'

*DEFT_{down} 1***Primer 471**

5' - ACTAGCAGCAATGGCAG - 3'

Primer 472

5' - AAGTGGAACCTTGATGTTTG - 3'

*DEFT_{down} 2***Primer 475**

5' - GACTTGTTGAGATTGAATCTTC - 3'

Primer 476

5' - CTTTTTCAGTCAAAAGTAGAG - 3'

*DEFTdown 3***Primer 477**

5' - CGATGCGCCTCCCCAC - 3'

Primer 478

5' - CGTCCTGCTTCCCACC - 3'

*DEFTdown 4***Primer 463**

5' - CTTATCACTCCCAATCTCTCAC - 3'

Primer 464

5' - AAGAAGTCTTCCAGTGGGCG - 3'

*RuBisCO kl. Untereinheit***Primer 453**

5' - CTTCTTCAATCGTTGCCTCTG - 3'

Primer 454

5' - GAACAACACATTCAGGTATTAAC - 3'

*Lipid Transfer Protein***Primer 473**

5' - GCTACTATCGCTGAAGCAGCC - 3'

Primer 474

5' - AGCCCATGGCTCCTGCAGAAG - 3'

*Naringenin 3-Dioxygenase***Primer 461**

5' - ATGGCTCCAATGCCAACATC - 3'

Primer 462

5' - GCAACTTCGAGTTCAGTTTC - 3'

*Myosin***Primer 457**

5' - CACCTCATTCTTCCCCACAC - 3'

Primer 458

5' - GTCACCGTTTCTCACTTAGCC - 3'

*unbekanntes Protein***Primer 465**

5' - CACCAATTACTGAGACCC - 3'

Primer 466

5' - CATAGCAGCAACAATAAGC - 3'

*CER1-ähnliches Gen***Primer 459**

5' - CTTTTCATAGAAAGGCACCTTC - 3'

Primer 460

5' - AGCTTGCCAAATTTTCTCAATATC - 3'

*NOI Protein***Primer 469**

5' - TCTCGAGGATTCATGTCTGGATAAG - 3'

Primer 470

5' - GCAAACATAATGCATAGGCAACAC - 3'

*Ran3 (GTPase)***Primer 116**

5' - CGAATCAACAAACGGTGGATTACCC - 3'

Primer 117

5' - GCCAAATCAATTTGCACTTCAGGTGG - 3'

7.1.2 EST-Adapterprimer

Adaptoren für 018_1_XX_xxx – 018_4_XX_xxx:

Primer 309

5' - TCGAGCGGCCGCCCCGGGCACCT - 3'

Primer 314

5' - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT - 3'

Adaptoren für 018_5_XX_xxx – 018_6_XX_xxx:

Primer AD22C

5' - CTATTCGATGATGAAGATACCCC - 3'

Primer AD21

5' - GGTTTTTCAGTATCTACGATTC - 3'

7.1.3 RAGE GSP-Primer

DEFTup 1

Primer 508 (GSP1)

5' - GAACACACGACTACAAAGGGAATGAACC - 3'

Primer 509 (GSP2)

5' - GAAGGGCAAGAGCCCCAAAAAGAAAGATG - 3'

DEFTup 2

Primer 510 (GSP1)

5' - CGACCTGGATACCGGCCTGACCAATGTG - 3'

Primer 511 (GSP2)

5' - GGAGAGAGGTGAAAGCAGAGGCGTTTGC - 3'

DEFTdown 1

Primer 516 (GSP1)

5' - CCAGCAACAGCTCCACTTAAGTTCAGC - 3'

Primer 517 (GSP2)

5' - CAGTGGCTGAGAATGAGTGAAGAACGAG - 3'

*DEFTdown 2***Primer 512 (GSP1)**

5' - GTTCAATTCCAGGATCCCCAGAAGATTC - 3'

Primer 513 (GSP2)

5' - CTCCACCTCTACGAAACCCTCTGTACG - 3'

*DEFTdown 3***Primer 514 (GSP1)**

5' - GTTAAAGCCATCCTGGCTCGAGTACTC - 3'

Primer 515 (GSP2)

5' - GCCTGGATACATCTGCATGTTTGTGAAC - 3'

*DEFTdown 4***Primer 518 (GSP1)**

5' - CGGCGGTGAGAGATTGGGAGTGATAAG - 3'

Primer 519 (GSP2)

5' - GATTCAACACAGAAGCCACTGCTGGAAG - 3'

7.1.4 Genomische Primer für X-ChIP-StudienX-ChIP-Primer von *DEFTup 1***Primer 591**

5' - CGAACATGCCACAGCTAAATAAC - 3'

Primer 740

5' - AAATGTCAATCTTCTCTACAAACTTGCGC - 3'

Primer 733

5' - GCTTGAATAATTCTACCTGAGTACTGCAAG - 3'

Primer 811

5' - AACAAATCTATTTACCACCTCTCGATACCC - 3'

Primer 737

5' - CACGAGAACCGAATCACGAACCCATG - 3'

Primer 509

5' - GAAGGGCAAGAGCCCCAAAAAGAAAGATG - 3'

X-ChIP-Primer von *DEFTdown 2***Primer 622**

5' - GATATTGTCGTGACTTTCCATGGGCCGG - 3'

Primer 513

5' - CTCCACCTCTACGAAACCCTCTGTACG - 3'

X-ChIP-Primer von *DEFTdown 3***Primer 619**

5' - GGAATCGAAAGGAAGGGCCCAAAGTATCTG - 3'

Primer 620

5' - GTGATGGATGCTACCTTACTCTGGAAAACG - 3'

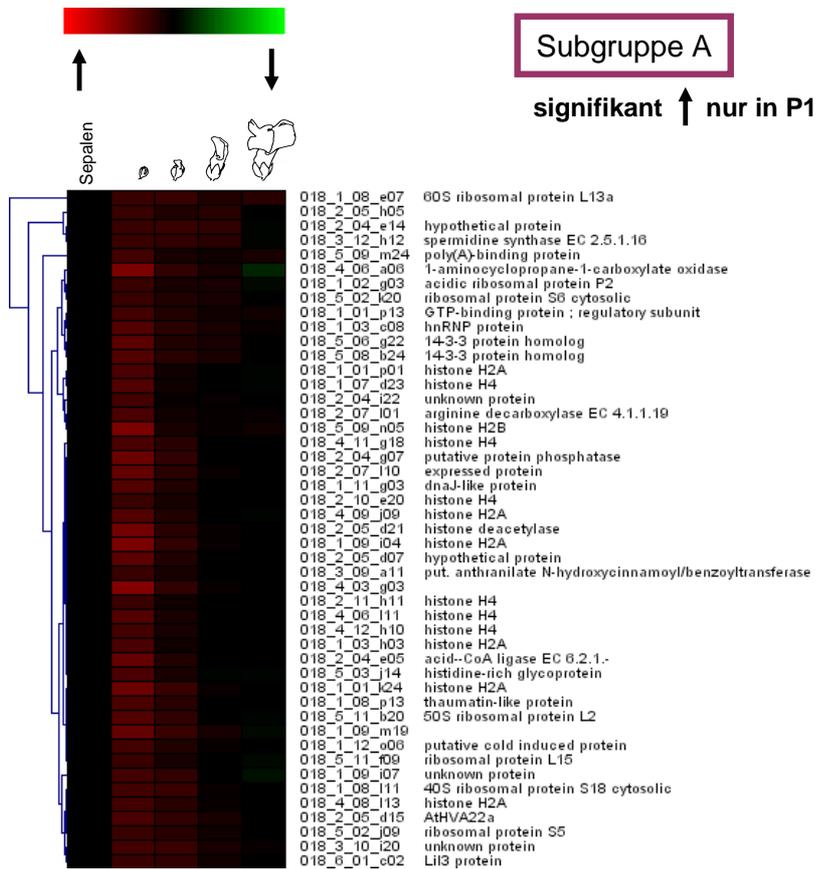
Primer 621

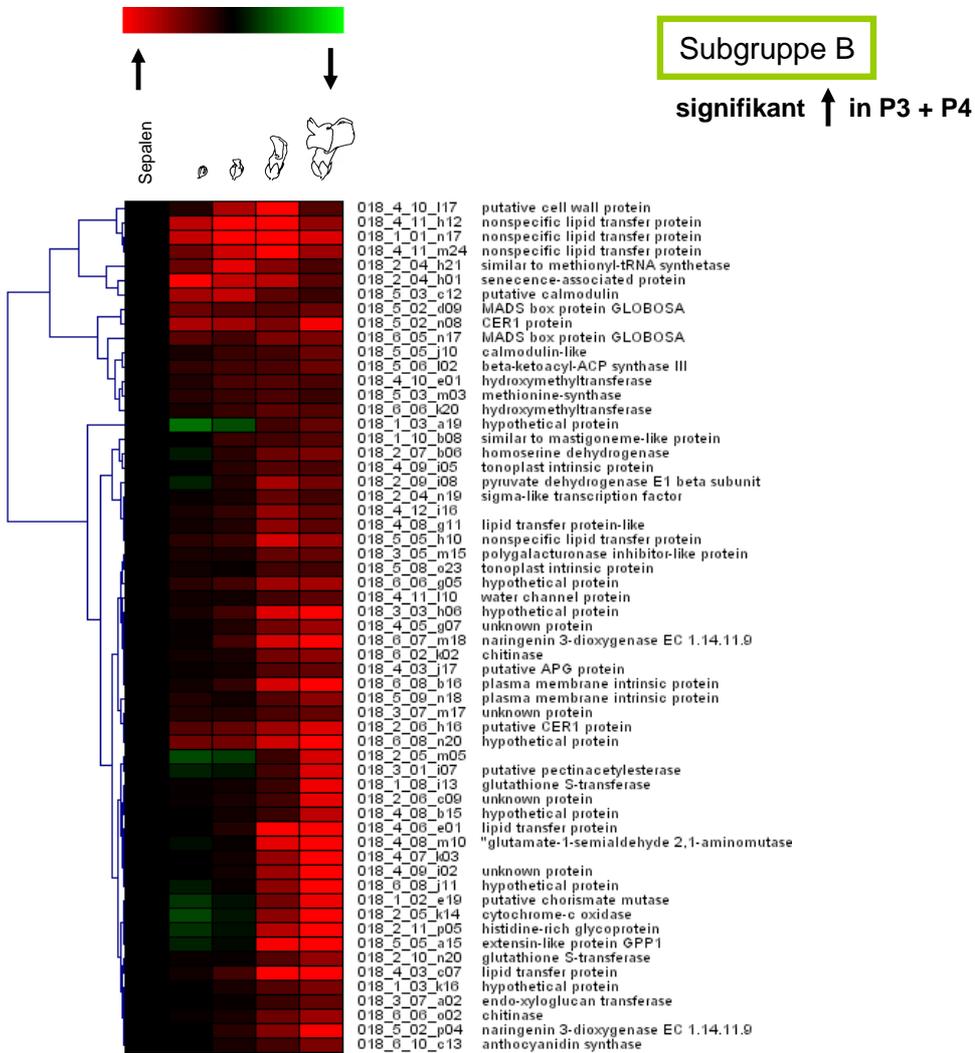
5' - CGTTTTCCAGAGTAAGGTAGCATCCATCAC - 3'

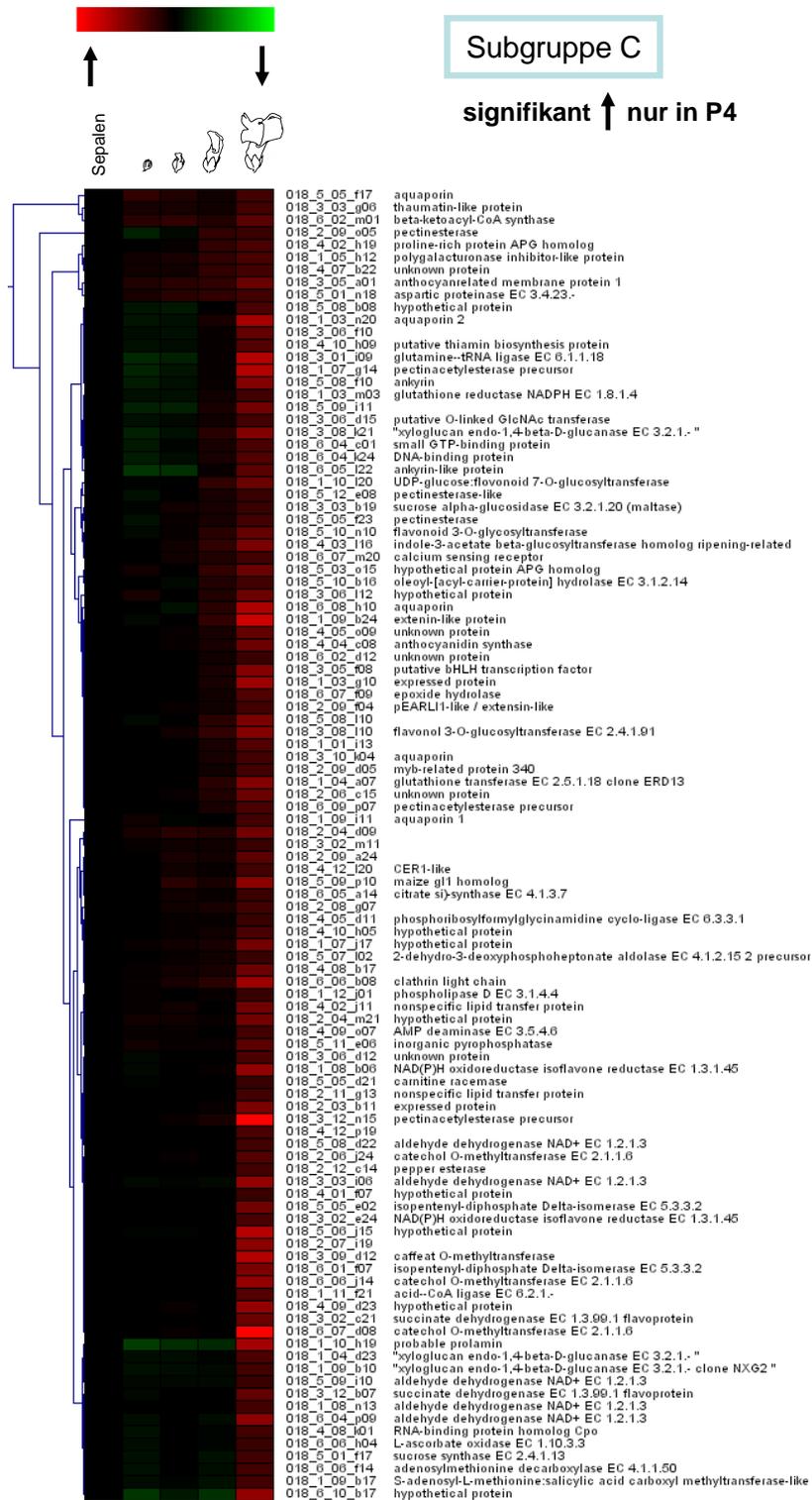
Primer 515

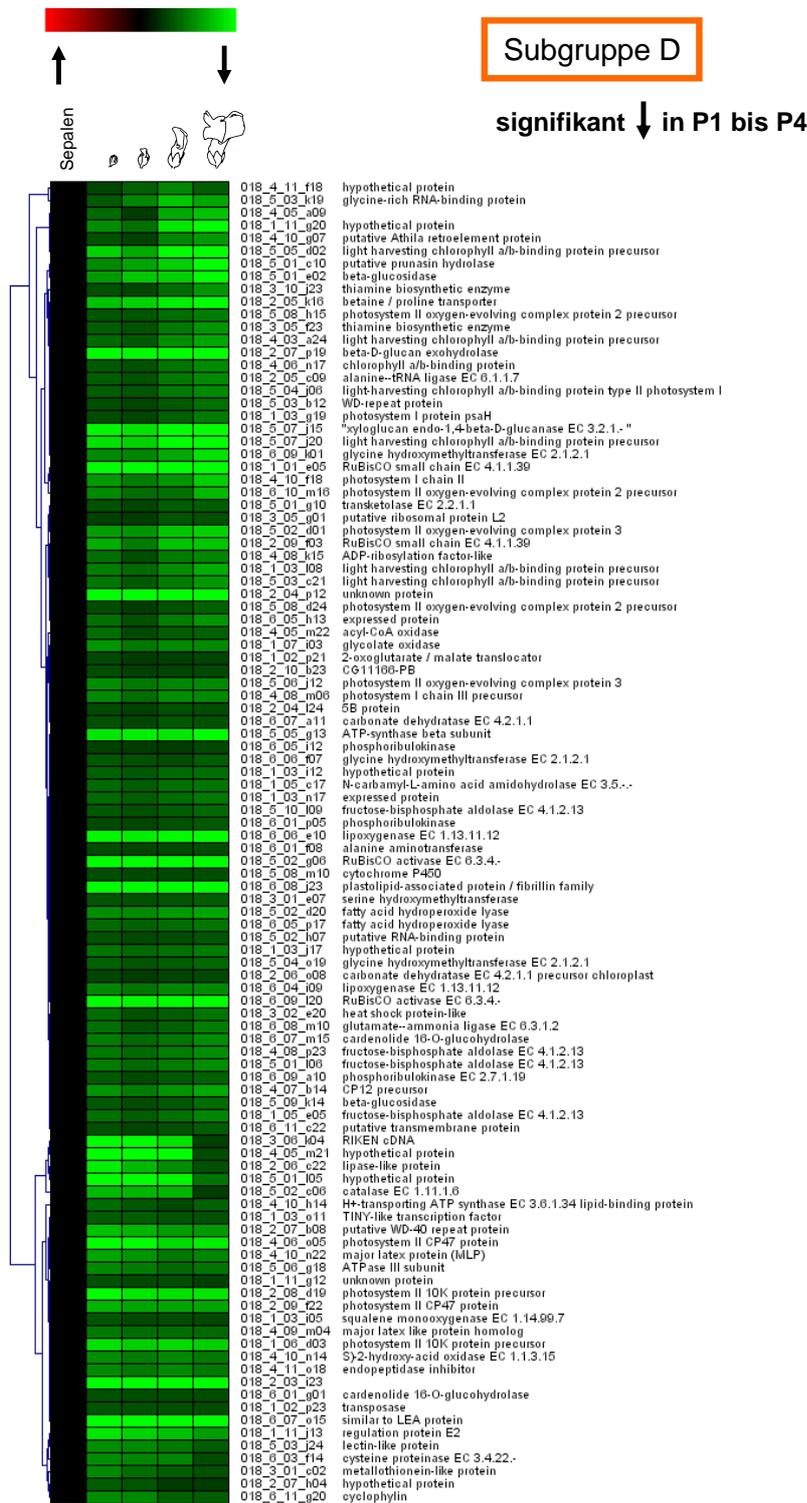
5' - GCCTGGATACATCTGCATGTTTGTGAAC - 3'

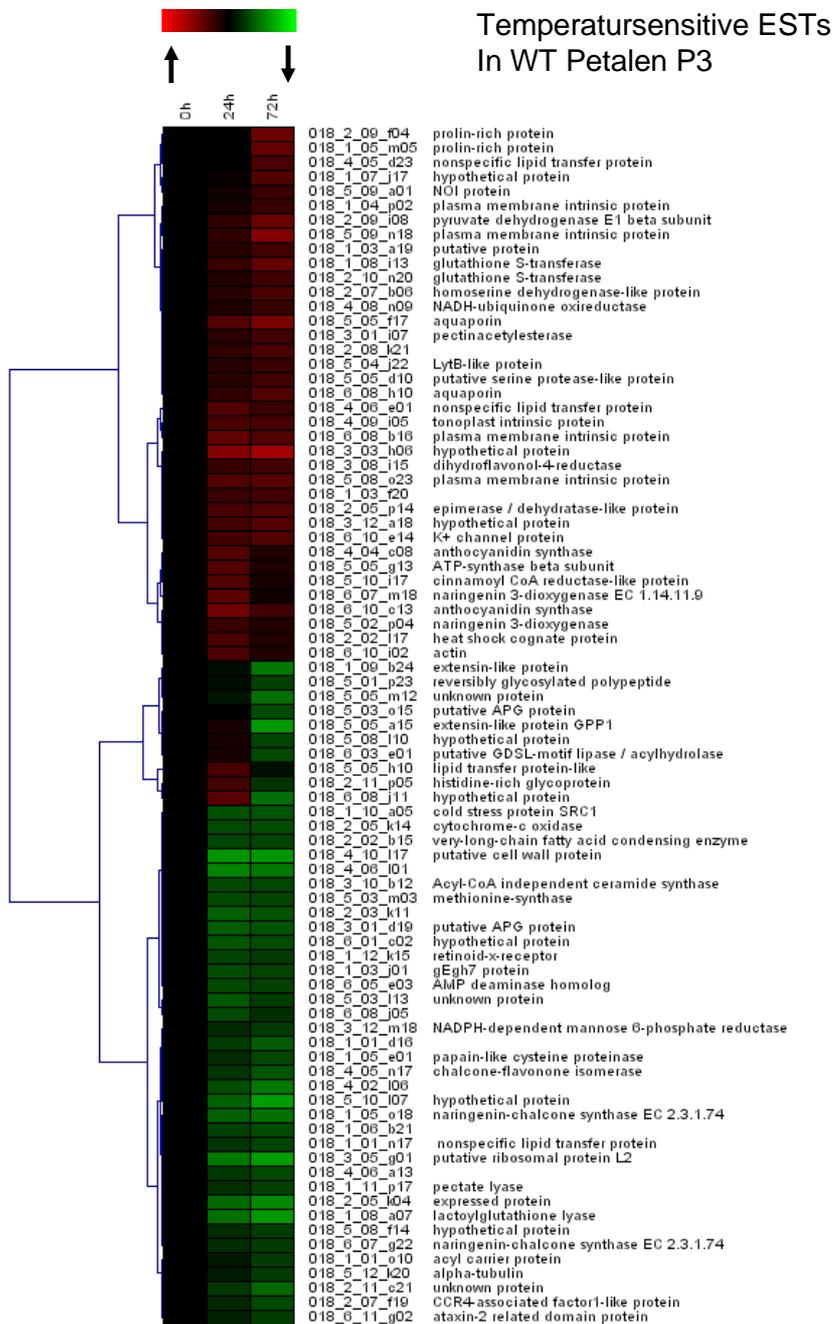
7.2 Hierarchische Cluster











7.3 Ergebnistabellen der Makroarray-Experimente

Datentabelle der 537 in WT Petalenstadien signifikant regulierten ESTs

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_1_01_d16	1	1.27	1.40	1.18	0.98	01_i18; 018_1_01_d16;
018_1_01_e05	1	0.29	0.38	0.27	0.17	01_a12; 018_1_01_e05; [ribulose-bisphosphate carboxylase EC 4.1.1.39 small chain precursor] Score = 766
018_1_01_e11	1	0.77	0.84	0.79	0.75	01_b01; 018_1_01_e11; [hypothetical protein CP12 precursor] Score = 17
018_1_01_f18	1	1.11	1.24	1.09	1.03	01_j01; 018_1_01_f18; [gibberellin-stimulated transcript 1 like protein] Score = 12
018_1_01_i13	1	1.00	1.02	1.10	1.28	01_b08; 018_1_01_i13;
018_1_01_j05	1	0.75	0.83	0.91	1.24	01_e23; 018_1_01_j05; [thioredoxin] Score = 41
018_1_01_k24	1	1.38	1.19	1.04	0.99	01_e05; 018_1_01_k24; [histone H2A] Score = 226
018_1_01_m03	1	1.29	1.26	1.10	1.01	01_a11; 018_1_01_m03;
018_1_01_n17	1	1.79	2.26	3.65	1.92	01_g14; 018_1_01_n17; [lipid transfer protein] Score = 173
018_1_01_p01	1	1.25	1.05	1.02	0.98	01_e12; 018_1_01_p01; [histone H2A] Score = 197
018_1_01_p13	1	1.23	1.11	1.07	1.05	01_g03; 018_1_01_p13;
018_1_02_b19	1	1.31	1.22	1.08	1.02	02_b15; 018_1_02_b19;
018_1_02_c08	1	1.33	1.34	1.33	1.12	01_n12; 018_1_02_c08;
018_1_02_e19	1	0.85	0.94	1.42	2.03	01_m04; 018_1_02_e19;
018_1_02_g03	1	1.21	1.10	1.09	0.97	01_k05; 018_1_02_g03; [acidic ribosomal protein P2] Score = 14
018_1_02_h06	1	0.93	0.93	1.35	0.94	02_c19; 018_1_02_h06;
018_1_02_l24	1	1.11	1.19	1.23	1.02	02_e20; 018_1_02_l24;
018_1_02_p21	1	0.80	0.83	0.82	0.81	02_c01; 018_1_02_p21; [conserved hypothetical protein] Score = 18
018_1_02_p23	1	0.77	0.78	0.78	0.79	02_c04; 018_1_02_p23; [transposase] Score = 2
018_1_03_a10	1	1.34	1.25	1.12	1.04	02_i10; 018_1_03_a10;
018_1_03_a19	1	0.71	0.79	1.23	1.35	02_g22; 018_1_03_a19;
018_1_03_c08	1	1.28	1.13	1.10	1.04	02_i05; 018_1_03_c08;
018_1_03_c19	1	0.62	0.63	0.63	0.91	02_g23; 018_1_03_c19; [gibberellin-regulated protein] Score = 28
018_1_03_e07	1	0.79	0.84	0.78	0.75	02_f14; 018_1_03_e07; [photosystem I chain psaN] Score = 12
018_1_03_f20	1	0.77	0.84	0.99	1.13	02_p03; 018_1_03_f20;
018_1_03_g10	1	1.01	1.01	1.09	1.61	02_i12; 018_1_03_g10;
018_1_03_g19	1	0.79	0.81	0.74	0.68	02_g24; 018_1_03_g19; [photosystem I protein psaH precursor] Score = 28
018_1_03_h03	1	1.25	1.07	1.00	1.00	02_k16; 018_1_03_h03; [histone H2A] Score = 197
018_1_03_i05	1	0.77	0.80	0.79	0.80	02_f09; 018_1_03_i05; [squalene monooxygenase EC 1.14.99.7] Score = 25
018_1_03_i12	1	0.74	0.76	0.73	0.72	02_i17; 018_1_03_i12;
018_1_03_j01	1	0.83	0.81	0.90	1.39	02_k10; 018_1_03_j01;
018_1_03_j17	1	0.70	0.73	0.71	0.68	02_m07; 018_1_03_j17; [hypothetical protein F28A21.20] Score = 4
018_1_03_k05	1	0.73	0.76	0.79	0.88	02_f10; 018_1_03_k05; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_1_03_k16	1	0.99	1.08	1.28	1.45	02_j08; 018_1_03_k16;
018_1_03_l08	1	0.68	0.73	0.65	0.59	02_n22; 018_1_03_l08; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor]
018_1_03_m03	1	0.94	0.95	1.06	1.22	02_f05; 018_1_03_m03; [glutathione reductase NADPH EC 1.8.1.4] Score = 227
018_1_03_n17	1	0.73	0.75	0.72	0.69	02_m08; 018_1_03_n17;
018_1_03_n20	1	0.93	0.95	1.10	1.63	02_p07; 018_1_03_n20; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 189
018_1_03_o11	1	0.75	0.75	0.77	0.78	02_g07; 018_1_03_o11; [hypothetical protein] Score = 63
018_1_04_a07	1	1.00	1.02	1.13	1.48	03_a11; 018_1_04_a07; [glutathione transferase EC 2.5.1.18 clone ERD13]
018_1_04_d23	1	0.96	0.96	0.98	1.26	03_e22; 018_1_04_d23; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_1_04_e05	1	0.74	0.77	0.75	1.03	03_a06; 018_1_04_e05;
018_1_04_p02	1	1.20	1.26	1.13	1.19	03_f05; 018_1_04_p02; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 76
018_1_05_c09	1	0.86	0.83	0.74	0.73	03_h16; 018_1_05_c09;
018_1_05_c17	1	0.73	0.75	0.71	0.70	03_i10; 018_1_05_c17; [N-carbamyl-L-amino acid amidohydrolase EC 3.5.-.-]
018_1_05_e05	1	0.71	0.75	0.71	0.67	03_h06; 018_1_05_e05; [fructose-bisphosphate aldolase EC 4.1.2.13] Score = 186
018_1_05_e17	1	0.93	0.87	0.77	0.69	03_i11; 018_1_05_e17; [reductase NADPH EC 1.6.4.5 / thioredoxin] Score = 78
018_1_05_h12	1	1.07	1.10	1.18	1.26	03_o02; 018_1_05_h12; [DRT100 protein precursor] Score = 8
018_1_06_d03	1	0.51	0.54	0.52	0.54	04_a09; 018_1_06_d03; [photosystem II 10K protein precursor] Score = 34
018_1_06_e03	1	0.96	0.98	1.67	0.99	03_p04; 018_1_06_e03;
018_1_07_c04	1	0.83	0.91	0.86	0.92	04_d02; 018_1_07_c04; [glutamate decarboxylase EC 4.1.1.15 2 calmodulin-binding]
018_1_07_d23	1	1.30	1.06	1.00	0.98	04_g10; 018_1_07_d23; [histone H4] Score = 160
018_1_07_g14	1	0.89	0.93	1.04	1.71	04_d20; 018_1_07_g14; [pectinacetylsterase precursor] Score = 15

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_1_07_i03	1	0.64	0.69	0.66	0.66	04_b01; 018_1_07_i03; [S)-2-hydroxy-acid oxidase EC 1.1.3.15] Score = 46
018_1_07_j17	1	1.04	1.06	1.08	1.41	04_g01; 018_1_07_j17;
018_1_08_a07	1	0.94	0.81	0.81	0.81	04_j22; 018_1_08_a07; [lactoylglutathione lyase EC 4.4.1.5] Score = 36
018_1_08_b06	1	0.97	1.00	1.04	1.55	04_o24; 018_1_08_b06; [NAD(P)H oxidoreductase isoflavone reductase EC 1.3.1.45]
018_1_08_e07	1	1.20	1.20	1.12	1.15	04_j24; 018_1_08_e07; [50S ribosomal protein L13a] Score = 42
018_1_08_i13	1	1.03	1.06	1.20	2.03	04_j17; 018_1_08_i13; [glutathione transferase EC 2.5.1.18 clone ERD13]
018_1_08_l11	1	1.24	1.19	1.04	1.01	04_n21; 018_1_08_l11; [30S ribosomal protein S18 cytosolic] Score = 42
018_1_08_n13	1	0.99	1.01	0.99	1.22	04_n24; 018_1_08_n13; [aldehyde dehydrogenase NAD+ EC 1.2.1.3] Score = 241
018_1_08_p13	1	1.25	1.14	1.02	1.00	04_o01; 018_1_08_p13; [thaumatin-like protein] Score = 82
018_1_09_b10	1	0.95	0.96	0.97	1.23	05_g22; 018_1_09_b10; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.- clone NXG2]
018_1_09_b17	1	0.96	0.98	0.95	1.22	05_f14; 018_1_09_b17; [hypothetical protein M3E9.150] Score = 4
018_1_09_b24	1	0.97	1.02	1.16	1.84	05_i02; 018_1_09_b24;
018_1_09_i04	1	1.45	1.16	1.04	1.02	05_c13; 018_1_09_i04; [histone H2A] Score = 226
018_1_09_i07	1	1.22	1.18	1.00	0.95	05_b02; 018_1_09_i07;
018_1_09_i11	1	1.05	0.98	1.01	1.24	05_b10; 018_1_09_i11; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 186
018_1_09_m19	1	1.36	1.19	1.08	0.97	05_b24; 018_1_09_m19;
018_1_10_a08	1	0.98	1.01	1.13	1.36	05_k24; 018_1_10_a08; [glutathione transferase EC 2.5.1.18 clone ERD13]
018_1_10_b08	1	0.99	1.19	1.23	1.28	05_o19; 018_1_10_b08;
018_1_10_f06	1	1.33	1.28	1.32	1.10	05_o16; 018_1_10_f06; [pEARLI 1 protein] Score = 68
018_1_10_f13	1	1.34	1.26	1.34	1.05	05_n05; 018_1_10_f13; [hypothetical protein T20K24.8] Score = 4
018_1_10_h19	1	0.83	0.87	0.88	1.63	05_n21; 018_1_10_h19;
018_1_10_k07	1	1.56	1.48	1.52	1.12	05_i21; 018_1_10_k07; [pEARLI 1 protein] Score = 54
018_1_10_k11	1	1.64	1.61	1.45	1.16	05_j07; 018_1_10_k11; [MADS box protein] Score = 280
018_1_10_l20	1	0.98	0.99	1.17	1.39	05_p22; 018_1_10_l20; [indole-3-acetate beta-glucosyltransferase homolog]
018_1_11_d10	1	0.86	0.79	0.66	0.61	06_g19; 018_1_11_d10; [cinnamyl-alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.195] Score = 134
018_1_11_e04	1	0.90	0.86	0.80	0.78	06_c13; 018_1_11_e04; [cinnamyl-alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.195] Score = 109
018_1_11_e18	1	0.78	0.82	0.85	1.04	06_d17; 018_1_11_e18; [translation initiation factor eIF-2A] Score = 18
018_1_11_f10	1	0.83	0.78	0.82	0.98	06_g20; 018_1_11_f10; [dnaK-type molecular chaperone] Score = 491
018_1_11_f21	1	1.01	1.02	1.01	1.28	06_f24; 018_1_11_f21; [acid--CoA ligase EC 6.2.1.-] Score = 310
018_1_11_g03	1	1.28	1.12	1.01	1.00	06_a10; 018_1_11_g03;
018_1_11_g12	1	0.78	0.80	0.79	0.82	06_d10; 018_1_11_g12; [RNA-binding protein] Score = 144
018_1_11_g20	1	0.65	0.71	0.50	0.43	06_d23; 018_1_11_g20;
018_1_11_j13	1	0.50	0.53	0.56	0.62	06_f11; 018_1_11_j13;
018_1_12_e22	1	0.73	0.77	0.81	1.06	06_l13; 018_1_12_e22; [translation initiation factor eIF-2A] Score = 18
018_1_12_f15	1	0.75	0.77	0.80	0.84	06_n09; 018_1_12_f15;
018_1_12_j01	1	1.03	1.02	1.04	1.20	06_m03; 018_1_12_j01; [phospholipase D EC 3.1.4.4] Score = 52
018_1_12_k15	1	1.15	1.21	1.10	1.02	06_j06; 018_1_12_k15;
018_1_12_o06	1	1.22	1.12	1.04	0.99	06_k08; 018_1_12_o06; [ribosomal protein L13] Score = 36
018_2_02_l17	1	0.83	0.76	0.84	0.99	07_e12; 018_2_02_l17; [dnaK-type molecular chaperone] Score = 491
018_2_02_p22	1	1.12	1.22	1.22	1.06	07_g05; 018_2_02_p22; [gibberellin-regulated protein] Score = 24
018_2_03_a06	1	0.92	0.86	0.71	0.68	07_i14; 018_2_03_a06; [cinnamyl-alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.195] Score = 86
018_2_03_a21	1	1.11	1.22	0.94	0.78	07_h20; 018_2_03_a21;
018_2_03_b11	1	1.01	1.02	1.04	1.45	07_k22; 018_2_03_b11;
018_2_03_f01	1	0.96	0.92	0.86	0.83	07_k06; 018_2_03_f01;
018_2_03_i23	1	0.32	0.32	0.34	0.35	07_i03; 018_2_03_i23;
018_2_03_k11	1	1.13	1.33	1.03	1.04	07_h01; 018_2_03_k11;
018_2_04_b16	1	0.81	0.87	1.08	1.26	08_f21; 018_2_04_b16; [glutamate--ammonia ligase EC 6.3.1.2] Score = 295
018_2_04_d09	1	1.08	1.13	1.11	1.42	08_c20; 018_2_04_d09;
018_2_04_e05	1	1.34	1.11	1.01	1.02	07_o03; 018_2_04_e05; [acid--CoA ligase EC 6.2.1.-] Score = 238
018_2_04_e14	1	1.20	1.19	1.16	0.98	08_a24; 018_2_04_e14;
018_2_04_f23	1	0.89	0.82	0.64	0.60	08_e11; 018_2_04_f23;
018_2_04_g07	1	1.38	1.17	1.02	1.02	07_o09; 018_2_04_g07;
018_2_04_h01	1	2.15	1.81	1.74	1.32	08_c03; 018_2_04_h01; [hypothetical protein F16G20.110] Score = 6
018_2_04_h02	1	1.37	1.34	1.15	1.17	08_e15; 018_2_04_h02;
018_2_04_h21	1	1.37	1.97	1.50	1.25	08_e05; 018_2_04_h21;

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_2_04_i19	1	0.87	0.86	0.85	0.81	07_p14; 018_2_04_i19;
018_2_04_i22	1	1.23	1.03	1.04	1.02	08_b20; 018_2_04_i22;
018_2_04_j13	1	0.72	0.72	0.76	0.97	08_d05; 018_2_04_j13; [DNA-binding homeotic protein] Score = 63
018_2_04_l06	1	1.14	1.21	1.10	1.01	08_f02; 018_2_04_l06;
018_2_04_l24	1	0.80	0.82	0.78	0.79	08_g18; 018_2_04_l24; [5B protein] Score = 3
018_2_04_m15	1	1.15	1.24	1.14	1.05	07_p08; 018_2_04_m15;
018_2_04_m21	1	1.05	1.05	1.04	1.40	07_p19; 018_2_04_m21; [hypothetical protein T5C23.170] Score = 7
018_2_04_n19	1	1.04	1.10	1.35	1.22	08_d24; 018_2_04_n19; [transcription initiation factor sigma 70] Score = 105
018_2_04_p12	1	0.33	0.40	0.31	0.24	08_f15; 018_2_04_p12; [hypothetical protein] Score = 12
018_2_05_c09	1	0.75	0.78	0.69	0.66	08_h11; 018_2_05_c09; [alanine--tRNA ligase EC 6.1.1.7] Score = 5
018_2_05_d07	1	1.33	1.12	1.02	1.01	08_l02; 018_2_05_d07;
018_2_05_d15	1	1.25	1.18	1.08	1.02	08_l16; 018_2_05_d15;
018_2_05_d21	1	1.43	1.14	1.04	1.01	08_m01; 018_2_05_d21; [transcription regulator RPD3 protein homolog] Score = 16
018_2_05_e08	1	0.76	0.78	0.78	0.85	08_i21; 018_2_05_e08; [DNA-directed RNA polymerase EC 2.7.7.6 II 35.5K chain]
018_2_05_h05	1	1.20	1.11	1.13	0.99	08_k22; 018_2_05_h05;
018_2_05_h19	1	0.98	0.96	0.92	0.76	08_l24; 018_2_05_h19; [retrovirus-related pol polyprotein homolog] Score = 33
018_2_05_k04	1	1.08	1.35	2.82	1.07	08_i14; 018_2_05_k04;
018_2_05_k14	1	0.81	0.93	1.52	2.23	08_j11; 018_2_05_k14; [cytochrome-c oxidase EC 1.9.3.1 chain VIb] Score = 22
018_2_05_k16	1	0.56	0.53	0.49	0.41	08_j16; 018_2_05_k16;
018_2_05_k19	1	0.91	0.84	0.74	0.62	08_i03; 018_2_05_k19;
018_2_05_m05	1	0.80	0.83	1.20	1.87	08_h07; 018_2_05_m05;
018_2_05_n03	1	1.19	1.26	1.15	1.07	08_k18; 018_2_05_n03; [serine/threonine-specific protein kinase EC 2.7.1.- BKIN12 version 2] Score = 65
018_2_05_o24	1	0.87	0.92	0.83	0.89	08_k13; 018_2_05_o24;
018_2_05_p20	1	0.35	0.42	0.56	0.85	08_n18; 018_2_05_p20;
018_2_06_b09	1	1.03	1.09	1.28	1.19	09_c01; 018_2_06_b09; [cell division control protein] Score = 37
018_2_06_c09	1	1.03	1.09	1.22	2.00	08_o07; 018_2_06_c09;
018_2_06_c15	1	1.01	1.03	1.12	1.38	08_o14; 018_2_06_c15;
018_2_06_c22	1	0.49	0.57	0.65	0.78	09_a22; 018_2_06_c22; [secreted glycoprotein EP4 47K precursor] Score = 12
018_2_06_h04	1	1.01	1.00	1.53	0.99	09_d13; 018_2_06_h04;
018_2_06_h16	1	1.28	1.34	1.60	1.91	09_e18; 018_2_06_h16; [hypothetical protein F13M22.20] Score = 5
018_2_06_j24	1	1.02	1.03	0.99	1.29	09_f16; 018_2_06_j24; [catechol O-methyltransferase EC 2.1.1.6] Score = 31
018_2_06_o08	1	0.81	0.83	0.81	0.80	08_p22; 018_2_06_o08; [carbonate dehydratase EC 4.2.1.1 precursor chloroplast]
018_2_07_b06	1	0.92	1.13	1.38	1.45	09_k04; 018_2_07_b06; [2.7.2.4 / homoserine dehydrogenase EC 1.1.1.3 precursor]
018_2_07_b08	1	0.56	0.58	0.62	0.63	09_k07; 018_2_07_b08;
018_2_07_e23	1	0.85	0.89	0.81	0.71	09_h14; 018_2_07_e23; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor]
018_2_07_f19	1	1.42	1.59	1.26	0.96	09_j03; 018_2_07_f19; [POP2 protein] Score = 3
018_2_07_h03	1	1.18	1.20	1.15	1.01	09_h22; 018_2_07_h03; [phosphoprotein phosphatase EC 3.1.3.16 2A regulatory subunit of PP2A-like protein] Score = 21
018_2_07_h04	1	0.75	0.77	0.83	0.83	09_j24; 018_2_07_h04; [hypothetical protein M4E13.130] Score = 4
018_2_07_i19	1	1.00	1.00	1.00	1.52	09_h05; 018_2_07_i19; ***
018_2_07_l01	1	1.25	1.07	1.03	1.03	09_h21; 018_2_07_l01; [arginine decarboxylase EC 4.1.1.19] Score = 54
018_2_07_l10	1	1.36	1.15	1.03	1.02	09_k14; 018_2_07_l10; [hypothetical protein YOR145c] Score = 4
018_2_07_l18	1	1.23	1.31	1.33	1.11	09_l04; 018_2_07_l18;
018_2_07_p19	1	0.45	0.47	0.35	0.29	09_j07; 018_2_07_p19; [glucan 1,3-beta-glucosidase EC 3.2.1.58 Exoll] Score = 10
018_2_08_a21	1	1.28	1.46	1.15	0.99	09_n18; 018_2_08_a21; [gibberellin-regulated protein GAS2 precursor] Score = 18
018_2_08_d19	1	0.46	0.50	0.51	0.50	10_b18; 018_2_08_d19; [photosystem II 10K protein precursor] Score = 34
018_2_08_g07	1	1.01	1.06	1.08	1.24	09_m08; 018_2_08_g07;
018_2_08_g22	1	1.22	1.47	1.33	1.11	09_p23; 018_2_08_g22;
018_2_08_m14	1	0.87	0.92	0.85	0.82	09_p01; 018_2_08_m14; [photosystem I chain psaN] Score = 12
018_2_08_p24	1	1.28	1.51	1.45	1.00	10_d20; 018_2_08_p24;
018_2_09_a24	1	0.99	1.08	1.07	1.32	10_i07; 018_2_09_a24;
018_2_09_d05	1	1.01	1.01	1.07	1.23	10_j22; 018_2_09_d05; [maize myb-related protein] Score = 243
018_2_09_d22	1	0.78	0.83	1.01	1.17	10_m15; 018_2_09_d22;
018_2_09_f03	1	0.59	0.68	0.56	0.55	10_i17; 018_2_09_f03;
018_2_09_f04	1	0.99	1.03	1.07	1.23	10_l03; 018_2_09_f04;
018_2_09_f22	1	0.58	0.61	0.61	0.61	10_m16; 018_2_09_f22; [photosystem II chlorophyll a-binding protein psbB]

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_2_09_i08	1	0.90	1.11	1.65	1.42	10_g19; 018_2_09_i08; [pyruvate dehydrogenase lipoamide EC 1.2.4.1 beta chain]
018_2_09_o05	1	0.90	0.97	1.18	1.21	10_e12; 018_2_09_o05; [L-ascorbate oxidase EC 1.10.3.3] Score = 41
018_2_10_b07	1	0.81	0.84	0.86	0.97	11_a16; 018_2_10_b07; [aminopeptidase-like protein] Score = 3
018_2_10_b23	1	0.79	0.82	0.81	0.80	11_c01; 018_2_10_b23;
018_2_10_e20	1	1.21	1.09	1.01	1.00	10_p21; 018_2_10_e20; [histone H4] Score = 160
018_2_10_i01	1	0.77	0.78	0.79	0.86	10_m23; 018_2_10_i01; [cysteine proteinase EC 3.4.22.- precursor] Score = 572
018_2_10_n20	1	1.03	1.03	1.30	1.54	11_d20; 018_2_10_n20; [glutathione transferase EC 2.5.1.18 clone ERD13]
018_2_11_c21	1	1.13	1.45	2.22	1.01	11_f13; 018_2_11_c21;
018_2_11_f21	1	1.13	1.21	1.25	1.05	11_j05; 018_2_11_f21; [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC 1.2.1.12]
018_2_11_g13	1	1.01	1.02	1.02	1.24	11_e24; 018_2_11_g13;
018_2_11_h11	1	1.20	1.07	1.01	1.00	11_i06; 018_2_11_h11; [histone H4] Score = 160
018_2_11_i13	1	0.84	0.91	0.84	0.82	11_f01; 018_2_11_i13; [phosphoribulokinase EC 2.7.1.19] Score = 24
018_2_11_p05	1	0.86	0.94	1.73	2.60	11_h20; 018_2_11_p05;
018_2_12_c14	1	1.00	1.02	0.99	1.24	11_o14; 018_2_12_c14; [aryl-acylamidase EC 3.5.1.-) 50K hepatic] Score = 16
018_2_12_f15	1	1.09	1.14	1.05	0.58	12_a19; 018_2_12_f15;
018_2_12_h23	1	0.84	0.86	0.81	0.77	12_b16; 018_2_12_h23; [photosystem II protein psbW] Score = 10
018_2_12_j17	1	0.83	0.87	0.91	1.16	12_a24; 018_2_12_j17;
018_2_12_p07	1	1.16	1.23	1.10	1.00	12_a04; 018_2_12_p07;
018_3_01_b16	1	0.81	0.83	0.84	1.01	12_l17; 018_3_01_b16;
018_3_01_c02	1	0.66	0.72	0.75	0.78	12_g12; 018_3_01_c02; [metallothionein-like protein] Score = 3
018_3_01_d19	1	1.05	1.34	1.55	1.02	12_k05; 018_3_01_d19; [hypothetical protein APG homolog T27E13.4] Score = 46
018_3_01_e07	1	0.77	0.78	0.77	0.75	12_e20; 018_3_01_e07; [glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1] Score = 211
018_3_01_i07	1	0.90	0.93	1.22	1.92	12_e22; 018_3_01_i07; [pectinacetylsterase precursor] Score = 15
018_3_01_i09	1	0.88	0.90	1.03	1.72	12_f01; 018_3_01_i09; [glutamine--tRNA ligase EC 6.1.1.18] Score = 5
018_3_02_c21	1	1.00	1.02	1.01	1.39	12_o18; 018_3_02_c21; [of succinate dehydrogenase EC 1.3.99.1 flavoprotein]
018_3_02_e20	1	0.72	0.78	0.75	0.70	13_a21; 018_3_02_e20;
018_3_02_e24	1	0.99	1.00	1.01	1.27	13_b05; 018_3_02_e24; [NAD(P)H oxidoreductase isoflavone reductase EC 1.3.1.45]
018_3_02_m11	1	1.04	1.05	1.05	1.20	12_n20; 018_3_02_m11;
018_3_03_b18	1	0.70	0.74	0.94	1.00	14_a11; 018_3_03_b18;
018_3_03_b19	1	0.98	1.05	1.10	1.21	13_n18; 018_3_03_b19; [sucrose alpha-glucosidase EC 3.2.1.20] Score = 52
018_3_03_g06	1	1.10	1.10	1.06	1.24	13_j09; 018_3_03_g06; [thaumatin-like protein] Score = 82
018_3_03_h06	1	1.09	1.23	1.92	2.35	13_p03; 018_3_03_h06; [hypothetical protein F14M19.50] Score = 7
018_3_03_i06	1	0.97	0.98	0.97	1.55	13_j10; 018_3_03_i06; [aldehyde dehydrogenase NAD+ EC 1.2.1.3] Score = 369
018_3_04_a04	1	0.86	0.91	1.01	0.82	14_e10; 018_3_04_a04;
018_3_04_f02	1	1.22	1.14	1.23	1.07	14_j23; 018_3_04_f02;
018_3_04_g15	1	1.08	1.16	1.30	1.03	14_c21; 018_3_04_g15; [hypothetical protein F17K2.14] Score = 7
018_3_05_a01	1	1.11	1.14	1.18	1.37	14_m02; 018_3_05_a01;
018_3_05_f08	1	1.02	1.01	1.10	1.48	15_e12; 018_3_05_f08; [hypothetical protein T4L20.110] Score = 10
018_3_05_f23	1	0.75	0.78	0.69	0.64	15_d17; 018_3_05_f23; [thiamine biosynthetic enzyme thi1-2] Score = 18
018_3_05_g01	1	0.82	0.83	0.77	0.78	14_m05; 018_3_05_g01;
018_3_05_m15	1	1.08	1.09	1.36	1.35	14_n20; 018_3_05_m15; [disease resistance protein] Score = 122
018_3_06_d12	1	0.97	1.00	1.01	1.27	16_a19; 018_3_06_d12;
018_3_06_d15	1	0.94	0.97	1.06	1.24	15_o02; 018_3_06_d15; [conserved hypothetical protein MTH83] Score = 9
018_3_06_f10	1	0.96	0.95	1.04	1.34	16_a12; 018_3_06_f10;
018_3_06_h21	1	0.51	0.59	0.64	1.03	15_o22; 018_3_06_h21; [hypothetical protein F4B14.30] Score = 7
018_3_06_k04	1	0.37	0.40	0.51	0.82	15_j23; 018_3_06_k04;
018_3_06_l12	1	1.09	1.01	1.12	1.37	16_a23; 018_3_06_l12; [hypothetical protein F13M23.170] Score = 4
018_3_07_a02	1	1.01	1.04	1.20	1.34	16_e23; 018_3_07_a02; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_3_07_m17	1	1.12	1.12	1.27	1.36	16_e05; 018_3_07_m17;
018_3_08_k21	1	0.90	0.95	1.14	1.47	16_p22; 018_3_08_k21; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_3_08_l10	1	1.01	1.05	1.18	1.50	17_g20; 018_3_08_l10; [flavonol 3-O-glucosyltransferase EC 2.4.1.91 allele BzMcC2]
018_3_09_a11	1	1.21	1.08	1.01	1.00	17_j12; 018_3_09_a11; [hsr201 protein hypersensitivity-related] Score = 6
018_3_09_d12	1	1.01	1.01	1.01	1.71	18_b03; 018_3_09_d12; [catechol O-methyltransferase EC 2.1.1.6] Score = 23
018_3_09_e14	1	0.85	0.89	0.78	0.74	17_m05; 018_3_09_e14; [conserved hypothetical protein] Score = 17
018_3_10_b12	1	0.76	0.86	0.64	0.58	18_m02; 018_3_10_b12; [membrane protein T10I14.160] Score = 11

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_3_10_f19	1	1.41	1.36	1.13	0.99	18_k02; 018_3_10_f19; [hypothetical protein APG homolog F16A16.110] Score = 45
018_3_10_g20	1	1.35	1.21	1.10	0.99	18_h06; 018_3_10_g20; [casein kinase I EC 2.7.1.-] Score = 138
018_3_10_i20	1	1.24	1.20	1.10	1.04	18_h07; 018_3_10_i20;
018_3_10_j07	1	0.81	0.84	0.83	0.83	18_i17; 018_3_10_j07; [hypothetical protein T8F5.23] Score = 12
018_3_10_j23	1	0.78	0.81	0.72	0.64	18_k19; 018_3_10_j23; [thiamine biosynthetic enzyme] Score = 26
018_3_10_k04	1	1.00	1.01	1.08	1.23	18_f18; 018_3_10_k04; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 78
018_3_12_a18	1	0.73	0.83	1.02	1.19	19_m04; 018_3_12_a18;
018_3_12_b07	1	0.97	1.02	0.99	1.35	19_n21; 018_3_12_b07; [succinate dehydrogenase EC 1.3.99.1 flavoprotein]
018_3_12_h12	1	1.21	1.17	1.13	0.98	20_b03; 018_3_12_h12; [spermidine synthase EC 2.5.1.16] Score = 39
018_3_12_n15	1	0.99	1.04	1.09	2.86	19_o21; 018_3_12_n15; [pectinacylesterase precursor] Score = 15
018_4_01_f07	1	1.01	1.00	1.00	1.20	20_i16; 018_4_01_f07; [hypothetical protein T29A15.10] Score = 17
018_4_02_h19	1	1.02	1.04	1.16	1.25	21_a19; 018_4_02_h19; [proline-rich protein APG homolog T27E13.4] Score = 6
018_4_02_j11	1	1.03	1.05	1.02	1.40	21_a06; 018_4_02_j11; [nonspecific lipid transfer protein] Score = 66
018_4_02_i06	1	1.09	1.07	1.30	1.07	21_b16; 018_4_02_i06;
018_4_02_l12	1	1.31	1.31	1.12	1.00	21_c06; 018_4_02_l12;
018_4_02_p24	1	0.87	0.93	0.89	0.82	21_d09; 018_4_02_p24; [photosystem II 22K protein] Score = 14
018_4_03_a23	1	0.82	0.83	0.82	0.86	21_f11; 018_4_03_a23; [malate dehydrogenase EC 1.1.1.37 precursor mitochondrial]
018_4_03_a24	1	0.73	0.76	0.65	0.61	21_h22; 018_4_03_a24; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor]
018_4_03_c07	1	1.05	1.24	3.60	12.11	21_d21; 018_4_03_c07; [lipid transfer protein] Score = 161
018_4_03_g03	1	1.50	1.18	1.03	1.00	21_d13; 018_4_03_g03;
018_4_03_j17	1	1.03	1.06	1.28	1.36	21_j19; 018_4_03_j17; [hypothetical protein APG homolog T27E13.4] Score = 46
018_4_03_l16	1	1.01	1.07	1.17	1.44	21_l18; 018_4_03_l16; [indole-3-acetate beta-glucosyltransferase homolog ripening-related]
018_4_04_b17	1	0.96	0.83	0.84	0.81	22_c09; 018_4_04_b17;
018_4_04_c08	1	1.00	1.04	1.10	1.39	21_p06; 018_4_04_c08;
018_4_04_c15	1	0.88	0.93	0.80	0.82	21_n17; 018_4_04_c15; [light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein
018_4_04_p06	1	1.75	1.26	1.04	1.01	22_d11; 018_4_04_p06; [proteinase inhibitor] Score = 4
018_4_05_a09	1	0.73	0.83	0.60	0.56	22_f20; 018_4_05_a09;
018_4_05_d11	1	0.99	1.03	1.04	1.21	22_k06; 018_4_05_d11; [phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase EC 6.3.3.1]
018_4_05_d23	1	1.54	1.86	1.68	1.15	22_l08; 018_4_05_d23;
018_4_05_g07	1	1.03	1.11	1.41	1.61	22_f17; 018_4_05_g07;
018_4_05_l01	1	0.76	0.82	0.80	1.12	22_j11; 018_4_05_l01; [late-embryogenesis protein lea5] Score = 13
018_4_05_m21	1	0.24	0.26	0.37	0.79	22_h02; 018_4_05_m21;
018_4_05_m22	1	0.72	0.80	0.75	0.74	22_j01; 018_4_05_m22; [acyl-CoA oxidase EC 1.3.3.6) peroxisomal] Score = 35
018_4_05_o09	1	1.01	1.03	1.09	1.35	22_f23; 018_4_05_o09;
018_4_06_a06	1	1.44	1.17	1.09	0.89	23_a11; 018_4_06_a06; [1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase] Score = 60
018_4_06_a13	1	1.01	1.10	1.45	1.08	22_o22; 018_4_06_a13;
018_4_06_b10	1	1.70	1.26	1.03	1.00	23_e10; 018_4_06_b10; [proteinase inhibitor] Score = 4
018_4_06_c13	1	0.81	0.82	0.95	0.85	22_o23; 018_4_06_c13; [ADP-ribosylation factor 1] Score = 148
018_4_06_e01	1	1.02	1.11	2.32	7.23	22_n19; 018_4_06_e01; [lipid transfer protein] Score = 150
018_4_06_g04	1	0.79	0.80	0.76	0.87	23_a07; 018_4_06_g04; [peptide transport protein] Score = 14
018_4_06_l11	1	1.30	1.10	1.01	1.00	23_d02; 018_4_06_l11; [histone H4] Score = 160
018_4_06_n17	1	0.76	0.78	0.70	0.66	23_d12; 018_4_06_n17; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor
018_4_06_o05	1	0.45	0.46	0.52	0.49	22_o08; 018_4_06_o05; [photosystem II chlorophyll a-binding protein psbB]
018_4_07_b14	1	0.64	0.68	0.64	0.60	23_m23; 018_4_07_b14; [hypothetical protein CP12 precursor] Score = 17
018_4_07_b22	1	1.07	1.07	1.17	1.22	23_n19; 018_4_07_b22; [disease resistance protein] Score = 85
018_4_07_k03	1	1.00	1.07	1.55	3.14	23_f17; 018_4_07_k03;
018_4_07_l06	1	1.20	1.25	1.07	1.00	23_m07; 018_4_07_l06; [ribosomal protein L36 cytosolic] Score = 24
018_4_07_m05	1	0.98	1.04	1.24	1.03	23_f20; 018_4_07_m05;
018_4_07_o12	1	0.89	1.02	0.92	0.81	23_i15; 018_4_07_o12; [ferredoxin [2Fe-2S]] Score = 240
018_4_08_b15	1	1.01	1.05	1.21	1.77	24_c12; 018_4_08_b15; [ids-4 protein] Score = 3
018_4_08_b17	1	1.03	1.07	1.10	1.37	24_c18; 018_4_08_b17;
018_4_08_g11	1	1.07	1.11	1.51	1.32	23_o17; 018_4_08_g11; [hypothetical protein T3F12.2] Score = 4
018_4_08_i22	1	1.07	1.10	1.21	0.98	24_a23; 018_4_08_i22; [pyruvate dehydrogenase lipoamide EC 1.2.4.1 alpha chain]
018_4_08_k01	1	0.95	1.00	0.98	1.23	23_o04; 018_4_08_k01;
018_4_08_k15	1	0.71	0.79	0.68	0.67	23_p02; 018_4_08_k15; [ADP-ribosylation factor 1] Score = 147

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_4_08_l13	1	1.23	1.15	1.04	1.02	24_c10; 018_4_08_l13; [histone H2A] Score = 217
018_4_08_m06	1	0.66	0.72	0.65	0.66	23_p24; 018_4_08_m06; [photosystem I chain III precursor] Score = 47
018_4_08_m10	1	0.96	1.03	2.00	5.72	24_a07; 018_4_08_m10; [glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase EC 5.4.3.8]
018_4_08_n09	1	1.08	1.06	1.34	1.10	24_c03; 018_4_08_n09;
018_4_08_o23	1	1.06	1.21	1.05	1.04	23_p11; 018_4_08_o23;
018_4_08_p23	1	0.69	0.73	0.68	0.65	24_a07; 018_4_08_p23; [fructose-bisphosphate aldolase EC 4.1.2.13] Score = 201
018_4_09_a09	1	1.37	1.32	1.26	1.01	24_f14; 018_4_09_a09;
018_4_09_c04	1	0.81	0.90	0.74	0.68	24_h06; 018_4_09_c04; [photosystem I protein psaH precursor] Score = 28
018_4_09_d23	1	1.02	1.03	1.02	1.55	24_k11; 018_4_09_d23; [hypothetical protein] Score = 9
018_4_09_i02	1	1.01	1.07	1.61	3.65	24_h02; 018_4_09_i02;
018_4_09_i05	1	1.00	1.15	1.29	1.27	24_f07; 018_4_09_i05; [membrane channel protein] Score = 55
018_4_09_j09	1	1.28	1.12	1.01	0.98	24_j06; 018_4_09_j09; [histone H2A] Score = 220
018_4_09_k21	1	0.77	0.79	0.83	0.84	24_g18; 018_4_09_k21; [peptidylprolyl isomerase EC 5.2.1.8] Score = 260
018_4_09_l05	1	1.19	1.26	1.11	1.05	24_i20; 018_4_09_l05;
018_4_09_l06	1	1.02	1.05	1.21	1.03	24_k23; 018_4_09_l06;
018_4_09_m04	1	0.69	0.72	0.72	0.73	24_h08; 018_4_09_m04; [hypothetical 16.5K protein] Score = 8
018_4_09_o07	1	1.03	1.03	1.02	1.24	24_f13; 018_4_09_o07; [AMP deaminase EC 3.5.4.6] Score = 35
018_4_09_o10	1	1.04	1.09	1.23	1.07	24_h20; 018_4_09_o10; [3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase EC 2.3.1.41 FAE1]
018_4_10_e01	1	1.12	1.25	1.29	1.25	24_m11; 018_4_10_e01; [glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1] Score = 18
018_4_10_f18	1	0.63	0.68	0.64	0.54	25_e03; 018_4_10_f18; [photosystem I chain II] Score = 54
018_4_10_g07	1	0.78	0.82	0.67	0.63	24_n06; 018_4_10_g07;
018_4_10_h05	1	1.00	1.04	1.05	1.26	25_a24; 018_4_10_h05; [hypothetical protein T18E12.4] Score = 4
018_4_10_h09	1	0.94	0.96	1.03	1.29	25_b09; 018_4_10_h09;
018_4_10_h14	1	0.72	0.76	0.80	0.74	25_d17; 018_4_10_h14; [H ⁺ -transporting ATP synthase EC 3.6.1.34 lipid-binding protein]
018_4_10_l17	1	1.12	1.68	4.04	1.29	25_c05; 018_4_10_l17; [cell wall protein clone pAt2191] Score = 7
018_4_10_m18	1	0.88	0.95	0.89	0.81	25_a02; 018_4_10_m18; [ferredoxin [2Fe-2S]] Score = 240
018_4_10_n08	1	0.79	0.82	0.82	1.07	25_d09; 018_4_10_n08;
018_4_10_n14	1	0.65	0.68	0.66	0.69	25_d18; 018_4_10_n14; [S]-2-hydroxy-acid oxidase EC 1.1.3.15] Score = 46
018_4_10_n22	1	0.61	0.64	0.69	0.67	25_e18; 018_4_10_n22; [hypothetical 16.5K protein] Score = 10
018_4_10_o15	1	1.13	1.26	1.23	1.05	24_n23; 018_4_10_o15;
018_4_11_f18	1	0.81	0.74	0.67	0.75	25_m11; 018_4_11_f18;
018_4_11_g18	1	1.26	1.14	1.00	1.01	25_h19; 018_4_11_g18; [histone H4] Score = 160
018_4_11_h12	1	1.77	2.17	3.16	1.57	25_l21; 018_4_11_h12; [nonspecific lipid transfer protein] Score = 122
018_4_11_i18	1	0.79	0.85	0.74	0.68	25_h20; 018_4_11_i18; [chlorophyll a/b-binding protein type III precursor] Score = 19
018_4_11_j09	1	1.21	1.24	1.16	1.06	25_j10; 018_4_11_j09; [beta-6 tubulin beta chain] Score = 694
018_4_11_l10	1	1.07	1.06	1.24	1.32	25_l19; 018_4_11_l10; [tonoplast intrinsic protein] Score = 85
018_4_11_m03	1	0.62	0.65	0.74	1.03	25_f05; 018_4_11_m03;
018_4_11_m24	1	1.38	1.86	2.50	1.59	25_i15; 018_4_11_m24; [lipid transfer protein] Score = 173
018_4_11_o12	1	0.91	0.91	0.85	0.82	25_h10; 018_4_11_o12; [IgE-dependent histamine-releasing factor homolog] Score = 20
018_4_11_o18	1	0.66	0.69	0.66	0.69	25_h21; 018_4_11_o18; [endopeptidase inhibitor] Score = 3
018_4_12_d06	1	1.60	1.74	1.31	0.98	26_e15; 018_4_12_d06; [gibberellin-regulated protein GASA2 precursor] Score = 18
018_4_12_e20	1	1.15	1.20	1.04	0.99	26_b06; 018_4_12_e20; [ribosomal protein S28] Score = 8
018_4_12_h10	1	1.24	1.09	1.02	0.99	26_e23; 018_4_12_h10; [histone H4] Score = 160
018_4_12_i11	1	1.20	1.21	1.02	0.95	25_o07; 018_4_12_i11; [gibberellin-stimulated transcript 1 like protein GASA2]
018_4_12_i16	1	1.08	1.16	1.54	1.35	26_a22; 018_4_12_i16;
018_4_12_l20	1	1.01	1.07	1.04	1.24	26_g05; 018_4_12_l20; [hypothetical protein F13M22.20] Score = 5
018_4_12_p19	1	0.99	1.02	1.02	1.27	26_d21; 018_4_12_p19;
018_5_01_c10	1	0.66	0.61	0.54	0.44	26_j07; 018_5_01_c10; [beta-glucosidase EC 3.2.1.21] Score = 148
018_5_01_c12	1	1.02	1.08	1.27	1.11	26_j11; 018_5_01_c12; [pollen surface protein] Score = 13
018_5_01_e02	1	0.63	0.55	0.54	0.41	26_i17; 018_5_01_e02; [beta-glucosidase EC 3.2.3.1 2] Score = 91
018_5_01_f17	1	0.95	1.00	0.94	1.22	26_m09; 018_5_01_f17; [sucrose synthase EC 2.4.1.13] Score = 118
018_5_01_g10	1	0.78	0.81	0.75	0.75	26_j08; 018_5_01_g10; [transketolase EC 2.2.1.1] Score = 99
018_5_01_l05	1	0.33	0.39	0.48	0.70	26_l05; 018_5_01_l05;
018_5_01_l06	1	0.68	0.73	0.68	0.65	26_n13; 018_5_01_l06; [fructose-bisphosphate aldolase EC 4.1.2.13] Score = 203
018_5_01_n18	1	1.08	1.14	1.16	1.24	26_o17; 018_5_01_n18; [aspartic proteinase EC 3.4.23.-] Score = 234

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_5_01_o10	1	1.79	1.72	1.74	1.19	26_j09; 018_5_01_o10; [MADS box protein] Score = 278
018_5_01_o12	1	1.06	1.09	1.24	1.07	26_j16; 018_5_01_o12; [trans-cinnamate 4-monooxygenase EC 1.14.13.11 cytochrome P450
018_5_02_c06	1	0.57	0.58	0.58	0.83	27_b17; 018_5_02_c06; [catalase EC 1.11.1.6] Score = 248
018_5_02_d01	1	0.62	0.64	0.55	0.53	27_d02; 018_5_02_d01; [photosystem II oxygen-evolving complex protein 3]
018_5_02_d09	1	1.39	1.29	1.28	1.39	27_e04; 018_5_02_d09; [MADS box protein] Score = 278
018_5_02_d20	1	0.65	0.66	0.63	0.61	27_h04; 018_5_02_d20; [fatty acid hydroperoxide lyase] Score = 7
018_5_02_e07	1	0.84	0.88	0.89	0.82	26_p22; 018_5_02_e07; [H+-transporting ATP synthase EC 3.6.1.34 chain b']
018_5_02_e13	1	1.07	1.12	1.25	1.02	27_a11; 018_5_02_e13;
018_5_02_g04	1	0.83	0.85	0.86	0.82	27_b14; 018_5_02_g04; [H+-transporting ATP synthase EC 3.6.1.34 chain 9]
018_5_02_g06	1	0.35	0.37	0.36	0.34	27_b19; 018_5_02_g06; [ribulose-bisphosphate carboxylase activase EC 6.3.4.-precursor] Score = 90
018_5_02_h07	1	0.78	0.80	0.79	0.77	27_d22; 018_5_02_h07; [glycine-rich RNA-binding protein] Score = 102
018_5_02_h14	1	0.77	0.80	0.84	0.95	27_g13; 018_5_02_h14; [glutamate decarboxylase EC 4.1.1.15 2 calmodulin-binding]
018_5_02_i15	1	0.57	0.57	0.60	0.85	27_a18; 018_5_02_i15; [cysteine proteinase EC 3.4.22.- precursor] Score = 549
018_5_02_j09	1	1.21	1.14	1.05	1.00	27_e07; 018_5_02_j09; [ribosomal protein S7] Score = 65
018_5_02_j18	1	0.75	0.82	0.93	1.06	27_g23; 018_5_02_j18;
018_5_02_k20	1	1.21	1.11	1.08	0.99	27_c19; 018_5_02_k20; [ribosomal protein S6 cytosolic] Score = 54
018_5_02_i09	1	1.01	1.01	1.26	1.01	27_e08; 018_5_02_i09;
018_5_02_n08	1	1.66	1.65	1.45	2.07	27_g01; 018_5_02_n08; [glossy1 protein F13M22.20] Score = 6
018_5_02_p04	1	1.01	1.13	1.48	2.07	27_f14; 018_5_02_p04; [naringenin 3-dioxygenase EC 1.14.11.9] Score = 72
018_5_03_b12	1	0.79	0.81	0.76	0.71	27_o21; 018_5_03_b12; [WD-repeat protein T419.10] Score = 4
018_5_03_c12	1	1.62	1.78	1.32	1.21	27_k23; 018_5_03_c12; [non-muscle myosin alkali light chain 1 fast skeletal muscle]
018_5_03_c21	1	0.70	0.76	0.68	0.63	27_j17; 018_5_03_c21; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor]
018_5_03_j03	1	0.97	0.94	0.79	0.91	27_m05; 018_5_03_j03; [hypothetical protein Rv2406c] Score = 9
018_5_03_j14	1	1.26	1.09	0.98	0.98	27_p03; 018_5_03_j14;
018_5_03_j24	1	0.65	0.66	0.69	0.75	27_p24; 018_5_03_j24; [hypothetical protein T16H5.200] Score = 17
018_5_03_k17	1	0.84	0.85	1.42	0.82	27_j09; 018_5_03_k17;
018_5_03_k19	1	0.76	0.67	0.55	0.61	27_j14; 018_5_03_k19; [glycine-rich RNA-binding protein] Score = 23
018_5_03_l13	1	0.96	1.03	2.10	0.99	27_n06; 018_5_03_l13;
018_5_03_m03	1	1.14	1.20	1.25	1.21	27_j04; 018_5_03_m03; [5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase EC 2.1.1.14] Score = 26
018_5_03_n14	1	1.16	1.22	1.21	1.04	27_p04; 018_5_03_n14;
018_5_03_o15	1	1.05	1.01	1.18	1.39	27_j06; 018_5_03_o15; [hypothetical protein APG homolog T27E13.4] Score = 28
018_5_04_a08	1	0.82	0.84	0.82	0.83	28_c15; 018_5_04_a08; [soluble hydrogenase EC 1.12.-.- small chain] Score = 23
018_5_04_f05	1	1.14	1.07	1.25	1.07	28_e12; 018_5_04_f05; [1A tubulin beta chain] Score = 736
018_5_04_f13	1	1.46	1.28	1.17	1.00	28_f04; 018_5_04_f13;
018_5_04_h06	1	1.27	1.27	1.39	1.04	28_g19; 018_5_04_h06; [hypothetical protein T20K24.8] Score = 4
018_5_04_i01	1	0.88	0.88	0.84	0.81	28_a05; 018_5_04_i01; [photosystem II protein X precursor] Score = 6
018_5_04_j06	1	0.75	0.77	0.69	0.66	28_g20; 018_5_04_j06; [light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein type II photosystem I] Score = 135
018_5_04_k20	1	1.10	1.22	1.17	1.03	28_d23; 018_5_04_k20; [disease resistance protein] Score = 111
018_5_04_o19	1	0.74	0.77	0.75	0.73	28_b21; 018_5_04_o19; [glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1] Score = 223
018_5_05_a15	1	0.90	0.97	2.06	3.42	28_j18; 018_5_05_a15; [extensin-like protein GPP1] Score = 6
018_5_05_c07	1	0.82	0.85	0.84	0.81	28_i19; 018_5_05_c07; [sedoheptulose-bisphosphatase EC 3.1.3.37 precursor]
018_5_05_d02	1	0.53	0.60	0.35	0.32	28_p01; 018_5_05_d02; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor]
018_5_05_d21	1	0.98	1.00	1.02	1.21	28_o18; 018_5_05_d21; [carnitine racemase] Score = 8
018_5_05_e02	1	1.01	1.00	1.02	1.40	28_k19; 018_5_05_e02; [isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase EC 5.3.3.2]
018_5_05_e11	1	0.81	0.84	0.85	0.83	28_j05; 018_5_05_e11; [imbibition protein] Score = 8
018_5_05_f17	1	1.17	1.12	1.06	1.22	28_o10; 018_5_05_f17; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 168
018_5_05_f23	1	0.95	1.03	1.09	1.22	28_o22; 018_5_05_f23; [gene Bp10 protein] Score = 28
018_5_05_g13	1	0.50	0.49	0.50	0.44	28_j13; 018_5_05_g13; [H+-transporting ATP synthase EC 3.6.1.34 beta chain]
018_5_05_h10	1	1.14	1.19	1.87	1.60	28_p17; 018_5_05_h10; [hypothetical protein T3F12.2] Score = 4
018_5_05_j10	1	1.08	1.21	1.23	1.38	28_p18; 018_5_05_j10;
018_5_05_k13	1	0.81	0.86	0.89	0.95	28_j15; 018_5_05_k13; [glutamate decarboxylase EC 4.1.1.15 2 calmodulin-binding]
018_5_05_m12	1	1.01	1.08	1.31	1.16	28_l20; 018_5_05_m12; [hypothetical protein F16M14.4] Score = 7
018_5_05_o03	1	1.05	1.04	1.22	1.13	28_i15; 018_5_05_o03; [H+-transporting ATP synthase EC 3.6.1.34 beta chain]
018_5_06_a03	1	0.69	0.74	0.74	0.85	29_b11; 018_5_06_a03; [lipase-like protein BYJ15] Score = 7
018_5_06_c09	1	0.79	0.84	0.82	0.91	29_b23; 018_5_06_c09;

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_5_06_d16	1	0.83	0.87	0.83	0.82	29_j07; 018_5_06_d16; [hypothetical protein F13M22.7] Score = 4
018_5_06_d19	1	0.87	0.84	0.85	0.81	29_h06; 018_5_06_d19; [IgE-dependent histamine-releasing factor homolog]
018_5_06_e10	1	1.33	1.68	2.81	1.00	29_e04; 018_5_06_e10; [hypothetical protein APG homolog F16A16.110] Score = 57
018_5_06_g18	1	0.66	0.68	0.73	0.70	29_e24; 018_5_06_g18; [H+-transporting ATP synthase EC 3.6.1.34 lipid-binding protein] Score = 166
018_5_06_g22	1	1.32	1.11	1.10	1.00	29_f12; 018_5_06_g22; [14-3-3 protein homolog] Score = 236
018_5_06_j12	1	0.65	0.69	0.67	0.66	29_i24; 018_5_06_j12; [photosystem II oxygen-evolving complex protein 3]
018_5_06_j15	1	0.98	0.98	1.00	1.73	29_g24; 018_5_06_j15; [hypothetical protein] Score = 12
018_5_06_l02	1	1.16	1.24	1.26	1.37	29_h22; 018_5_06_l02; [oxoacyl carrier protein synthase III] Score = 70
018_5_06_p05	1	0.85	0.85	0.83	0.82	29_g04; 018_5_06_p05;
018_5_07_j15	1	0.48	0.51	0.41	0.32	29_m24; 018_5_07_j15; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_5_07_j20	1	0.51	0.53	0.44	0.34	29_p10; 018_5_07_j20; [light harvesting chlorophyll a/b-binding protein precursor]
018_5_07_l02	1	1.02	1.04	1.05	1.20	29_n21; 018_5_07_l02; [2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase EC 4.1.2.15 2 precursor] Score = 41
018_5_08_b08	1	0.93	0.92	0.99	1.25	30_g06; 018_5_08_b08;
018_5_08_b24	1	1.30	1.13	1.09	1.01	30_h16; 018_5_08_b24; [14-3-3 protein homolog] Score = 236
018_5_08_d22	1	1.00	1.02	1.01	1.22	30_h13; 018_5_08_d22; [aldehyde dehydrogenase NAD+ EC 1.2.1.3] Score = 416
018_5_08_d24	1	0.79	0.83	0.78	0.74	30_h17; 018_5_08_d24; [photosystem II oxygen-evolving complex protein 2]
018_5_08_f10	1	0.91	0.94	1.03	1.47	30_g09; 018_5_08_f10; [ankyrin] Score = 3
018_5_08_f14	1	2.08	1.69	1.46	1.15	30_g17; 018_5_08_f14;
018_5_08_h10	1	1.21	1.20	1.33	1.10	30_g10; 018_5_08_h10;
018_5_08_h15	1	0.77	0.77	0.72	0.68	30_f01; 018_5_08_h15; [photosystem II oxygen-evolving complex protein 2]
018_5_08_l10	1	0.97	1.02	1.13	1.46	30_g11; 018_5_08_l10;
018_5_08_l22	1	1.06	1.07	1.35	1.12	30_h15; 018_5_08_l22; [UDPglucose 6-dehydrogenase EC 1.1.1.22] Score = 29
018_5_08_m10	1	0.79	0.80	0.80	0.79	30_c07; 018_5_08_m10;
018_5_08_o09	1	1.05	0.89	0.80	0.92	30_a06; 018_5_08_o09; [ubiquitin / ribosomal protein CEP52] Score = 353
018_5_08_o23	1	1.05	1.03	1.23	1.23	30_b05; 018_5_08_o23; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 174
018_5_09_c11	1	1.25	1.21	1.11	1.01	30_j21; 018_5_09_c11; [50S ribosomal protein L37a] Score = 45
018_5_09_i10	1	0.97	0.97	0.97	1.21	30_k18; 018_5_09_i10; [aldehyde dehydrogenase NAD+ EC 1.2.1.3] Score = 428
018_5_09_i11	1	0.90	0.90	1.08	1.40	30_i23; 018_5_09_i11;
018_5_09_k14	1	0.76	0.79	0.76	0.72	30_l04; 018_5_09_k14; [beta-glucosidase EC 3.2.1.21] Score = 152
018_5_09_m24	1	1.24	1.10	1.05	1.09	30_m09; 018_5_09_m24; [CDC2/CDC13 suppressor RNA-binding protein]
018_5_09_n05	1	1.44	1.10	1.04	1.05	30_m19; 018_5_09_n05; [histone H2B] Score = 242
018_5_09_n18	1	1.12	1.07	1.28	1.52	31_a08; 018_5_09_n18; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 148
018_5_09_p10	1	1.02	1.14	1.08	1.52	30_p15; 018_5_09_p10; [hypothetical protein F13M22.20] Score = 4
018_5_10_b16	1	1.01	0.97	1.12	1.24	31_i09; 018_5_10_b16; [oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase EC 3.1.2.14]
018_5_10_f10	1	0.86	0.85	0.81	0.78	31_h20; 018_5_10_f10; [hypothetical protein F17K2.13] Score = 5
018_5_10_g10	1	0.42	0.42	0.46	0.85	31_d23; 018_5_10_g10; [catalase EC 1.11.1.6] Score = 248
018_5_10_j20	1	1.07	1.17	1.23	1.09	31_i17; 018_5_10_j20; [trans-cinnamate 4-monooxygenase EC 1.14.13.11 cytochrome P450] Score = 59
018_5_10_l07	1	0.92	0.74	0.77	0.72	31_f15; 018_5_10_l07;
018_5_10_l09	1	0.76	0.78	0.75	0.73	31_f19; 018_5_10_l09; [fructose-bisphosphate aldolase EC 4.1.2.13] Score = 201
018_5_10_n10	1	0.97	1.03	1.14	1.35	31_h22; 018_5_10_n10;
018_5_11_a15	1	0.91	0.83	0.86	0.83	31_j24; 018_5_11_a15; [IgE-dependent histamine-releasing factor homolog]
018_5_11_b20	1	1.30	1.17	1.02	0.98	32_a02; 018_5_11_b20; [50S ribosomal protein L2] Score = 113
018_5_11_e06	1	1.06	1.04	1.03	1.31	31_l06; 018_5_11_e06;
018_5_11_f09	1	1.21	1.09	1.02	0.97	31_n13; 018_5_11_f09; [ribosomal protein L15] Score = 43
018_5_11_f22	1	0.83	0.85	0.84	0.83	32_a05; 018_5_11_f22; [aminomethyltransferase EC 2.1.2.10 precursor] Score = 51
018_5_11_k06	1	1.01	1.03	1.25	1.01	31_l08; 018_5_11_k06;
018_5_11_o03	1	1.06	1.09	1.29	1.15	31_j09; 018_5_11_o03; [biosynthesis of teichuronic acid UDP-glucose 6-dehydrogenase EC 1.1.1.22] Score = 31
018_5_11_p18	1	0.81	0.83	0.83	0.92	32_a01; 018_5_11_p18; [lectin 2 phloem-specific] Score = 14
018_5_12_e08	1	0.95	0.99	1.10	1.21	32_a20; 018_5_12_e08; [gene Bp10 protein] Score = 27
018_5_12_k20	1	1.77	1.49	1.33	1.10	32_c02; 018_5_12_k20; [1A tubulin beta chain] Score = 717
018_6_01_c02	1	1.20	1.18	1.06	1.01	32_i02; 018_6_01_c02; [hypothetical protein] Score = 3
018_6_01_f07	1	1.00	1.01	1.01	1.44	32_k23; 018_6_01_f07; [isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase EC 5.3.3.2]
018_6_01_f08	1	0.79	0.81	0.80	0.79	32_m22; 018_6_01_f08; [alanine transaminase EC 2.6.1.2] Score = 26
018_6_01_g01	1	0.78	0.79	0.79	0.79	32_g05; 018_6_01_g01; [beta-glucosidase EC 3.2.1.21] Score = 148
018_6_01_k03	1	0.64	0.75	0.79	0.87	32_g09; 018_6_01_k03; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_6_01_k24	1	0.85	0.85	0.83	0.83	32_k08; 018_6_01_k24; [glycine-rich RNA-binding protein] Score = 284
018_6_01_l02	1	0.68	0.70	0.58	0.51	32_m07; 018_6_01_l02;
018_6_01_o03	1	1.28	1.12	1.28	1.05	32_g10; 018_6_01_o03; [1A tubulin beta chain] Score = 717
018_6_01_p05	1	0.80	0.81	0.78	0.76	32_k21; 018_6_01_p05; [uridine kinase EC 2.7.1.19] Score = 42
018_6_02_c01	1	1.27	1.21	1.26	1.06	32_o06; 018_6_02_c01; [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC 1.2.1.12]
018_6_02_d12	1	1.00	1.02	1.05	1.21	33_f04; 018_6_02_d12;
018_6_02_g23	1	0.84	0.89	0.86	0.82	33_a09; 018_6_02_g23; [aminomethyltransferase EC 2.1.2.10 precursor] Score = 51
018_6_02_i08	1	1.24	1.30	1.40	1.14	33_a24; 018_6_02_i08;
018_6_02_k02	1	1.07	1.09	1.41	1.53	33_a15; 018_6_02_k02; [chitinase EC 3.2.1.14] Score = 296
018_6_02_m01	1	1.14	1.18	1.11	1.33	32_o08; 018_6_02_m01; [3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase EC 2.3.1.41 FAE1]
018_6_02_n03	1	1.13	1.22	1.15	1.04	33_c18; 018_6_02_n03; [2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase EC 3.7.-.-]
018_6_02_n12	1	0.82	0.87	0.82	0.81	33_f07; 018_6_02_n12; [hypothetical protein T517.2] Score = 16
018_6_02_o17	1	0.84	0.87	0.73	0.77	32_p24; 018_6_02_o17;
018_6_03_e01	1	1.21	1.55	4.13	0.99	33_g20; 018_6_03_e01; [hypothetical protein APG homolog F16A16.110] Score = 45
018_6_03_f14	1	0.65	0.67	0.67	0.79	33_n12; 018_6_03_f14; [cysteine proteinase EC 3.4.22.- precursor] Score = 494
018_6_03_g04	1	1.29	1.21	1.26	1.03	33_i15; 018_6_03_g04; [50S ribosomal protein L2] Score = 140
018_6_03_h21	1	0.78	0.86	0.81	0.81	33_l23; 018_6_03_h21; [dihydrokaempferol 4-reductase EC 1.1.1.219] Score = 90
018_6_03_j18	1	0.83	0.86	0.86	0.86	33_n22; 018_6_03_j18; [hypothetical protein] Score = 19
018_6_03_k04	1	0.33	0.34	0.44	0.86	33_i17; 018_6_03_k04; [catalase EC 1.11.1.6] Score = 252
018_6_03_l23	1	0.72	0.74	0.82	0.93	33_m05; 018_6_03_l23; [glutamate decarboxylase EC 4.1.1.15 2 calmodulin-binding]
018_6_04_b14	1	0.91	0.91	1.27	0.92	34_e24; 018_6_04_b14;
018_6_04_c01	1	0.92	0.98	1.09	1.27	33_o14; 018_6_04_c01; [small GTP-binding protein] Score = 681
018_6_04_h18	1	0.82	0.84	0.82	0.81	34_f08; 018_6_04_h18; [hypothetical protein F19D11.10] Score = 4
018_6_04_i09	1	0.67	0.70	0.67	0.66	33_p06; 018_6_04_i09; [lipoxygenase EC 1.13.11.12] Score = 193
018_6_04_k15	1	1.25	1.13	1.24	1.03	33_p17; 018_6_04_k15; [ribosomal protein L7a cytosolic] Score = 42
018_6_04_k24	1	0.91	0.96	1.08	1.28	34_c02; 018_6_04_k24; [DNA-binding protein F4118.20] Score = 5
018_6_04_l09	1	0.75	0.83	0.88	0.95	34_c17; 018_6_04_l09; [glutamate decarboxylase EC 4.1.1.15 2 calmodulin-binding]
018_6_04_o08	1	1.03	0.98	1.28	1.00	34_a20; 018_6_04_o08; [ADP-ribosylation factor 1] Score = 148
018_6_04_p09	1	0.96	1.01	0.96	1.51	34_c19; 018_6_04_p09; [aldehyde dehydrogenase NAD+ EC 1.2.1.3] Score = 365
018_6_04_p19	1	1.05	1.14	1.28	1.06	34_d19; 018_6_04_p19; [acid--CoA ligase EC 6.-.-.- component II] Score = 49
018_6_05_a14	1	1.01	1.06	1.04	1.20	34_j08; 018_6_05_a14; [citrate (si)-synthase EC 4.1.3.7] Score = 64
018_6_05_d01	1	1.21	1.25	1.13	1.04	34_k11; 018_6_05_d01;
018_6_05_g07	1	0.75	0.82	0.78	1.02	34_g10; 018_6_05_g07;
018_6_05_h13	1	0.71	0.78	0.68	0.64	34_l18; 018_6_05_h13;
018_6_05_i12	1	0.82	0.83	0.83	0.80	34_j06; 018_6_05_i12; [phosphoribulokinase EC 2.7.1.19] Score = 31
018_6_05_l22	1	0.85	0.86	1.04	1.32	34_o11; 018_6_05_l22; [hypothetical protein T14N5.11] Score = 23
018_6_05_n17	1	1.32	1.24	1.45	1.46	34_m05; 018_6_05_n17; [MADS box protein] Score = 278
018_6_05_o05	1	0.89	0.94	1.11	0.81	34_g08; 018_6_05_o05;
018_6_05_p17	1	0.73	0.74	0.72	0.70	34_m06; 018_6_05_p17; [fatty acid hydroperoxide lyase] Score = 7
018_6_06_b08	1	1.03	1.09	1.14	1.58	35_f01; 018_6_06_b08;
018_6_06_e10	1	0.48	0.49	0.47	0.46	35_b03; 018_6_06_e10; [lipoxygenase EC 1.13.11.12] Score = 189
018_6_06_e19	1	0.83	0.87	0.84	1.01	34_p24; 018_6_06_e19; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_6_06_f07	1	0.76	0.78	0.79	0.75	35_d01; 018_6_06_f07; [glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1] Score = 218
018_6_06_f14	1	0.95	1.01	0.96	1.24	35_f16; 018_6_06_f14; [adenosylmethionine decarboxylase EC 4.1.1.50] Score = 40
018_6_06_g05	1	1.15	1.22	1.60	1.63	34_o23; 018_6_06_g05;
018_6_06_h04	1	0.96	1.00	0.98	1.20	35_e17; 018_6_06_h04; [L-ascorbate oxidase EC 1.10.3.3] Score = 45
018_6_06_i05	1	0.85	0.95	0.82	0.80	34_o24; 018_6_06_i05; [hypothetical protein F17K2.13] Score = 7
018_6_06_j14	1	1.00	1.01	1.02	1.57	35_f18; 018_6_06_j14; [catechol O-methyltransferase EC 2.1.1.6] Score = 70
018_6_06_k20	1	1.09	1.20	1.31	1.30	35_c04; 018_6_06_k20; [glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1] Score = 223
018_6_06_o02	1	1.03	1.10	1.37	1.61	35_a16; 018_6_06_o02; [chitinase EC 3.2.1.14 precursor] Score = 79
018_6_07_a11	1	0.78	0.81	0.76	0.78	35_h05; 018_6_07_a11; [carbonate dehydratase EC 4.2.1.1 precursor chloroplast]
018_6_07_a23	1	0.83	0.80	0.86	0.87	35_i06; 018_6_07_a23; [DNA-directed RNA polymerase EC 2.7.7.6 II 35.5K chain]
018_6_07_b08	1	1.37	1.11	1.08	1.25	35_n08; 018_6_07_b08;
018_6_07_d02	1	0.83	0.94	1.02	1.20	35_m18; 018_6_07_d02; [hypothetical protein homolog T13J8.160] Score = 10
018_6_07_d08	1	0.99	1.04	1.00	3.11	35_n09; 018_6_07_d08; [catechol O-methyltransferase EC 2.1.1.6] Score = 37

EST-Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle					Blast-Homologie
	Sepale	P1	P2	P3	P4	
018_6_07_d11	1	0.70	0.77	0.88	0.95	35_i09; 018_6_07_d11; [2-oxoglutarate/malate translocator clones OMT134 and OMT106) mitochondrial membrane] Score = 26
018_6_07_e06	1	0.79	0.83	0.93	1.20	35_i16; 018_6_07_e06; [hexose transport protein] Score = 41
018_6_07_f09	1	1.01	1.01	1.05	1.29	35_i06; 018_6_07_f09;
018_6_07_j07	1	1.45	1.27	1.29	0.97	35_i03; 018_6_07_j07; [signal recognition particle 54K protein] Score = 33
018_6_07_j21	1	1.11	0.90	1.32	1.08	35_m10; 018_6_07_j21; [translation elongation factor eEF-1 alpha chain] Score = 782
018_6_07_m15	1	0.68	0.73	0.70	0.65	35_h15; 018_6_07_m15; [beta-glucosidase EC 3.2.3.1 2] Score = 99
018_6_07_m18	1	1.03	1.22	1.90	2.27	35_j20; 018_6_07_m18; [naringenin 3-dioxygenase EC 1.14.11.9] Score = 69
018_6_07_m20	1	1.00	1.05	1.11	1.24	35_k02; 018_6_07_m20;
018_6_07_n06	1	0.85	0.82	1.01	0.94	35_n06; 018_6_07_n06; [golgi associated protein se-wap41] Score = 6
018_6_07_n21	1	0.80	0.83	0.89	1.05	35_m11; 018_6_07_n21; [hexose transport protein] Score = 99
018_6_07_o15	1	0.25	0.27	0.27	0.28	35_h16; 018_6_07_o15;
018_6_08_b16	1	1.06	1.16	1.88	2.16	36_f20; 018_6_08_b16; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 134
018_6_08_e10	1	0.75	0.79	0.99	1.47	36_b14; 018_6_08_e10;
018_6_08_f02	1	1.01	1.05	1.40	1.10	36_e19; 018_6_08_f02;
018_6_08_h08	1	0.79	0.85	0.86	0.79	36_f04; 018_6_08_h08; [phosphoglycerate kinase EC 2.7.2.3] Score = 297
018_6_08_h10	1	1.02	0.94	1.13	1.69	36_f09; 018_6_08_h10; [membrane intrinsic protein] Score = 121
018_6_08_j05	1	0.92	0.93	2.11	0.91	36_d08; 018_6_08_j05;
018_6_08_j11	1	0.92	1.04	1.51	2.59	36_d19; 018_6_08_j11;
018_6_08_j23	1	0.32	0.35	0.34	0.32	36_e17; 018_6_08_j23;
018_6_08_m10	1	0.71	0.78	0.74	0.68	36_b17; 018_6_08_m10; [glutamate--ammonia ligase EC 6.3.1.2] Score = 315
018_6_08_n20	1	1.41	1.42	1.86	2.26	36_g08; 018_6_08_n20; [hypothetical protein F13M22.20] Score = 5
018_6_09_a10	1	0.76	0.80	0.76	0.74	36_j13; 018_6_09_a10; [phosphoribulokinase EC 2.7.1.19] Score = 28
018_6_09_b18	1	0.82	0.87	0.83	0.86	36_o23; 018_6_09_b18;
018_6_09_e22	1	1.15	1.21	1.19	0.85	36_k22; 018_6_09_e22; [bacteriochlorophyll synthase 43K chain] Score = 6
018_6_09_e23	1	0.74	0.75	1.03	1.27	36_i14; 018_6_09_e23;
018_6_09_f21	1	1.16	1.20	1.21	1.04	36_n10; 018_6_09_f21;
018_6_09_h18	1	1.26	1.24	1.26	1.02	36_p02; 018_6_09_h18; [peptidylprolyl isomerase EC 5.2.1.8] Score = 265
018_6_09_k01	1	0.66	0.67	0.60	0.51	36_g19; 018_6_09_k01; [glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1] Score = 222
018_6_09_l20	1	0.45	0.48	0.45	0.43	36_p09; 018_6_09_l20; [ribulose-bisphosphate carboxylase activase EC 6.3.4.- precursor] Score = 98
018_6_09_p07	1	1.00	1.02	1.08	1.26	36_m01; 018_6_09_p07; [pectinacetylsterase precursor] Score = 4
018_6_10_b17	1	0.85	0.92	0.86	1.54	37_e23; 018_6_10_b17;
018_6_10_c11	1	1.12	1.06	2.21	1.00	37_a19; 018_6_10_c11;
018_6_10_c13	1	1.01	1.10	1.24	1.46	37_a22; 018_6_10_c13; [naringenin 3-dioxygenase EC 1.14.11.9] Score = 55
018_6_10_c17	1	0.84	0.91	0.78	0.76	37_b02; 018_6_10_c17; [hypothetical protein T29H11.60] Score = 4
018_6_10_e14	1	0.94	0.91	0.93	0.82	37_c15; 018_6_10_e14;
018_6_10_e21	1	0.79	0.89	0.81	0.75	37_b11; 018_6_10_e21; [beta-glucosidase EC 3.2.3.1 2] Score = 105
018_6_10_i02	1	0.93	1.04	1.35	1.13	37_b21; 018_6_10_i02; [clones Ia and actin] Score = 355
018_6_10_k07	1	1.13	1.23	1.13	1.02	37_a12; 018_6_10_k07; [lysophospholipase homolog F12L6.7] Score = 11
018_6_10_k20	1	0.62	0.70	0.76	0.92	37_d05; 018_6_10_k20; [xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase EC 3.2.1.-]
018_6_10_m16	1	0.66	0.72	0.71	0.57	37_c21; 018_6_10_m16; [photosystem II oxygen-evolving complex protein 2]
018_6_10_p01	1	1.03	1.07	0.94	0.82	37_d15; 018_6_10_p01; [nonenzymatic protein CP12 precursor] Score = 15
018_6_11_c22	1	0.78	0.81	0.78	0.75	37_n15; 018_6_11_c22; [hypothetical protein F8K4.9] Score = 19
018_6_11_g20	1	0.65	0.66	0.74	0.75	37_n11; 018_6_11_g20; [peptidylprolyl isomerase EC 5.2.1.8] Score = 270
018_6_11_i04	1	0.38	0.41	0.56	0.94	37_l18; 018_6_11_i04; [plasma membrane intrinsic protein] Score = 90

Datentabelle der 108 in *def-101* Petalen P3 signifikant regulierten ESTs

EST_Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle			Blast-Homologie
	K -> W 0h	K -> 24h	K ->72h	
018_1_01_e05	1	1.07	1.56	ribulose-bisphosphate carboxylase EC 4.1.1.39 small chain precursor
018_1_01_n17	1	0.68	0.58	lipid transfer protein
018_1_02_e19	1	0.88	0.72	
018_1_03_a19	1	0.85	0.78	
018_1_03_c19	1	1.05	1.34	gibberellin-regulated protein (GEG)
018_1_03_n20	1	1.22	1.46	plasma membrane intrinsic protein
018_1_05_c17	1	1.26	1.13	N-carbamyl-L-amino acid amidohydrolase EC 3.5.-.-
018_1_06_d03	1	1.21	1.23	photosystem II 10K protein precursor
018_1_07_i03	1	1.19	1.63	S)-2-hydroxy-acid oxidase EC 1.1.3.15
018_1_08_a07	1	1.09	0.82	glyoxylase I (Glo1)
018_1_10_k07	1	0.82	0.72	extensin-like protein
018_1_10_k11	1	0.89	0.83	MADS box protein DEFICIENS
018_1_11_h07	1	1.02	1.34	putative reductase / dehydrogenase
018_2_02_p22	1	1.22	0.93	gibberellin induced protein (Gip1)
018_2_04_h01	1	0.81	0.63	senescence-associated protein-like
018_2_04_h02	1	0.85	0.83	pectinesterase-like protein
018_2_04_h21	1	0.92	0.82	putative methionyl-tRNA synthetase
018_2_05_m05	1	0.95	0.83	
018_2_08_d19	1	1.17	1.25	light inducible tissue-specific ST-LS1 protein
018_2_11_p05	1	0.78	0.61	histidine-rich glycoprotein
018_3_05_g01	1	0.96	0.77	putative ribosomal protein L2
018_3_06_a12	1	1.14	1.20	
018_3_06_f10	1	1.40	1.61	hypothetical protein
018_3_06_h21	1	0.82	0.77	hypothetical protein
018_3_06_k04	1	1.03	1.31	
018_3_08_o11	1	0.84	0.80	alpha-1,4-glucan protein synthase (UDP-forming)
018_3_11_i04	1	0.88	0.83	cysteine proteinase EC 3.4.22.-
018_3_12_n15	1	0.83	0.99	pectinacetylsterase
018_4_02_a08	1	0.83	0.76	
018_4_03_c07	1	0.60	0.60	lipid transfer protein
018_4_03_m12	1	1.23	1.16	plasma membrane intrinsic protein
018_4_04_b17	1	1.15	1.24	
018_4_04_e02	1	1.27	1.31	phosphoribosylformylglycinamide synthase EC 6.3.5.3
018_4_04_l03	1	1.11	1.21	
018_4_04_m01	1	1.16	1.24	
018_4_05_d23	1	0.93	0.73	nonspecific lipid transfer protein
018_4_05_m21	1	1.26	1.54	hypothetical protein
018_4_05_m22	1	1.10	1.25	acyl-CoA oxidase EC 1.3.3.6 peroxisomal
018_4_06_e01	1	0.79	0.82	lipid transfer protein
018_4_06_h09	1	1.17	1.28	
018_4_07_k15	1	1.18	1.31	
018_4_08_e05	1	1.14	1.22	
018_4_08_m10	1	0.82	0.83	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase EC 5.4.3.8
018_4_10_l17	1	0.78	0.57	cell wall protein clone pAt2191
018_4_11_e06	1	1.23	1.30	
018_4_11_h12	1	0.86	0.67	nonspecific lipid transfer protein
018_4_11_m24	1	0.83	0.76	lipid transfer protein
018_4_11_n11	1	1.15	1.21	putative protein kinase
018_4_12_h18	1	1.20	1.34	hypothetical protein
018_4_12_l16	1	1.15	1.22	hypothetical protein
018_4_12_m17	1	1.27	1.32	
018_5_01_c10	1	1.13	1.26	beta-glucosidase EC 3.2.1.21
018_5_01_e02	1	1.21	1.31	beta-glucosidase EC 3.2.3.1 2
018_5_01_o10	1	0.91	0.82	MADS box protein DEFICIENS

EST_Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle			Blast-Homologie
	K -> W 0h	K -> 24h	K ->72h	
018_5_02_c06	1	1.19	1.25	catalase EC 1.11.1.6
018_5_02_d01	1	1.20	1.27	photosystem II oxygen-evolving complex protein 3
018_5_02_g06	1	1.47	1.75	ribulose-bisphosphate carboxylase activase EC 6.3.4.-
018_5_03_c12	1	0.81	0.76	non-muscle myosin alkali light chain 1 fast skeletal muscle
018_5_03_k19	1	0.86	0.81	glycine-rich RNA-binding protein
018_5_03_m03	1	0.74	0.51	methionine synthase
018_5_04_f05	1	0.90	0.78	1A tubulin beta chain
018_5_04_j22	1	1.17	1.33	LytB-like protein
018_5_05_a15	1	0.85	0.55	extensin-like protein GPP1
018_5_05_f17	1	1.29	1.23	plasma membrane intrinsic protein
018_5_05_g13	1	2.42	1.82	H+-transporting ATP synthase EC 3.6.1.34
018_5_05_h10	1	0.78	0.70	putative protease inhibitor
018_5_06_e10	1	0.95	0.56	GDSL-motif lipase
018_5_06_l02	1	0.96	0.77	beta-ketoacyl-ACP synthase
018_5_06_m19	1	1.28	1.47	unknown protein
018_5_07_h11	1	1.20	1.22	omega-3 fatty acid desaturase EC 1.14.99.-
018_5_08_f10	1	0.97	1.26	ankyrin-like protein
018_5_08_f14	1	0.73	0.69	
018_5_08_l22	1	0.87	0.79	UDPglucose 6-dehydrogenase EC 1.1.1.22
018_5_08_p16	1	0.84	0.83	ubiquitin / ribosomal protein CEP52
018_5_09_a01	1	1.28	1.30	NOI protein
018_5_10_b16	1	1.25	1.35	acyl-ACP thioesterase
018_5_10_f12	1	1.24	1.31	aquaporin 2
018_5_10_g10	1	1.20	1.16	catalase EC 1.11.1.6
018_5_10_h14	1	1.14	1.27	mevalonate disphosphate decarboxylase
018_5_10_l07	1	0.97	0.76	hypothetical protein
018_5_10_o07	1	1.10	1.23	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase NADP+ EC 1.2.1.9
018_5_11_l14	1	0.82	0.88	translation elongation factor eEF-1 alpha chain
018_5_11_m16	1	0.85	0.82	reversibly glycosylated polypeptide (RGP1)
018_5_11_o03	1	0.84	0.72	UDP-glucose 6-dehydrogenase EC 1.1.1.22
018_5_12_a18	1	1.20	1.33	(nifS) nitrogen fixation protein
018_5_12_g06	1	1.24	1.31	ribonuclease II-related protein
018_5_12_h08	1	1.29	1.02	
018_5_12_k20	1	0.93	0.71	1A tubulin beta chain
018_6_01_l02	1	1.25	1.15	
018_6_01_m06	1	1.22	1.30	pol polyprotein homolog
018_6_01_o03	1	0.97	0.79	1A tubulin beta chain
018_6_02_b22	1	1.19	1.25	GDSL-motif lipase / hydrolase
018_6_02_c01	1	0.89	0.79	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC 1.2.1.12
018_6_02_k02	1	0.99	0.79	chitinase EC 3.2.1.14
018_6_03_e01	1	0.89	0.57	GDSL-motif lipase / hydrolase
018_6_03_k04	1	1.23	1.14	catalase EC 1.11.1.6
018_6_06_e10	1	1.25	1.17	lipoxygenase EC 1.13.11.12
018_6_06_g05	1	0.79	0.74	
018_6_06_k20	1	0.86	0.76	glycine hydroxymethyltransferase EC 2.1.2.1
018_6_06_o02	1	0.99	0.78	chitinase EC 3.2.1.14 precursor
018_6_07_g22	1	0.67	0.68	naringenin-chalcone synthase EC 2.3.1.74
018_6_07_m18	1	0.82	0.82	naringenin 3-dioxygenase EC 1.14.11.9
018_6_08_h14	1	1.20	1.25	MATE efflux protein-related
018_6_08_j11	1	0.85	0.64	
018_6_08_j23	1	1.34	1.54	plastid-lipid associated protein (PAP)
018_6_08_n20	1	0.92	0.80	CER1-like protein
018_6_09_l20	1	1.17	1.40	ribulose-bisphosphate carboxylase activase EC 6.3.4.-
018_6_10_n18	1	0.90	0.81	MADS box protein DEFH84

Datentabelle der 83 temperatursensitiven EST in WT Petalen P3

EST_Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle			Blast-Homologie
	K -> W 0h	K -> 24h	K ->72h	
018_1_01_d16	1	0.83	0.75	
018_1_01_n17	1	0.85	0.81	nonspecific lipid transfer protein
018_1_01_o10	1	0.92	0.83	acyl carrier protein
018_1_03_a19	1	1.13	1.23	putative protein
018_1_03_f20	1	1.20	1.23	
018_1_03_j01	1	0.79	0.81	gEgh7 protein
018_1_04_p02	1	1.10	1.21	plasma membrane intrinsic protein
018_1_05_e01	1	0.87	0.81	papain-like cysteine proteinase
018_1_05_m05	1	0.99	1.34	prolin-rich protein
018_1_05_o18	1	0.74	0.71	naringenin-chalcone synthase EC 2.3.1.74
018_1_06_b21	1	0.82	0.79	
018_1_07_j17	1	1.04	1.28	hypothetical protein
018_1_08_a07	1	0.71	0.63	lactoylglutathione lyase
018_1_08_i13	1	1.20	1.36	glutathione S-transferase
018_1_09_b24	1	0.96	0.69	extensin-like protein
018_1_10_a05	1	0.78	0.77	cold stress protein SRC1
018_1_11_p17	1	0.86	0.82	pectate lyase
018_1_12_k15	1	0.81	0.83	retinoid-x-receptor
018_2_02_b15	1	0.81	0.81	very-long-chain fatty acid condensing enzyme
018_2_02_l17	1	1.25	1.12	heat shock cognate protein
018_2_03_k11	1	0.74	0.77	
018_2_05_k04	1	0.73	0.66	expressed protein
018_2_05_k14	1	0.80	0.79	cytochrome-c oxidase
018_2_05_p14	1	1.25	1.29	epimerase / dehydratase-like protein
018_2_07_b06	1	1.13	1.25	homoserine dehydrogenase-like protein
018_2_07_f19	1	0.88	0.80	CCR4-associated factor1-like protein
018_2_08_k21	1	1.16	1.26	
018_2_09_f04	1	1.02	1.39	prolin-rich protein
018_2_09_i08	1	1.17	1.39	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit
018_2_10_n20	1	1.12	1.22	glutathione S-transferase
018_2_11_c21	1	0.84	0.73	unknown protein
018_2_11_p05	1	1.23	0.85	histidine-rich glycoprotein
018_3_01_d19	1	0.75	0.77	putative APG protein
018_3_01_i07	1	1.13	1.22	pectinacylesterase
018_3_03_h06	1	1.47	1.64	hypothetical protein
018_3_05_g01	1	0.69	0.62	putative ribosomal protein L2
018_3_08_i15	1	1.20	1.22	dihydroflavonol-4-reductase
018_3_10_b12	1	0.80	0.81	Acyl-CoA independent ceramide synthase
018_3_12_a18	1	1.24	1.28	hypothetical protein
018_3_12_m18	1	0.88	0.83	NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase
018_4_02_l06	1	0.79	0.69	
018_4_04_c08	1	1.28	1.11	anthocyanidin synthase
018_4_05_d23	1	1.00	1.27	nonspecific lipid transfer protein
018_4_05_n17	1	0.85	0.77	chalcone-flavonone isomerase
018_4_06_a13	1	0.84	0.80	
018_4_06_e01	1	1.29	1.21	nonspecific lipid transfer protein
018_4_06_l01	1	0.67	0.69	
018_4_08_n09	1	1.11	1.21	NADH-ubiquinone oxireductase

EST_Nummer	Ratios im Vergleich zur Kontrolle			Blast-Homologie
	K -> W 0h	K -> 24h	K ->72h	
018_4_09_i05	1	1.27	1.26	tonoplast intrinsic protein
018_4_10_l17	1	0.64	0.64	putative cell wall protein
018_5_01_p23	1	0.96	0.82	reversibly glycosylated polypeptide
018_5_02_p04	1	1.21	1.11	naringenin 3-dioxygenase
018_5_03_l13	1	0.76	0.83	unknown protein
018_5_03_m03	1	0.80	0.81	methionine-synthase
018_5_03_o15	1	1.02	0.79	putative APG protein
018_5_04_j22	1	1.13	1.21	LytB-like protein
018_5_05_a15	1	1.10	0.63	extensin-like protein GPP1
018_5_05_d10	1	1.14	1.22	putative serine protease-like protein
018_5_05_f17	1	1.29	1.44	aquaporin
018_5_05_g13	1	1.29	1.12	ATP-synthase beta subunit
018_5_05_h10	1	1.26	0.95	lipid transfer protein-like
018_5_05_m12	1	0.93	0.71	unknown protein
018_5_08_f14	1	0.87	0.83	hypothetical protein
018_5_08_l10	1	1.08	0.81	hypothetical protein
018_5_08_o23	1	1.29	1.33	plasma membrane intrinsic protein
018_5_09_a01	1	1.05	1.21	NOI protein
018_5_09_n18	1	1.18	1.47	plasma membrane intrinsic protein
018_5_10_i17	1	1.29	1.10	cinnamoyl CoA reductase-like protein
018_5_10_l07	1	0.74	0.62	hypothetical protein
018_5_12_k20	1	0.91	0.83	alpha-tubulin
018_6_01_c02	1	0.77	0.79	hypothetical protein
018_6_03_e01	1	1.08	0.80	putative GDSL-motif lipase / acylhydrolase
018_6_05_e03	1	0.80	0.82	AMP deaminase homolog
018_6_07_g22	1	0.87	0.83	naringenin-chalcone synthase EC 2.3.1.74
018_6_07_m18	1	1.31	1.07	naringenin 3-dioxygenase EC 1.14.11.9
018_6_08_b16	1	1.35	1.30	plasma membrane intrinsic protein
018_6_08_h10	1	1.18	1.28	aquaporin
018_6_08_j05	1	0.80	0.86	
018_6_08_j11	1	1.31	0.71	hypothetical protein
018_6_10_c13	1	1.41	1.23	anthocyanidin synthase
018_6_10_e14	1	1.24	1.28	K ⁺ channel protein
018_6_10_i02	1	1.26	1.12	actin
018_6_11_g02	1	0.90	0.83	ataxin-2 related domain protein

7.4 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Molekulare Pflanzengenetik (Leitung: Herr Prof. Dr. Heinz Saedler) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Sabine Zachgo angefertigt.

Prof. Dr. Heinz Saedler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Klaus Harter danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sabine Zachgo für die Überlassung des Themas und die nicht nur fachlich hervorragende Betreuung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zachgo und vielen anderen der Abteilung Saedler für die sehr angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre. Ein besonderes Dankeschön gilt allen, die technisch oder in beratender Funktion und im Rahmen der Kollaborationen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen fleißigen Korrekturlesern sei ganz herzlich gedankt.

Bei Holger möchte ich mich im Allgemeinen für das Spezielle bedanken und bei meiner Familie für die stete Unterstützung.

7.5 Eidesstattliche 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 den unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Heinz Saedler betreut worden.

Teilpublikationen:

Bey, M., Stüber, K., Fellenberg, K., Schwarz-Sommer, Z., Sommer, H., Saedler, H., and Zachgo, S. (2004) Characterization of Antirrhinum Petal Development and Identification of Target Genes of the Class B MADS box Gene *DEFICIENS*.

The Plant Cell **16**: 3197-3215

Bey, M., Müller, B.M., Lauri, A., and Zachgo, S. (2002) Downstream of *DEFICIENS*: Towards the Isolation of Target Genes. Flowering Newsletter **34**: 19-26

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Melanie Bey
Anschrift: Herderstr. 88, 50935 Köln
Geburtsdatum: 23.04.1975
Geburtsort: Olpe
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981 - 1985 Johannes-von-der-Haardt Grundschule Bilstein
1985 - 1994 Städtisches Gymnasium der Stadt Lennestadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Beruf:

Okt. 1994 - März 2000 Hochschulstudium an der Mathematisch -
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Botanik und Biochemie
Abschluss: Diplom-Biologin (15.03.2000)

Seit Mai 2000 Promotionsstudium im Fach Biologie
an der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität zu Köln
Experimentelle Arbeit im Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung, Köln Vogelsang
Arbeitsgruppe Dr. Sabine Zachgo
Betreuer: Prof. Dr. Heinz Saedler

Seit Mai 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im MPIZ