

**Charakterisierung phylogenetisch informativer
MADS-Box-Gene aus der Gymnosperme
Gnetum gnemon L.**

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

vorgelegt von
Annette Becker
aus Bad Hersfeld

Köln 2000

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Saedler
Prof. Dr. Hansjörg Schneider-Poetsch

**In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am
Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während
sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen
erstreckt.**

Sir Isaac Newton (1643 – 1727)

To Indiana

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Ausbildung neuer Strukturen während der Evolution.....	1
1.2 MADS-Box-Transkriptionsfaktoren.....	3
1.3 Die Rolle der MADS-Box-Gene in der Spezifizierung von Blütenorganidentität.....	6
1.4 Weitere Funktionen von MADS-Box-Genen.....	9
1.5 Anthophyten oder Anti-Anthophyten?.....	11
1.6 Gnetales als Modellgymnospermen.....	14
1.7 MADS-Box-Gene aus <i>Gnetum gnemon</i>	19
1.8 Ziele der Arbeit.....	21
2. Materialien und Methoden.....	23
2.1 Pflanzenmaterial.....	23
2.2 Chemikalien, Enzyme, Primer und Radioisotope.....	23
2.3 Medien, Puffer und Lösungen.....	24
2.4 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmidvektoren.....	24
2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> – Bakterien.....	25
2.6 Aufreinigen von PCR-Produkten und Gelelution.....	25
2.7 Isolierung von Gesamt-RNA und PolyA ⁺ -RNA	25
2.8 Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosemembranen.....	26
2.8.1 DNA-Geltransfer	26
2.8.2 RNA-Geltransfer	26
2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	26
2.10 PCR-gestützte Methoden.....	27
2.10.1 3'RACE-PCR (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	27
2.10.2 5'RACE-PCR (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	28
2.10.3. RAGE-PCR (<i>Rapid Amplification of Genomic Ends</i>).....	28

2.11 Isolierung der <i>GGM12</i> cDNA durch screening einer cDNA Bank	29
2.12 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	29
2.12.1 Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials	30
2.12.2 Herstellen von DIG-markierten RNA-Sonden	30
2.12.3 Vorbehandlung des Gewebes zur in-situ-Hybridisierung	31
2.12.4 Hybridisierung	32
2.12.5 Nachbehandlung	33
2.13 DNA-Sequenzierungen	34
2.14 Computergestütze Analysen	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Klonierung der cDNAs von <i>GGM10-GGM19</i>	35
3.2. Phylogenetische Analysen von <i>GGM10-GGM19</i> und <i>ZMM17</i>	35
3.3. Genomische Southernblot-Analysen der Gene <i>GGM10-GGM19</i>	44
3.4 Expressionsstudien	49
3.4.1 Expressionsmuster der hauptsächlich auf männliche Reproduktionseinheiten beschränkten Gene <i>GGM7</i> und <i>GGM15</i>	51
3.4.2 Expressionsmuster der <i>AGL6</i> -ähnliche Gene <i>GGM9</i> und <i>GGM11</i>	53
3.4.3 Expressionsmuster des <i>STMADS11</i> -ähnlichen Gens <i>GGM12</i>	55
3.4.4 Expressionsmuster des <i>B_{sister}</i> -Gens <i>GGM13</i>	55
3.4.5 Expressionsmuster des <i>B_{sister}</i> -Gens <i>ZMM17</i>	59
3.5 Aufklärung der Exon/Intron-Struktur von <i>GGM13</i> und <i>ZMM17</i>	64
3.6 Analyse des putativen <i>GGM13</i> -Promotors	66
4. Diskussion	67
4.1 Diversität der MADS-Box-Gene in <i>Gnetum gnemon</i>	67
4.2 Rekonstruktion der Anzahl von MADS-Box-Genen im letzten gemeinsamen Vorfahren der Angiospermen und Gymnospermen	69
4.3 <i>GGM9</i> und <i>GGM11</i> spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Reproduktionseinheiten	72
4.4 <i>GGM12</i> als Phasentransitions-Gen der Gymnospermen	75

4.5 <i>GGM13</i> und <i>ZMM17</i> bilden die neue Subfamilie B _{sister} , die Schwestergruppe der B-Gene.....	79
4.5.1 Hypothesen über die Funktion der B _{sister} -Gene in Gymnospermen und Angiospermen.....	80
4.5.2 Mögliche Regulation der B _{sister} -Gene in Gymnospermen und Angiospermen.....	85
4.5.3 Der Zusammenhang zwischen der Aufspaltung der B- und B _{sister} -Gen-Linien und der Evolution der Heterosporie	86
4.6 Ausblick.....	88
5. Zusammenfassung	90
6. English abstract.....	92
7. Literaturverzeichnis.....	94
8. Anhang.....	111
A cDNA des Gens <i>GGM10</i>	112
B cDNA des Gens <i>GGM11</i>	113
C cDNA des Gens <i>GGM12</i>	114
D cDNA des Gens <i>GGM13</i>	115
E cDNA des Gens <i>GGM14</i>	116
F cDNA des Gens <i>GGM15</i>	117
G cDNA des Gens <i>GGM16</i>	118
H cDNA des Gens <i>GGM17</i>	119
I cDNA des Gens <i>GGM18</i>	120
J cDNA des Gens <i>GGM19</i>	121
K Genomische Sequenz des Gens <i>ZMM17</i>	122
L Genomische Sequenz des Gens <i>GGM13</i>	123
M Promotorsequenz des Gens <i>GGM13</i>	124
N Sequenzen der verwendeten Primer.....	125
Abkürzungsverzeichnis.....	128
Abbildungsverzeichnis.....	129
Eidesstattliche Erklärung.....	130
Danksagungen.....	131
Lebenslauf	133

1. Einleitung

MADS-Box-Gene (Schwarz-Sommer et al., 1990) codieren für Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich an der Regulation einer Vielzahl von pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Dazu zählen z.B. Wurzelentwicklung ebenso wie Blatt-, Blüten- und Fruchtentwicklung. Die Regulation dieser unterschiedlichsten Entwicklungsprozesse ist innerhalb der Angiospermen wie *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* und *Petunia hybrida* mittlerweile recht gut verstanden. Demgegenüber fehlt fast jegliche Information über die entsprechende molekulare Entwicklung und deren Regulation in Gymnospermen. Die Isolation und Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus Gymnospermen und deren anschließende Zuordnung zu bestimmten Entwicklungsprozessen könnte wichtige Einblicke in die Entwicklung der Bedecktsamer geben. Wichtige Schlüsselgene der Pflanzenentwicklung wie die MADS-Box-Gene spielen höchstwahrscheinlich auch eine Rolle in der Evolution der in der Pflanzenentwicklung entstehenden Strukturen. So könnten durch die Analyse von MADS-Box-Genen in phylogenetisch aussagekräftigen Taxa die Mechanismen der Makroevolution möglicherweise besser verstanden werden.

Unserem momentanen Wissensstand nach besaß der letzte gemeinsame Vorfahre von Angiospermen und Gymnospermen vor ca. 300 Millionen Jahren mindestens sieben MADS-Box-Gene, die in ihrer Sequenz bereits divers waren und vermutlich unterschiedliche Funktionen ausführten. Veränderungen in Anzahl, Sequenz, Expression und Funktion dieser ursprünglichen MADS-Box-Gene könnte eine der Hauptursachen für die Entwicklung neuer Strukturen während der Evolution der Landpflanzen, wie z. B. Blüten- und Fruchtbildung gewesen sein. Ein Vergleich der MADS-Box-Gene von Gymnospermen und Angiospermen könnte demnach wertvolle Informationen über die Evolution spezifischer Charaktere der Angiospermen geben.

1.1. Die Ausbildung neuer Strukturen während der Evolution

Ernst Haeckel erkannte bereits im 19. Jahrhundert, daß ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Lebewesen und deren Evolution besteht (Haeckel, 1866). In dem von ihm formulierten „Biogenetischen Grundgesetz“ heißt es sinngemäß, die Entwicklung eines Organismus sei eine kurze und schnelle Zusammenfassung seiner Phylogenie. Damals konnte Haeckel seine Theorie jedoch nur auf beschreibende Daten

embryonaler Entwicklungsstadien verschiedener Tiere stützen, so daß der kausale Zusammenhang zwischen Evolution und Ontogenese unklar blieb. Mit fortschreitender molekularbiologischer Forschung wird aber immer deutlicher, daß die gleichen Gene, welche die Entwicklung des Bauplans eines multizellulären Lebewesens steuern, auch in der Evolution dieses Bauplans eine entscheidende Rolle gespielt haben müssen und somit das „Bindeglied“ zwischen Evolution und Entwicklung darstellen (Theißen und Saedler, 1995).

Diese, für Entwicklung und Evolution äußerst wichtigen, meist homöotischen oder heterochronischen Gene entstammen einigen wenigen Multigen-Familien, die für Transkriptionsfaktoren codieren und innerhalb von hierarchisch aufgebauten regulatorischen Gennetzwerken agieren. Als am besten untersuchtes Beispiel sei hier die Familie der Homöobox-Gene genannt, die eine Schlüsselrolle in der Tierentwicklung und -evolution spielen (Gehring, 1992; Slack et al., 1993; McGinnis und Kuziora, 1994).

Eine ähnlich wichtige Funktion wie den Homöobox-Genen bei der Tierentwicklung kommt den MADS-Box-Genen bei der Pflanzenentwicklung zu. MADS-Box-Gene kontrollieren die unterschiedlichsten Bereiche der Pflanzenentwicklung und spielen besonders bei der Festlegung der Organidentitäten innerhalb der Blüte eine entscheidende Rolle (Meyerowitz et al., 1994; Weigel und Meyerowitz, 1994; Theißen und Saedler, 1999; Theißen et al., 2000).

Viele Fragen der Makroevolution der Pflanzen können mit Hilfe von molekularen Daten eventuell besser beantwortet werden als durch Paläobotanik allein, da Homologien von morphologischen Strukturen unterschiedlicher Pflanzen nicht geklärt werden müssen. Zum Beispiel ist in jüngster Zeit mit molekularen Markern (*18S rDNA*, *atpB*, *atp1*, *matR*, und *rbcL*) geklärt worden, daß *Amborella*, eine buschartige Pflanze aus Neukaledonien, die ursprünglichste aller rezenten Angiospermen ist (Qiu et al., 1999; Soltis et al., 1999). Dieses Ergebnis hilft jedoch bei der Frage nach der ersten Blütenpflanze nur bedingt weiter, denn vom heutigen Standpunkt aus kann nicht mit Bestimmtheit geklärt werden, ob die Blüte von *Amborella* der ursprünglichen Angiospermen-Blüte entspricht, oder aber einen abgeleiteten Zustand repräsentiert. Molekularen Daten entsprechend, trennte sich die Linie, die zu den rezenten Angiospermen führte, vor ca. 300 Millionen Jahren von der Gymnospermen-Linie (Goremykin et al., 1997). Erst aus viel späterer Zeit (vor ca. 130 Millionen Jahren) sind Fossilien von Blütenpflanzen bekannt (Endress 1994; Crane et al., 1995). Innerhalb dieser Zeitspanne können sich die heute als ursprünglich angesehenen Pflanzen wie *Amborella* oder andere Vertreter der „ANITA“-Gruppe, zu denen Nymphaeales, Illiciales, *Trimenium* und *Austrobeileya* gehören (Qiu et al., 1999; Soltis et al., 1999), sehr weit vom ursprünglichen Angiospermen-Blütentyp weg entwickelt haben. Allerdings zeigen viele fossile Blüten aus der

frühen Kreidezeit eine starke Ähnlichkeit zu denen der rezenten „ANITA“-Gruppe (Crane et al., 1995; Qiu et al., 1999). Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Pflanzen möglicherweise doch nicht sehr stark vom ursprünglichen Blütentyp abweichen. Ein Merkmal der rezenten und als ursprünglich geltenden Angiospermen konnte in der Arbeit von Qiu et al. (1999) charakterisiert werden: Die Mitglieder der basalen „ANITA“-Gruppe schließen ihre Karpelle erst während der Anthese durch sekretorisches Ausfüllen des Karpellinnenraums, was demnach auch für den letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Angiospermen anzunehmen ist.

Möglicherweise könnten durch Untersuchungen zur Blütenevolution auch die ersten Schritte zur Klärung molekularer Mechanismen der Makroevolution unternommen werden. Fragen beispielsweise nach dem Zusammenhang von durch Duplikation und Modifizierung neu entstandener Gene und dem Entstehen neuer Strukturen könnten beantwortet werden. Vorstellbar wäre aber auch, daß eine Veränderung in der Interaktion der Gene für Neuerungen in der Evolution verantwortlich ist.

Der Vergleich von Transkriptionsfaktoren aus Gymnospermen und Angiospermen ermöglicht auch das Stellen von spezielleren Fragen, wie z. B. ob die Gennetzwerke der Gymnospermen genauso komplex sind wie die der Angiospermen. Und ob sie möglicherweise aus jeweils orthologen Genen bestehen oder ob andere Gene ähnliche Funktionen ausführen. Vergleichende Studien zwischen Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Antirrhinum majus* mit der in dieser Arbeit gewählten Gymnosperme *Gnetum gnemon* könnten diese Fragen aufklären.

1.2 MADS-Box-Transkriptionsfaktoren

MADS-Box-Gene (Schwarz-Sommer et al. 1990) codieren für eine große Familie von Transkriptionsfaktoren, die in hohem Maße an der Entwicklung von mehrzelligen Organismen teilhaben (Shore und Sharrocks, 1995; Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996; Theißen et al., 2000; Riechmann und Meyerowitz, 1997). Da MADS-Box-Proteine vermutlich in allen eukaryotischen Lebewesen vorkommen, besaß höchstwahrscheinlich der letzte gemeinsame Vorfahre von Pflanzen, Pilzen und Tieren schon mindestens ein Protein mit einer echten MADS-Box (Theißen et al., 1996).

Die MADS-Box-Genfamilie kann in 3 große Abteilungen unterteilt werden: Die *ARG80*- oder *SRF*-Genfamilie, die *MEF2*-ähnlichen Gene und die MIKC-Typ-Gene (Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996; Hasebe und Banks, 1997; Münster et al., 1997). *SRF*-ähnliche Gene kommen in Tieren und Pilzen vor, die mit ihnen verwandte monophyletische Gruppe der *AGL34*-ähnlichen Gene wurde aber auch in Pflanzen gefunden (Alvarez-Buylla et al., 2000). Die MADS-Box-Gene vom MIKC-Typ sind hingegen auf das Pflanzenreich beschränkt und näher mit *MEF2*-ähnlichen Genen verwandt als mit den *SRF*- oder *ARG80*-ähnlichen (Alvarez-Buylla et al., 2000). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich diese Genfamilien als noch weiter verbreitet herausstellen als bisher angenommen wurde (Theißen et al., 2000), da noch von keinem eukaryotischen Taxon die vollständige genomische Sequenz in ausreichender Qualität bekannt ist.

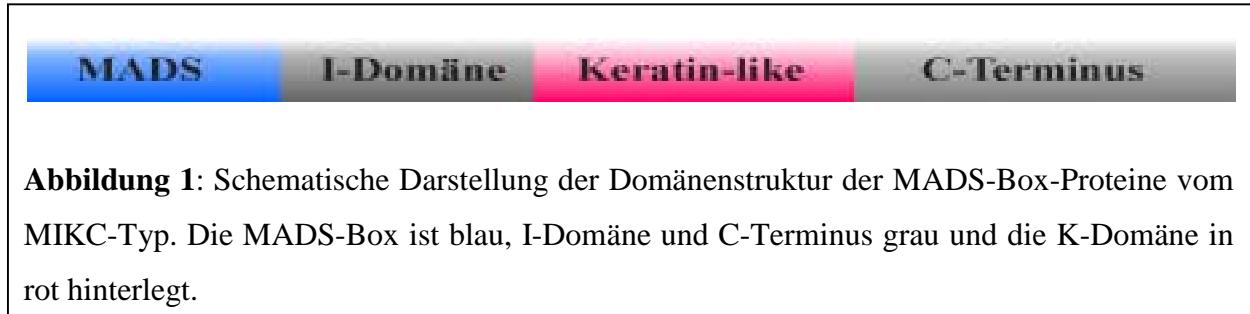
Die wichtigste funktionelle Gemeinsamkeit aller MADS-Box-Gene ist deren Kontrolle von Entwicklung oder Zelldifferenzierung (Shore und Sharrocks, 1995). Als Beispiel seien hier *SRF* aus dem Menschen und die zu den *ARG80*-ähnlichen Genen zählenden *ARG80* und *MCM1* aus Bäckerhefe genannt. Am besten untersucht ist die Funktion von *MCM1* während der Determinierung von Hefe-Zelltypen. *SRF*, das aus diversen Vertebraten bekannt ist, ist in die molekulare Kontrolle von muskelspezifischen Genen eingebunden. Das orthologe Gen aus *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) z. B. kontrolliert die Tracheenentwicklung und andere Ontogeneseprozesse. *ARG80* reguliert Gene, die Arginin umsetzende Enzyme codieren und *MCM1* ist an der Zellzyklus-Regulation beteiligt (Shore und Sharrocks, 1995; Johnson, 1995; Treismann, 1990).

Mitglieder der *MEF2*-Familie üben hauptsächlich Kontrolle über muskelzellspezifische Gene aus, haben aber möglicherweise auch Funktionen in anderen Zelltypen (Olsen et al., 1995).

In der entwicklungsgeschichtlichen Linie, die zu Pflanzen führte, evolvierte der MIKC-Typ, den die meisten bisher bekannten pflanzlichen MADS-Box-Gene zeigen. Dieser ist etwas näher mit *MEF2*-ähnlichen Genen verwandt als mit den anderen tierischen MADS-Box-Genen und somit liegt die Vermutung nahe, daß der gemeinsame Vorfahre der MIKC-Gene ähnlicher zu den *MEF2*- als zu den *ARG80*-ähnlichen Genen war (Theißen et al., 2000; Alvarez-Buylla et al., 2000).

Die charakteristische modulare Struktur der pflanzlichen MADS-Box-Proteine ist in Abbildung 1 (Seite 4) dargestellt. Bis auf wenige Ausnahmen zeigen alle bekannten pflanzlichen MADS-Box-Proteine den gleichen Aufbau, der die MADS-Domäne (M), die *intervening* (I),

die Keratin-ähnliche (K) und eine C-terminale (C) Domäne einschließt (Ma et al., 1991; Purugganan et al., 1995; Theissen et al., 2000). Die MADS-Domäne ist, nach der am häufigsten verwendeten Definition, 57 Aminosäuren lang und die am stärksten konservierte Region (Purugganan et al., 1995). Sie befindet sich meist am N-terminalen Ende des Proteins.



Nur sehr wenige pflanzliche MADS-Box-Proteine, wie z. B. *AGAMOUS* (Ma et al., 1996) besitzen eine N-terminale Verlängerung vor der MADS-Box und werden deshalb als NMIKC-Typ-Gene bezeichnet (Theissen et al., 2000). Die MADS-Domäne ist für den größten Teil der DNA-Bindeaktivität des Proteins verantwortlich (Shore und Sharrocks, 1995). Ein Teil der MADS-Domäne faltet sich zu einer antiparallel gedrehten Spirale von α -Helices, die flach auf der kleinen Furche der DNA liegt (Pellegrini et al., 1995). Dabei wird die DNA je nach gebundenem MADS-Box-Protein auf spezifische Weise gebogen, wobei jedoch der prinzipielle Mechanismus des Verbiegens der DNA bei allen MADS-Box-Proteinen gleich ist (West und Sharrocks, 1999). Ähnlich konserviert wie die Proteinsequenz der MADS-Box ist auch die Nucleotidsequenz ihrer Bindestellen. Diese werden CArG-Boxen (CC-A-reich-GG) genannt und basieren auf der Konsensus Sequenz CC(A/T)₆GG (Hill et al., 1998). Diese Sequenz ist in den Promotorsequenzen von MADS-Box-Genen und vielen anderen Genen vorhanden, die von MADS-Box-Genen reguliert werden (Shore und Sharrocks, 1995).

Die I-Domäne schließt sich direkt an die MADS-Box an, ist sehr variabel in Länge und Sequenz und nur sehr schwach konserviert (Ma et al., 1991; Münster et al., 1997). In wenigen MADS-Box-Genen aus *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, daß die I-Domäne eine Hauptrolle bei der spezifischen DNA-Bindung der Protein-Dimere spielt (Purugganan et al., 1995).

Stromabwärts der I-Domäne befindet sich die K-Domäne, die weder in MADS-Box-Genen von Tieren noch in denen von Pilzen vorkommt (Theissen und Saedler, 1995; Theissen et al., 1996). Innerhalb dieser Region im MADS-Protein sind hydrophobe Aminosäuren in einem regelmäßigen Muster so angeordnet, daß eine amphipathische Helix gebildet wird, die mit anderen solchen Helices in Wechselwirkung treten kann, um Dimere zu bilden (Shore und

Sharrocks, 1995; Riechmann und Meyerowitz, 1997). Durch die regelmäßig angeordneten hydrophoben Aminosäuren ist die K-Domäne besser konserviert als die I-Domäne oder die C-Domäne.

Die C-Domäne ist das variabelste Strukturmodul der pflanzlichen MIKC-Typ-MADS-Box-Gene, sowohl in Länge als auch in Sequenz. Sie spielt eine Rolle bei der Ausbildung von ternären Komplexen zwischen MADS-Box-Genen (Egea-Cortines et al., 1999) und anderen Transkriptionsfaktoren und trägt zur Transkriptionsaktivierung bei (Theißen et al., 2000). An Dimerisierung oder DNA-Bindung hingegen scheint die C-Domäne zumindest bei den daraufhin untersuchten MADS-Box-Proteinen nicht beteiligt zu sein (Zachgo et al., 1995).

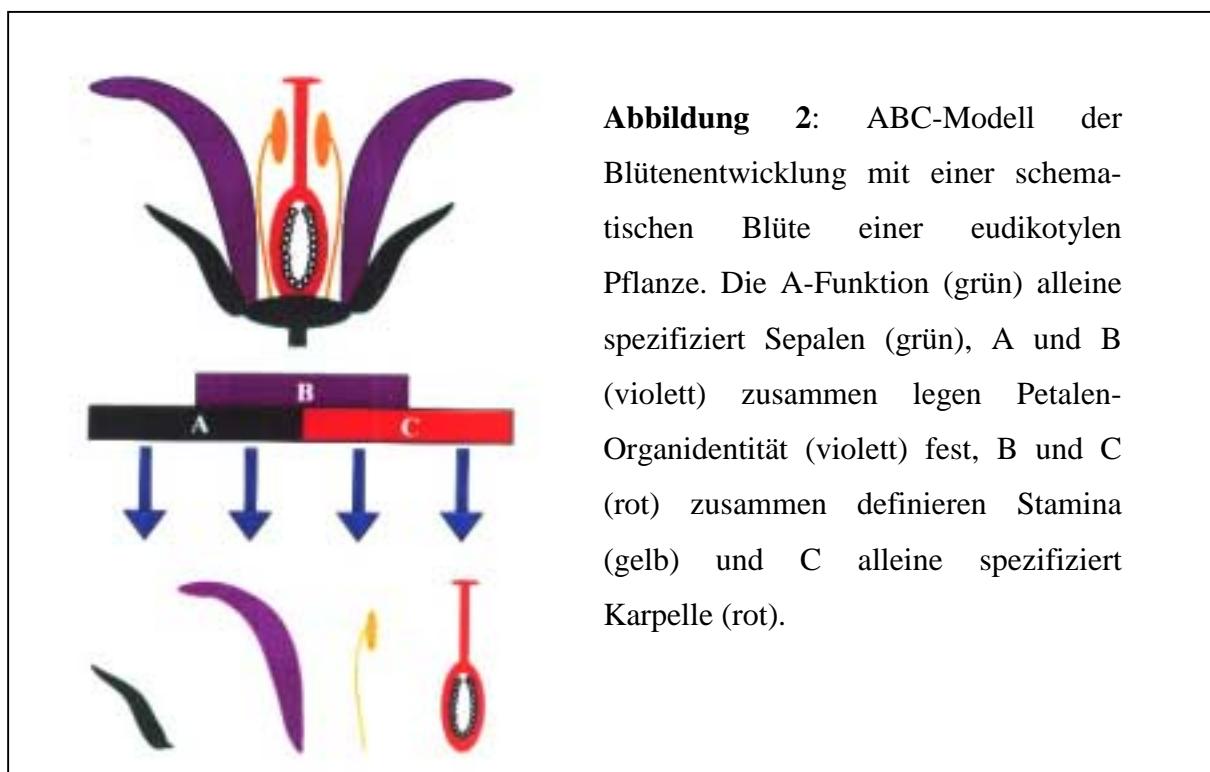
Phylogenetische Rekonstruktionen der MADS-Box-Genfamilie zeigen, daß diese aus mehreren gut abgrenzbaren Subfamilien besteht, wobei die Mitglieder jeder Subfamilie ähnliche Funktionen und Expressionsmuster aufweisen (Doyle, 1994; Theißen et al., 1996; Münster et al., 1997; Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996). Viele dieser Genfamilien spielen besonders in der Blütenentwicklung, aber auch in vielen anderen pflanzlichen Entwicklungsprozessen eine Schlüsselrolle als Entwicklungskontrollgene. Die Entstehung dieser Genfamilien, die so bedeutende Prozesse steuern, muß ein wichtiger Schritt in der Evolution der Pflanzen gewesen sein (Theißen et al., 2000). Um diesen Sachverhalt klären zu können, müssen MADS-Box-Gene aus phylogenetisch informativen Taxa wie z.B. Monokotylen, basalen Angiospermen, Gymnospermen, Farnen und Moosen untersucht werden und nicht nur, wie bisher größtenteils geschehen, in höheren Angiospermen wie *Arabidopsis*, *Antirrhinum* oder *Petunia* (Theißen und Saedler, 1999).

1.3 Die Rolle der MADS-Box-Gene in der Spezifizierung von Blütenorganidentität

Einige pflanzliche MADS-Box-Gene wie beispielsweise *DEFICIENS* (*DEF*) aus *Antirrhinum majus* und *AGAMOUS* (*AG*) aus *Arabidopsis thaliana* legen während der Entwicklung der Blüte die Organidentitäten fest (Sommer et al., 1990; Yanofsky et al., 1990). Drei verschiedene Klassen von floralen Organidentitätsfunktionen (homöotischen Funktionen) können unterschieden werden: A, B und C (siehe auch Abbildung 2, Seite 7). Die A-Funktion legt die Identität von Sepalen fest, A- und B-Funktion zusammen spezifizieren Petalen, B- und C-Funktion spezifizieren Stamina, und die C-Funktion allein legt Karpelle fest (Haughn und Sommerville, 1988; Weigel und Meyerowitz, 1994). In einigen bisher untersuchten

Wildtyp-Blüten, wie z. B. in *Arabidopsis*, werden A-Funktionsgene hauptsächlich in Wirtel eins und zwei, B-Funktionsgene in Wirtel zwei und drei, und C-Funktionsgene im dritten und vierten Wirtel exprimiert. Daher sind die Organe innerhalb der Blüte kreisförmig umeinander angeordnet (Weigel und Meyerowitz, 1994; Riechmann und Meyerowitz, 1997). Das ABC-Modell der Blütenentwicklung basiert zum größten Teil auf der Analyse von *Arabidopsis*- und *Antirrhinum*-Mutanten (Coen und Meyerowitz, 1991), ist als Modell aber nicht in der Lage, alle beobachtbaren Phänotypen von Mutanten zu erklären, und möglicherweise wird sich die Wirklichkeit als bedeutend komplizierter darstellen als das bisher herausgearbeitete ABC-Modell (Theißen et al., 2000).

Fast alle der bisher bekannten floralen Organidentitätsgene stammen aus der Familie der MADS-Box-Gene (zum Überblick siehe Theißen et al., 2000; Riechmann und Meyerowitz, 1997). In *Arabidopsis* wird die A-Funktion durch die beiden Gene *APETALA1* (*API*) (Mandel et al., 1992) und *APETALA2* (*AP2*) (Jofuku et al., 1994) realisiert, jedoch gehört *AP2* nicht zur MADS-Box-Genfamilie, sondern zur Familie der *AP2*-ähnlichen Gene (Okamuro et al., 1997). Die B-Funktion wird von *APETALA3* (*AP3*) (Jack et al., 1992) und *PISTILLATA* (*PI*)



(Goto und Meyerowitz, 1994) ausgeführt und die C-Funktion von *AGAMOUS* (*AG*) (Yanofsky et al., 1990). In *Antirrhinum* stellen *DEFICIENS* (*DEF*) (Sommer et al., 1990) und *GLOBOSA* (*GLO*) (Tröbner et al., 1992) die B-Funktion und *PLENA* (*PLE*) (Bradley et al., 1993) die C-Funktion. Eine Ovula-spezifizierende D-Funktion wurde bislang nur in *Petunia*

hybrida durch Mutanten definiert und wird von *FLORAL BINDING FACTOR7* und *FLORAL BINDING FACTOR11* (*FBP7*, *FBP11*) ausgeführt (Colombo et al., 1995). Ein *Arabidopsis* D-Funktionsgen wurde bislang noch nicht beschrieben, aufgrund von Sequenzähnlichkeiten ist aber *AGL11* der bisher beste Kandidat für die D-Funktion in *Arabidopsis* (Theissen und Saedler, 1999). Im Gegensatz zu *AGL11*, dessen Expression nicht im heranreifenden Samen nachgewiesen werden kann, sind *FBP7* und *FBP11* aber auch an der Entwicklung von Samen beteiligt und werden dort bevorzugt im maternalen Gewebe exprimiert (Colombo et al., 1997; Wittich et al., 1999).

Mittlerweile ist auch einiges an Wissen über die Regulation der floralen Organidentitätsgene zusammengetragen worden. Beispielsweise wird die Aktivität der funktionell redundanten *SEPALLATA1-3* MADS-Box-Gene (vormals *AGL2,4* und *9*) aus *Arabidopsis thaliana* benötigt, um Aktivität von B- und C-Funktionsgenen zu erhalten. Die Quantität, räumliche und zeitliche Verteilung der Expression der B- und C-Funktionsgene scheint dabei in *sepallata1-3* Dreifachmutanten nicht verändert zu sein, jedoch kann in solchen Mutanten die vollständige Konversion der Organe des zweiten, dritten und vierten Wirtels in Sepalen-ähnliche Strukturen und zusätzlich eine fehlende Determinierung der Blüte beobachtet werden. Diese Phänomene sind auf direkte oder indirekte Interaktion der *SEPALLATA*-Proteine mit *AG* oder *AP3/PI* zurückzuführen (Pelaz et al., 2000).

Parcy et al. (1998) konnten zeigen, daß das florale Meristem-Identitätsgen *LEAFY* (*LFY*) zwei voneinander trennbare Funktionen hat, nämlich Blütenmeristeme zu spezifizieren und die Expression von floralen Organidentitätsgenen zu regulieren. *LFY* kann in *Arabidopsis* *AP1* (A-Funktion) direkt aktivieren, ohne daß zusätzliche blüten- oder regionsspezifische Faktoren vorhanden sein müssen (Parcy et al., 1998; Wagner et al., 1999). Auch *AG* wird in *Arabidopsis* direkt durch *LFY* aktiviert, allerdings ist dazu ein noch unbekannter zusätzlicher Faktor X nötig (Busch et al., 1999). Auch die Aktivierung des B-Funktionsgens *AP3* benötigt *LFY* in Kombination mit anderen Faktoren wie z.B. *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) (Parcy et al., 1998). *UFO* ist wahrscheinlich kein Transkriptionsfaktor, denn es besitzt eine konservierte F-Box, die andere Proteine „ansteuert“, um deren Ubiquitin-Degradierung zu „veranlassen“ (Parcy et al., 1998). *UFO* könnte also an der Degradierung eines transkriptionalen Repressors der B-Funktionsgene *AP3* und *PI* beteiligt sein (Zhao et al., 1999).

Viel weniger als über die Regulation der ABC-Gene ist über ihre Zielgene bekannt. Erst kürzlich ist von Sablowsky und Meyerowitz (1998) ein direktes Zielgen von *AP3* identifiziert worden. Wenn dieses Gen, *NAP*, unter der Kontrolle des 35S-Promotors überexprimiert wird,

führt das zu verkürzten Stamina und Petalen durch behinderte Zellexpansion. *NAP1* spielt vermutlich in der Transition zwischen Wachstum durch Zellteilung und Wachstum durch Zellstreckung eine Rolle (Sablowsky und Meyerowitz 1998).

1.4 Weitere Funktionen von MADS-Box-Genen

Mehr als 40 MADS-Box-Gene sind bis dato in der Modellpflanze *A. thaliana* identifiziert worden (Liljegren et al., 1998), von denen nur einige an der Identitätsgebung der Blütenorgane beteiligt sind. Die Funktionen von MADS-Box-Genen in der Entwicklung von verschiedenen Organen sind vielfältig und reichen z. B. von Wurzelwachstum über die Kontrolle des Blühzeitpunktes bis zur Embryoentwicklung und auch in viele andere Bereiche hinein und reagieren dabei oft auf die Veränderung von Umweltfaktoren.

FLOWERING LOCUS C (FLC) z. B. legt den richtigen Zeitpunkt der Transition zur reproduktiven Phase der Pflanzenentwicklung als direkte Antwort auf Vernalisation fest und agiert dabei unabhängig von Gibberellinen als floraler Repressor (Sheldon et al., 2000).

Auch *ANR1* reguliert Pflanzenentwicklung in Reaktion auf Umweltfaktoren. *ANR* ist eine Komponente der Signaltransduktionskette, die bei Verfügbarkeit von NO_3^- zu einer Wurzelstreckung führt (Zhang und Forde, 1998; Zhang und Forde, 2000).

AGL17 ist ein MADS-Box Gen aus *A. thaliana* mit ebenfalls wurzelspezifischer Expression, über dessen genaue Funktion aber noch Unklarheit herrscht (Rounsley et al., 1995).

DefH125 codiert für ein pollenspezifisches MADS-Box-Protein aus *A. majus* und zeigt eine starke Homologie zu dem wurzelspezifischen MADS-Box Gen *AGL17* (Zachgo et al., 1997).

Ein anderes wurzelspezifisches MADS-Box Gen ist *MODULE MADS HOMOLOGY 7 (NMH7)*, das in *Medicago sativa*-Wurzelzellen nach deren Infektion mit dem Knöllchenbakterium *Rhizobium meliloti* exprimiert wird, um dann im Wirt die Expression von Wurzelknöllchen-spezifischen Genen zu induzieren (Heard und Dunn, 1995; Kirby et al., 1998).

AGL15 ist zwar nicht embryospezifisch, wird dort aber zehnmal so stark exprimiert wie in anderen Pflanzenteilen (Rounsley et al., 1995). *AGL15*-Protein akkumuliert stark in Embryonalgewebe, das somatischen Ursprungs ist; ein *AGL15*-Ortholog aus *Taraxacum officinale* („Habichtskraut“) konnte auch in embryonischem Gewebe nachgewiesen werden, das aus einem apomiktischen Reproduktionsvorgang entstanden ist. Die genaue Funktion von

AGL15 ist bislang noch unbekannt, es darf aber spekuliert werden, daß *AGL15* an der Regulation der Expression von Genen während der frühen Embryogenese beteiligt ist. Die Funktion von *AGL15*-ähnlichen Genen scheint sehr konserviert zu sein, da ähnliche Expressionsmuster in Monokotylen und Dikotylen nachgewiesen werden konnte (Perry et al., 1999).

Die MADS-Box-Gene *AGL1*, *AGL5* und *FRUITFUL* (*FUL*, vormals *AGL8*) sind an der Fruchtentwicklung von *A. thaliana* beteiligt (Liljegren et al., 1998).

Die Mitglieder der *STMADS11*-Subfamilie werden hauptsächlich in vegetativen Geweben exprimiert. *STMADS11*-Transkript findet man unabhängig von Lichteinwirkung in allen vegetativen Geweben in ungefähr gleicher Menge, jedoch etwas stärker in Leitgeweben (Carmona et al., 1998). Auch das ebenfalls aus Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) isolierte Gen *STMADS16* scheint für die vegetative Entwicklung von Pflanzen wichtig zu sein. *STMADS16* kann, wenn es unter der Kontrolle des 35S-Promotors überexprimiert wird, die Folgen einer Kurz-Tag-Photoperiode, nämlich größere Blattanzahl und eine Verlängerung der Zeit bis zur Blüte, reduzieren. Möglicherweise hängt *STMADS16*-Expression mit Längenwachstum und Erhaltung der Teilungsfähigkeit von Meristemen zusammen oder aber mit der Kontrolle von Zellteilungen, die zur Entwicklung von Organen entlang der Längsachse führen (Garcia-Maroto et al., 2000).

Das zur *STMADS11*-Subfamilie gehörende Gen *BM1* aus *Hordeum vulgare* (Gerste) wird, wie auch *STMADS11*, am stärksten in Leitgeweben exprimiert, aber auch in einer einzelnen meristematischen Zellschicht des ersten Nodus. Somit könnte *BM1* eine Rolle in der Regulation des vegetativen Sproßwachstums spielen (Schmitz et al., 2000).

Mehrere Vertreter der *STMADS11*-Subfamilie aus *Zea mays* sind in der Arbeitsgruppe G. Theißen bisher isoliert worden, zu denen zählen *ZMM19*, *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26* (G. Theißen und T. Münster, persönliche Mitteilung). Sie alle werden in vegetativen Geweben stärker exprimiert als in den Fahnen oder Kolben von Mais (L.U. Wingen, persönliche Mitteilung). Unter denen aus Mais isolierten Genen ist *ZMM19* besonders interessant, da es höchstwahrscheinlich für den Phänotyp der bekannten *tunicate*-Mutante (Neuffer et al., 1997) verantwortlich ist. Im Wildtyp ist dieses Gen nur in den die Maiskolben umgebenden Hüllspelzen angeschaltet, in der Mutante jedoch im ganzen Kolben und in der Fahne. Das führt zu einer Einhüllung sämtlicher weiblicher Maiskörner mit kleinen Hüllspelzen. Die männlichen Blüten von Mais werden bei starken Phänotypen teilweise verweiblicht und von Hüllspelzen umgeben. Die ektopische Expression von *ZMM19* kommt wahrscheinlich durch

die Insertion eines *Mu*-Transposons in der Promotorregion des Gens zustande (L.U. Wingen und G. Theißen, persönliche Mitteilung)

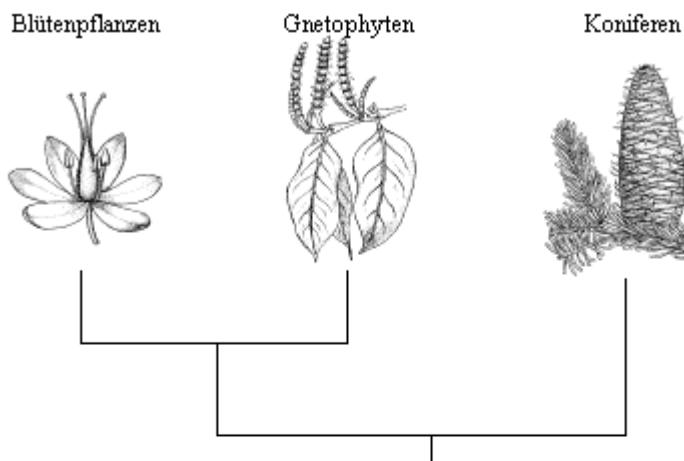
Der einzige bisher genauer untersuchte Vertreter der *STMADS11*-Subfamilie aus *Arabidopsis thaliana* ist das Gen *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), da hierfür eine Mutante zur Verfügung steht. Es reprimiert dosisabhängig die Bildung von Infloreszenzen, indem es alle Phasen der vegetativen Entwicklung verlängert und ist dabei nicht abhängig von Photoperiodik oder Vernalisation. *SVP* könnte auf zwei verschiedene Arten die florale Transition beeinflussen: Es könnte direkt die Infloreszenz-Entwicklung blockieren oder aber einen positiven Regulationseffekt auf einen floralen Repressor haben (Hartmann et al., 2000).

1.5 Anthophyten oder Anti-Anthophyten?

Die monophyletische Gruppe der „Samenpflanzen“ (Spermatophyta) umfaßt Angiospermen (Blütenpflanzen oder Bedecktsamer) und Gymnospermen (Nacktsamer). Gymnospermen bestehen aus vier verschiedenen rezente Gruppen, den Koniferen, den Cycadeen, den Gnetophyten (mit nur 3 Gattungen *Welwitschia*, *Gnetum* und *Ephedra*) und *Ginkgo* (mit der einzigen Art *Ginkgo biloba*). Viele Fragen zur Evolution der Angiospermen und ihrer Blüte können besser verstanden werden, wenn diese mit ihren nächsten Verwandten, ihrer Schwestergruppe verglichen werden können. Da Samenpflanzen nur aus Angiospermen und Gymnospermen bestehen, ist die Schwestergruppe der Angiospermen innerhalb der Gymnospermen zu suchen oder aber sie besteht aus den Gymnospermen als Ganzes.

Gemessen an einigen morphologischen Merkmalen stehen die Gnetales den Angiospermen näher als die anderen Gymnospermen-Gruppen. Beispielsweise führen Gnetales eine spezielle Form der doppelten Befruchtung durch und besitzen Hüllstrukturen um Ovula und Antherophoren. Daher wurden sie in der Vergangenheit in vielen Arbeiten als mögliche Vorfahren der Angiospermen postuliert. Als Clade der Anthophyten wurden Anfang des letzten Jahrhunderts von Arber und Parkin (1907 und 1908) Angiospermen und Gnetales zusammengefaßt. Später wurden dann noch die ausgestorbenen Samenfarne Bennettitales und *Pentoxylon* von Doyle (1994) zu den Anthophyten hinzugefügt (siehe auch Crane et al., 1995; Doyle, 1996). Einige Studien behaupten sogar, der Ursprung der Angiospermen liege innerhalb der Gnetophyten (Hickey und Taylor, 1996).

Anthophyten-Hypothese



auf molekularen Daten basierende Hypothese (Winter et al. 1999, PNAS)

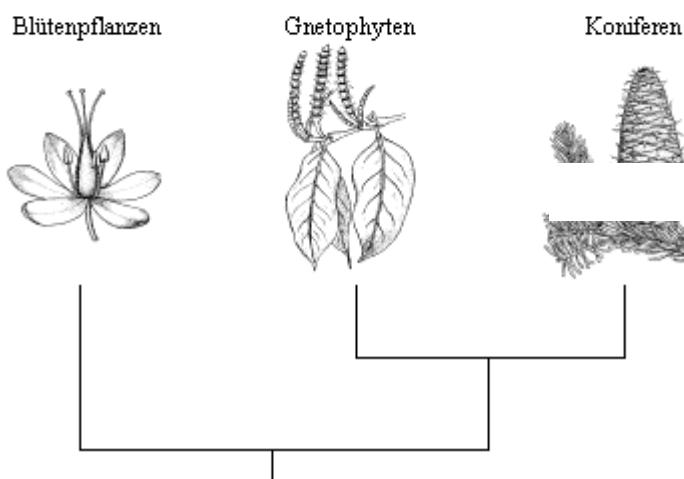


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anthophyten-Hypothese und der auf molekularen Daten basierenden Hypothese der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Gnetales, Angiospermen und Gymnospermen (nach Winter et al., 1999)

Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den verbleibenden drei Gymnospermen-Gruppen der Koniferen, Ginkgo und Cycadaceae erschienen unterschiedlich je nach verwendetem morphologischen Merkmal oder einbezogenem Fossilfund (Crane, 1985; Doyle und Donoghue, 1989; Loconte und Stevenson, 1990; Rothwell und Serbert, 1994, Crane et al., 1995; Doyle, J.A. 1996; Hickey und Taylor, 1996; Doyle, J.A., 1998a; Doyle J.A., 1998b).

Die sich durchsetzende Erkenntnis ist jedoch die basale Stellung der Cycadaceae innerhalb der Gymnospermen (Chaw et al., 2000).

Phylogenierekonstruktionen mit molekularen Datensätzen ergaben ebenfalls zunächst keine eindeutigen Ergebnisse. Einige Studien plazierten die Gnetales als Schwestergruppe der Angiospermen (Hamby et al., 1992; Malek et al., 1996; Stefanovic et al., 1998) und einige an die Wurzel der gesamten Samenpflanzen (Albert et al., 1994). Wieder andere ordnen die Gnetales, in Gegensatz zur Anthophyten-Theorie, als Schwestergruppe der Koniferen ein (Hasebe et al., 1992; Barnabas et al., 1995; Fischer et al., 1996; Chaw et al., 1997, Shutov et al., 1998).

Erst in den letzten Jahren zeigten verbesserte molekulare Datensätze mit größerer Unterstützung ihrer Ergebnisse, daß die Schwestergruppe der Angiospermen alle anderen rezenten Samenpflanzen gemeinsam sind und daß Koniferen die nächsten Verwandten der Gnetales sind. Winter et al. (1999) konnten zeigen, daß Gnetales-Gene aus vier verschiedenen Subfamilien der MADS-Box-Genfamilie ähnlicher zu Koniferengenen als zu Angiospermengenen sind. Auch Datensätze mit den verschiedenen Phytochrom-Sequenzen deuten stark auf diese Verwandtschaftsbeziehung hin (Donoghue und Mathews, 1998; Schneider-Poetsch et al., 1998). Die langsam evolvierenden mitochondrialen Gene *coxI* und *atpA* in Kombination mit nucleären 18SrDNA und plastidären *rbcL* Sequenzen ergaben eine enge Verbindung von Pinaceae und Gnetales (Bowe et al., 2000). Eine andere Studie, die plastidäre *rbcL* mit nucleärer rDNA und mitochondrialer rDNA kombinierte ergab ebenfalls, daß die Pinaceae die Schwestergruppe der Gnetales sind und alle Gymnospermen monophyletisch ursprungs sind (Chaw et al., 2000).

Qiu et al. (1999) berechneten eine Phylogenierekonstruktion der Angiospermen, wobei Gymnospermen als Außengruppe mit Sequenzen von 5 Genen (*atpI*, *matR*, *atpB*, *rbcL* und 18SrDNA) aus allen drei Genomen der Pflanzenzelle verwendet wurden. Im Zuge dieser Untersuchung stellte sich einmal mehr heraus, daß die Gnetales eine Schwestergruppe der Pinaceae und die Gymnospermen in ihrer Gesamtheit eine Schwestergruppe der Angiospermen sind.

Da nach neueren Erkenntnissen die Angiospermen nicht näher mit den Gnetales als mit den anderen Gymnospermen verwandt sind, läßt sich auch die Angiospermenblüte nicht von den zapfenähnlichen Strukturen der Gnetales ableiten. Wettstein kommentierte schon vor knapp einhundert Jahren diese Tatsache, obwohl die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Samenpflanzen damals noch unklar war:

„Eine in neuerer Zeit viel diskutierte Frage ist die nach der Herkunft der Angiospermenblüte. Unmittelbar lässt sich diese von den Blüten der höheren Gymnospermen nicht ableiten; solange diese Ableitung nicht sichersteht, ist sogar die Kluft, welche die Angiospermen von den Gymnospermen trennt, größer als die Kluft zwischen Pteridophyten und Gymnospermen [...].“ (von Wettstein, 1914, p. 447)

1.6 Gnetales als Modellgymnospermen

Die in dieser Arbeit untersuchte Gymnosperme *Gnetum gnemon* gehört zur Ordnung der Gnetales. Im Jahr 1863 sandte der österreichische Naturforscher Frederic Welwitsch dem damaligen zweiten Direktor des *Royal Botanical Garden*, Kew, England, J. Hooker, ein *Welwitschia mirabilis*-Spezimen. Trotz großer morphologischer Unterschiede zwischen *Gnetum*, *Ephedra* und *Welwitschia* erkannte Hooker die Zugehörigkeit dieser 3 Gattungen zur gleichen Ordnung. *Welwitschia* betrachtete Hooker damals jedoch fälschlicherweise noch als Übergangsform zwischen Angiospermen und Gymnospermen (Friedmann, 1996). Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts publizierten Arber und Parkin (1907 und 1908) dann Argumente für die Monophylie der Gnetales und begründeten, wie im vorigen Kapitel erläutert, die mittlerweile widerlegte Anthophytenhypothese, nach der innerhalb der Gymnospermen die Gnetales die nächsten Verwandten der Angiospermen sind.

Die Gnetales umfassen drei zunächst sehr unterschiedlich erscheinende Gattungen, die jedoch einige wichtige Merkmale teilen:

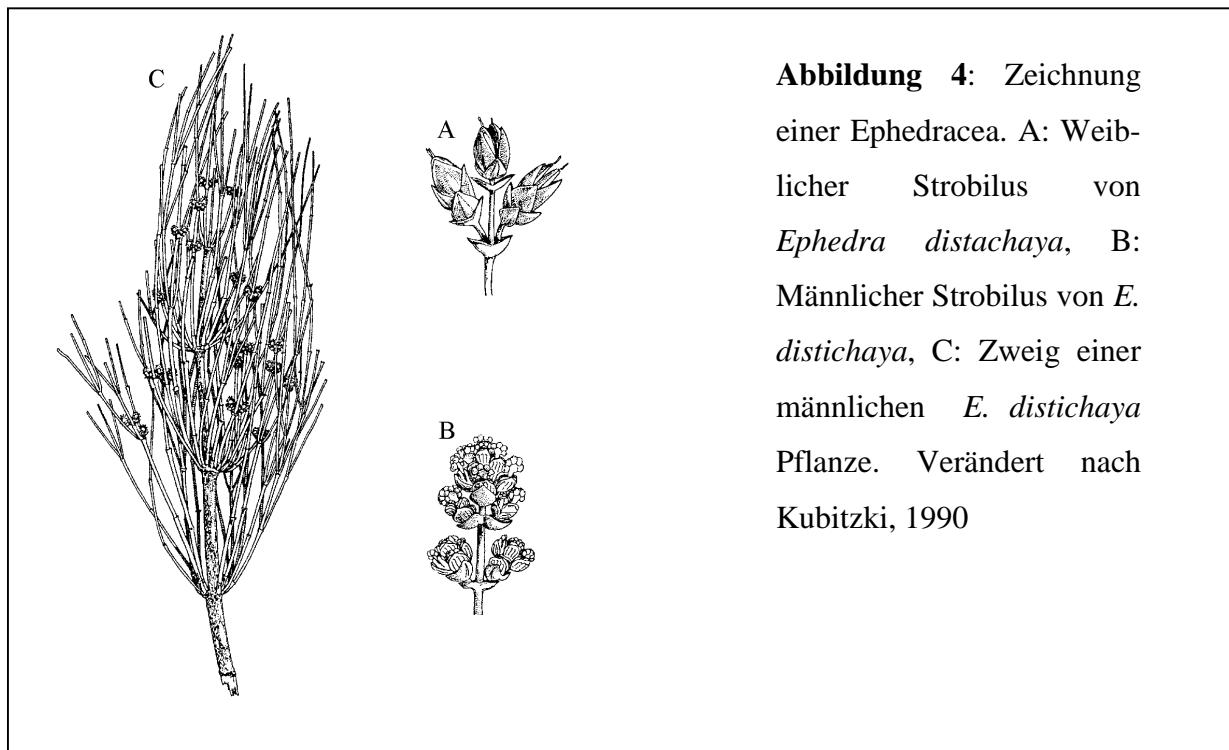
- (1) Die Reproduktionsorgane dieser Gymnospermen sind in zusammengesetzten Strobili arrangiert.
- (2) Sie besitzen Hüllstrukturen um Ovula und Antherophoren.
- (3) Diese Hüllstrukturen bilden um das Ovulum eine spitze Micropyle, die einen Pollinierungstropfen bildet.
- (4) Alle Gnetales entwickeln Leitbündel im sekundären Xylem.

Die in einigen Arbeiten entdeckten phytochemischen Gemeinsamkeiten zwischen Gnetales und Angiospermen stellen sich als Konvergenzen heraus, da Gnetales ebenso wie Angiospermen Kontakt zu Tieren als Pollinierer und Samenverbreiter haben (Kubitzki, 1990).

Gnetum, *Ephedra* und möglicherweise auch *Welwitschia* führen, im Gegensatz zu allen anderen Gymnospermen, eine besondere Art der doppelten Befruchtung durch. Die doppelte Befruchtung im eigentlichen Sinne ist eine Autapomorphie der Angiospermen, deren Endprodukt ein diploider Embryo umhüllt von einem triploiden Endosperm ist. *Gnetum* und *Ephedra* entwickeln nach der doppelten Befruchtung aber einen zweiten diploiden Embryo, der sich ontogenetisch und strukturell wie ein normal entwickelter Embryo verhält. Dieser zweite Embryo entstammt, im Gegensatz zu dem Angiospermen-Endosperm, vom Schwester-Nucleus der Eizelle. In anderen Koniferen entstehen nach der Befruchtung auch 2 diploide Embryonen, allerdings wurden diese vorher von Spermienzellen befruchtet, die aus verschiedenen Pollenschläuchen entlassen wurden, somit findet bei Koniferen keine doppelte Befruchtung statt (Friedmann und Carmichael, 1996).

Die Gattung *Ephedra* umfaßt ca. 50, meist buschähnliche Arten, die in den semiariden bis ariden Gebieten Asiens, Europas und Nord- und Südamerika vorkommen. Die Blätter der Ephedraceae sind schuppen- oder nadelförmig, und der Großteil der Photosynthese findet in den jungen Trieben statt. Die kleinen und ovulaten Zapfen produzieren meist Beeren-ähnliche Samen, die von Vögeln verbreitet werden. Nur wenige Arten werden durch Wind verbreitet und bilden dementsprechend geflügelte Samen aus (Price, 1996).

Ephedra wurde schon seit der Antike in China als Heilpflanze zum Senken von Fieber, gegen



Husten, gegen Kreislauf-Schwäche und als Stimulanz verwendet. In europäischen Medizinbüchern taucht es zuerst im Kräuterbuch des Lonicerus aus dem Jahr 1557 auf. Nur einige Arten, wie z.B. *Ephedra helvetica*, *E. sinica* und *E. major* enthalten die Phenylalanin-Derivate Ephedrin und Ephedradin, denen die heilende Wirkung der Pflanzen zugeschrieben wird (Kubitzki, 1990).

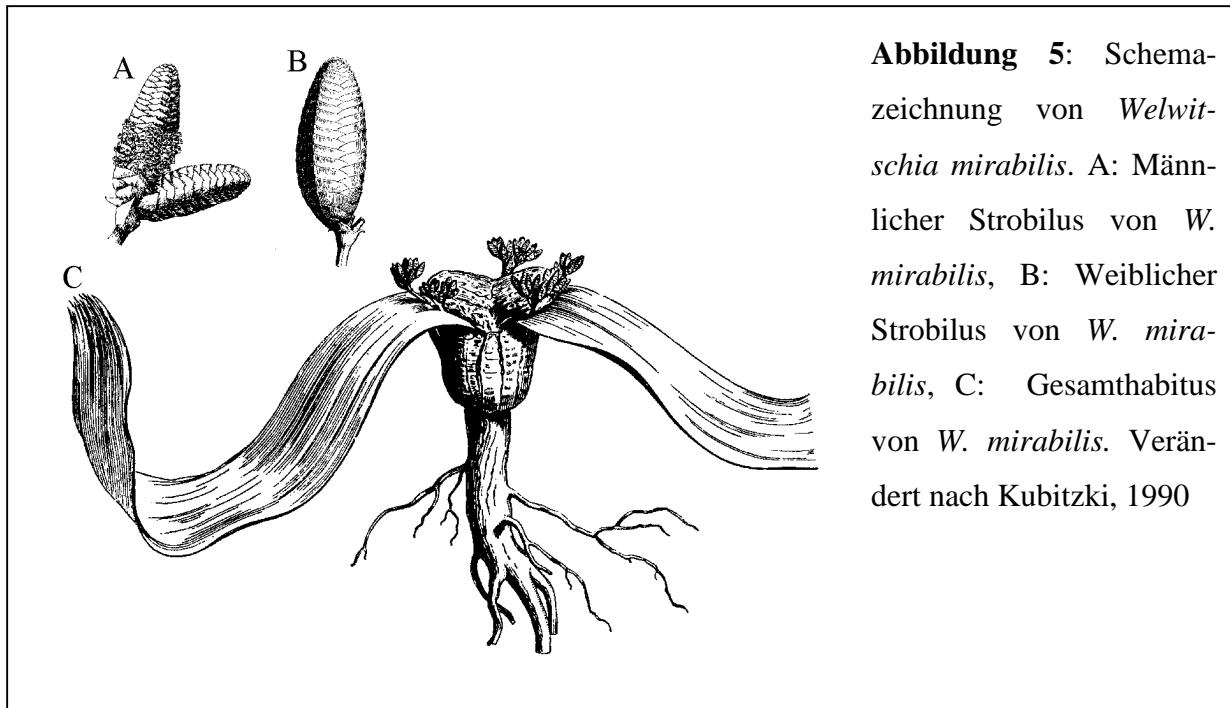


Abbildung 5: Schema-zeichnung von *Welwitschia mirabilis*. A: Männlicher Strobilus von *W. mirabilis*, B: Weiblicher Strobilus von *W. mirabilis*, C: Gesamthabitus von *W. mirabilis*. Verändert nach Kubitzki, 1990

Welwitschia mirabilis, der einzige Vertreter der Gattung *Welwitschia*, ist eine sehr langlebige Rosettenpflanze mit nur zwei bandförmigen, ledrigen Blättern, die bis zu 6 m lang werden können und auf einem sehr kurzen Stamm sitzen. Die ca. 100 Samen eines Zapfens bilden verbreiterte Tragschuppen als flügelähnliche Strukturen aus und werden durch Wind verbreitet. Die Pflanze ist in der Namib-Wüste endemisch und kommt in den küstennahen Regionen von Namibia und Angola vor (Price, 1996). *Welwitschia* war ein charakteristisches Element der ursprünglichen Wüstenflora der alten Welt, deren Ursprünge im zentralen Gondwana im Jura oder in der Kreidezeit liegen. Heute ist der Bestand von *Welwitschia mirabilis* stark gefährdet, da sie zum einen zu intensiv gesammelt wurde und zum anderen als Brennholz Verwendung fand (Kubitzki, 1990).

Die polytypische Gattung *Gnetum* umfaßt ca. 39 Arten, die, mit Ausnahme von 2 baumförmigen Arten, darunter die hier untersuchte Art *Gnetum gnemon*, Lianen sind. *Gnetum* ist im Amazonasbecken, im tropischen West-Afrika, in Indien, China, Indochina, Malaysia, auf den Philippinen, Neu Guinea und den Fidschi-Inseln verbreitet. Die Blätter der *Gnetum*-

Arten sind kreuzgegenständig angeordnet und bilden Blattvenen aus (Price, 1996). Als Besonderheit unter den Gymnospermen gilt die Tatsache, daß *Gnetum* am Sproßapex einen gut definierten Korpus hat, der von einer Tunica umgeben wird, die sich nur antiklinal teilt.



Die mittlere Hüllstruktur verholzt, die äußere Hülle der Samen wird fleischig und fruchtähnlich und dient, wie bei *Ephedra*, zur Verbreitung. Die korkigen Früchte einiger Arten werden schwimmend verbreitet, die Früchte der im Amazonas-Regenwald vorkommenden Art *Gnetum venosum* werden von Fischen gefressen und verbreitet (Price 1996). Die Früchte enthalten reichlich nahrhaftes Endosperm und werden von den Einheimischen in vielen Teilen der Tropen gekocht oder geröstet gegessen. In Asien werden die Fasern der Lianen zur Seilherstellung verwendet (Kubitzki, 1990).

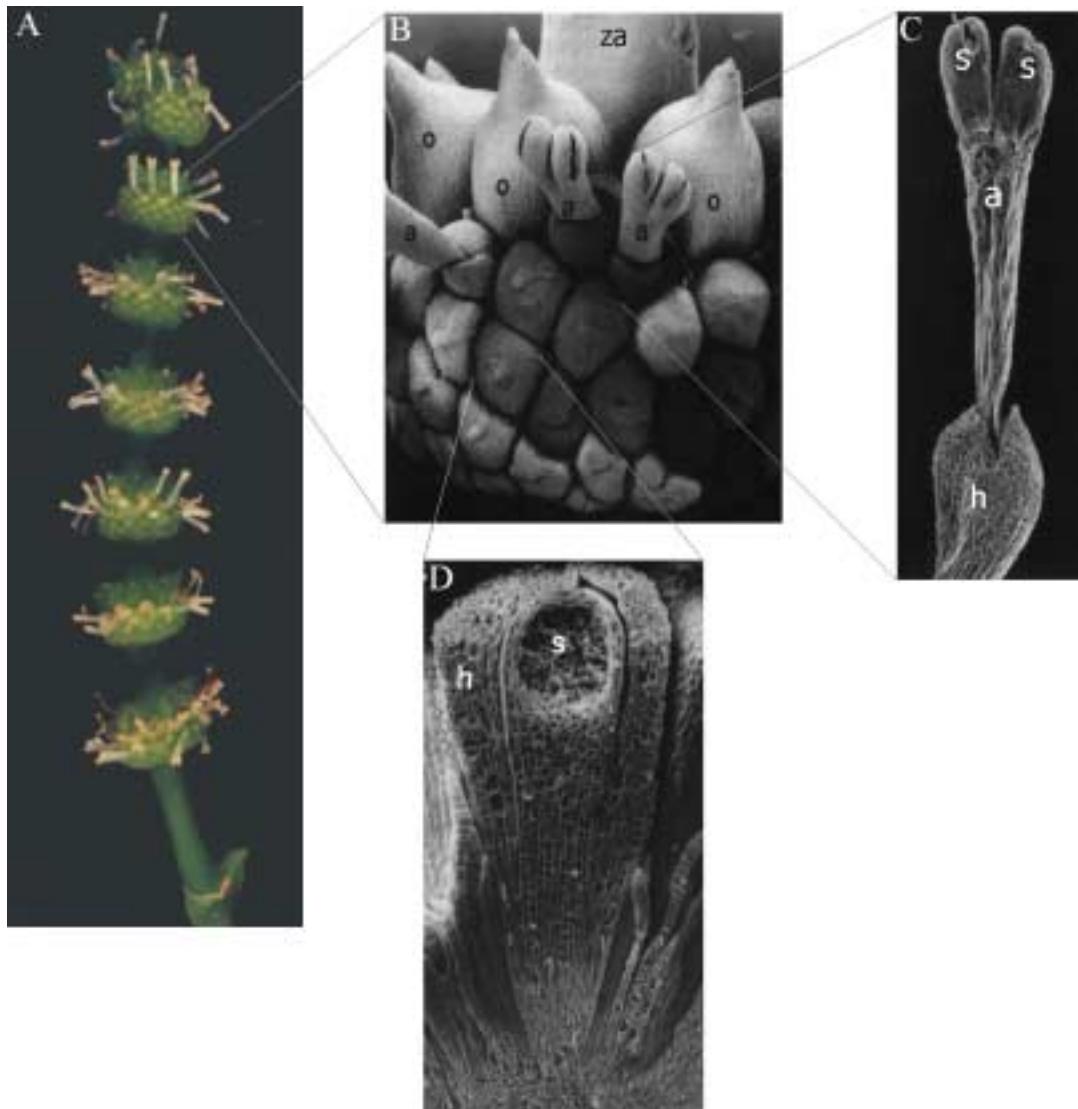


Abbildung 7: Männliche Reproduktionsorgane von *Gnetum gnemon*. A: männlicher Strobilus, B: männliche und ovulare Zapfen eines Nodus; einige Antherophoren sind aus dem Hüllstrukturen herausgewachsen, C männliche Reproduktionseinheit mit ausgewachsener Antherophore, D medianer Längsschnitt durch einen männliche Reproduktionseinheit in einem früheren Entwicklungsstadium. Abkürzungen: a, Antherophore; h, Hüllstruktur; o, Ovulum; s, Mikrosorangium; za, Zentrale Achse des Strobilus. Verändert nach Hufford (1996). Die Reproduktionseinheiten sind wirtelförmig angeordnet und die weiblichen enthalten mehrere Ovula. Integriert in die männlichen Strobili findet man in fast allen Arten sterile Ovula, die auch in einigen Fällen, wie bei z.B. *Gnetum gnemon*, fertig sein können (Kubitzki, 1990).

Gnetum gnemon und *Gnetum ula* haben die Chromosomenzahl $2n = 44$, jedoch ist trotz der recht hohen Chromosomenzahl die nukleäre Genomgröße mit einem 2C-Wert von ca. 4,5 pg DNA klein, was ca. $4,1 \times 10^9$ Basenpaaren des diploiden Genoms entspricht (Price, 1996).

Die Anzahl der Fossilien, die eindeutig den Gnetales zugerechnet werden können, ist gering, da diese Pflanzengruppe nur sehr schwer von dikotylen Pflanzen zu unterscheiden ist, und darüber hinaus die Gattung *Ephedra* reduzierte Blätter aufweist. Nur zwei Merkmale werden in der Paläobotanik als Gnetales-spezifisch diskutiert: Gerippte (ephedroide) Pollen und die Venation der Blätter von *Gnetum* und *Welwitschia*, bei der Xylembündel und Blattadern miteinander verwachsen (Anastomose). Die ersten fossilen Pollen von Gnetales stammen aus dem frühen Trias (vor 220 bis 180 Millionen Jahren) der nördlichen Hemisphäre und wurden während des Jura (vor 180 bis 135 Millionen Jahren) häufiger. Erste Makrofossilien tauchen vereinzelt im späten Trias auf (*Masculostrobus clathratus* und *Piroconites knesperti*) (Crane, 1996).

1.7 MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon*

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die von Kai-Uwe Winter klonierten MADS-Box-Gene *GGM1*-*GGM9* aus *Gnetum gnemon* vor (siehe auch Diplomarbeit von Kai-Uwe Winter und Winter et al., 1999). Diese Gene fallen in drei Klassen:

- (1) MADS-Box-Gene, die zusammen mit Angiospermen-Genen in sehr gut charakterisierte Subfamilien fallen.
- (2) MADS-Box-Gene, die zu Subfamilien gehören, in denen es (noch) keinen Angiospermen-Vertreter gibt.
- (3) MADS-Box-Gene, die zusammen mit Angiospermen-Genen Subfamilien bilden, über die nur wenig bekannt ist.

Der ersten Kategorie gehört *GGM2* an, das putativ ortholog zu den B-Funktionsgenen der Angiospermen, wie z.B. *DEF* und *GLO* aus *A. majus* oder *AP3* und *PI* aus *A. thaliana*. Die starke Affinität dieses Gens zu den Angiospermen-B-Funktionsgenen in Phylogenierekonstruktionen wird auch durch die ausschließlich in männlichen Reproduktionsorganen stattfindende Expression unterstützt (Winter et al., 1999). Auch die

Gymnospermen-MADS-Box-Gene *DAL11* und *DAL12* aus *Picea abies* (Sundström et al., 1999) fallen in die Subfamilie der B-Funktionsgene. In Angiospermen fixieren B-Funktionsgene während der Blütenentwicklung die Organidentität von Petalen und Stamina (siehe Kapitel 1.1).

Ein weiteres MADS-Box-Gen aus *Gnetum gnemon*, das zusammen mit Angiospermen-Genen in eine gut charakterisierte Subfamilie fällt, ist *GGM3*. Es zeigt in Phylogenierekonstruktionen zusammen mit *DAL2* aus *Picea abies* (Tandre et al., 1995; Tandre et al., 1998) eine deutliche Zugehörigkeit zur Subfamilie der AG-ähnlichen Gene aus Angiospermen (siehe Kapitel 1.3), wie z. B. *AG* aus *A. thaliana* oder *PLE* aus *A. majus*, die an der Zuweisung von Organidentitäten der Karpellen und Stamina beteiligt sind. Wie auch die anderen Mitglieder der AG-Subfamilie, wird *GGM3* nur in Reproduktionsorganen exprimiert (Winter et al., 1999)

Zu der zweiten Gruppe von MADS-Box Genen aus *G. gnemon*, die nicht mit Angiospermen-Genen in eine Subfamilie fallen, gehören *GGM4*, *GGM5*, *GGM6*, *GGM7* und *GGM8*. Sie werden hauptsächlich in den Reproduktionseinheiten exprimiert und über ihre Funktion ist nur sehr wenig bekannt (Winter, 1997; Winter et al., 1999).

Mitglieder der dritten Gruppe umfassen MADS-Box-Gene aus *G. gnemon*, die mit MADS-Box-Genen aus Angiospermen in Subfamilien fallen, über deren Funktion nur sehr wenig bekannt ist. *GGM1* fällt wie auch *DAL3* aus *Picea abies* (Tandre et al., 1995) in die Subfamilie der *TM3*-ähnlichen Gene (Pnueli et al., 1991) und ist, wie seine Angiospermen-Orthologen, gleichmäßig in der Pflanze exprimiert. *GGM9* liegt nach Phylogenierekonstruktionen in der Gruppe der *AGL6*-ähnlichen Gene (Theißen et al., 2000) wie z.B. auch die Gymnospermen-Gene *PRMADS2* und *PRMADS3* aus *Pinus radiata* (Mouradov et al., 1998; Mouradov et al., 1999) und *DAL1* aus *Picea abies* (Tandre et al., 1995). Alle weisen eine auf die Reproduktionseinheiten beschränkte Expression auf (Winter et al., 1999).

In dieser Arbeit sollten zusätzliche MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon* isoliert werden und durch Phylogenierekonstruktionen in die oben erwähnten drei verschiedenen Klassen gruppiert werden. Weiter untersucht wurden dann hauptsächlich die Gene aus der letzteren Gruppe, die zusammen mit Angiospermen-MADS-Box-Genen in bislang wenig bekannte oder neue Subfamilien fallen. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf *GGM13*, das zusammen mit *ZMM17* aus *Zea mays* (persönliche Mitteilung S. Werth, T. Münster, G. Theißen) eine neue Subfamilie bildet und *GGM12*, das in die Subfamilie der *STMADS11*-ähnlichen Gene (Carmona et al., 1998) fällt.

1.8 Ziele der Arbeit

Wie Angiospermen aus gymnospermen Vorfahren im Laufe der Evolution entstanden, ist ein seit über einem Jahrhundert in der wissenschaftlichen Diskussion stehendes, bisher aber ungeklärtes Rätsel. Fehlende Fossilien aus der Anfangszeit der Angiospermen-Evolution und der großen morphologische Unterschied zwischen Angiospermen und deren Schwestergruppe, den Gymnospermen, erschweren die Lösung dieser Fragestellung mit Hilfe klassischer botanischer Methoden.

MADS-Box-Transkriptionsfaktoren nehmen eine wichtige Stellung innerhalb von regulatorischen Netzwerken ein, die vielfältige Bereiche der pflanzlichen Entwicklung steuern. In dieser Arbeit sollten MADS-Box-Gene aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* isoliert, analysiert und mit putativen orthologen Genen aus Angiospermen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* und *Antirrhinum majus* verglichen werden. Durch das Arabidopsis-Genom-Sequenzierungs-Projekt stehen zunehmend Sequenzen von MADS-Box-Genen aus *A. thaliana* in den Sequenz-Datenbanken für komitative Studien zur Verfügung. Experimente wie vergleichende Expressionsstudien zwischen MADS-Box-Genen aus *Gnetum gnemon* und solchen aus Angiospermen sollten darüber Auskunft geben, ob sich Sequenzähnlichkeit von orthologen Genen auch in Ähnlichkeiten der räumlichen und zeitlichen Expression der Gene widerspiegelt. Dabei stand immer die Frage nach der Konservierung der Genfunktion zwischen Gymnospermen- und Angiospermen-MADS-Box-Genen im Vordergrund. Bisher sind erst wenige MADS-Box-Gene aus Gymnospermen beschrieben worden, und deren Funktion ist weitgehend ungeklärt geblieben.

In dieser Arbeit sollte versucht werden, auch die Frage nach der Komplexität der MADS-Box-Genfamilie in Gymnospermen zu beantworten, indem zusätzlich zu den schon klonierten MADS-Box-Genen (Kai-Uwe Winter, 1997) noch mehr MADS-Box-Gene isoliert und analysiert werden sollten. Nach ausführlichen Phylogenierekonstruktionen wurden die isolierten Gene in folgende drei Kategorien aufgeteilt:

- (1) MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon*, die gemeinsam mit sehr gut charakterisierten Angiospermen-Genen in eine Subfamilie fallen,
- (2) Gene, über deren putative Angiospermen-Orthologe nur sehr wenig bekannt ist

- (3) MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon*, zu denen (noch) keine orthologen Gene aus Angiospermen isoliert wurden

MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon*, die in die zweite Gruppe fielen, wie z. B. *GGM12* aus der *STMADS11*-Subfamilie oder *GGM13* und das dazu orthologe Gen aus *Zea mays*, *ZMM17*, wurden in dieser Arbeit genauer untersucht. Das Schwerpunkt der weitergehenden Charakterisierungen wurde auf vergleichende detaillierte Expressionsstudien gelegt, die einen Hinweis auf die Konservierung der Genfunktionen geben sollten. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollte auch dazu verwendet werden, die Ausstattung an MADS-Box-Genen des letzten gemeinsamen Vorfahren von Gymnospermen und Angiospermen vor ca. 300 Millionen Jahren zu rekonstruieren.

2. Materialien und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde Material von *Gnetum gnemon* der Botanischen Gärten Bochum und Karlsruhe verwendet.

2.2 Chemikalien, Enzyme, Primer und Radioisotope

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BIOMOL (Hamburg), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Faust (Köln), Fluka (Schweiz), Gibco-BRL (Neu-Isenburg), Merck (Darmstadt), National Diagnostics (Großbritannien), Promega (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Riedel de Häen (Hannover), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Seakem (USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen und hatten in der Regel den Reinheitsgrad p. A.

Die eingesetzten Enzyme stammen von den Firmen New England Biolabs (USA), Stratagene (Heidelberg), Promega (Heidelberg), Gibco-BRL (Neu-Isenburg) und Roche (Mannheim). Alle enzymatischen Reaktionen wurden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und Gibco-BRL (Neu-Isenburg) bezogen.

Radioisotope wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Braunschweig) und Hartmann Analytics (Braunschweig) geliefert. Die spezifische Aktivität des $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP betrug \sim 3000 Ci/mmol.

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach den in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen hergestellt.

2.4 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmidvektoren

Bakterienstämme

Name	Verwendung	Anbieter/Referenz
<i>Escherichia coli</i> JM109	Plasmidtransformation	Promega (Heidelberg)/ Yanisch-Perron et al., 1985
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	Abteilung Schell, MPI/ Van Larebeke et al., 1974
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF	Wirtszellen für Uni-ZAP XR	Stratagene (Heidelberg)/ Bullock et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> SOLR	Wirtszelle für Phagmid	Stratagene (Heidelberg) Hay und Short, 1992

Plasmidvektoren:

Name	Verwendung	Anbieter/Referenz
pGem-T	Klonierung von PCR-Produkten	Promega (Heidelberg)/ Summerton et al., 1983
pBluescript SK (+/-)	Klonierung von PCR-Produkten	Stratagene (Heidelberg)/ Alting-Mees und Short, 1989

Phagmide:

Name	Verwendung	Anbieter/Referenz
Uni-ZAP XR	Klonierung und <i>in vivo</i> Exzision von cDNA	Stratagene (Heidelberg)/ Short et al., 1988

2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* – Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse (verändert nach Birnboim, 1979) durchgeführt. Plasmid-DNA, die in einen höheren Reinheitsgrad vorliegen sollte, wurde nach der Lyse entweder phenolisiert, mit dem „QIAprepSpin Plasmid Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) oder dem „Plasmid Mini-Kit“ (Roche, Mannheim) weiter aufgereinigt.

2.6 Aufreinigen von PCR-Produkten und Gelelution

PCR-Produkte, die zur weiteren Verarbeitung einen hohen Reinheitsgrad aufweisen mußten, wurden mit einem der folgenden Produkte aufgereinigt: „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche), „PCR Purification Kit“ (Qiagen) oder „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen). Die Aufreinigungen erfolgten nach den Protokollen der Hersteller.

2.7 Isolierung von Gesamt-RNA und PolyA⁺-RNA

Gesamt-RNA aus *Gnetum gnemon* und *Zea mays* wurde mit dem „BIOMOL Total RNA Reagent“ der Firma BIOMOL (Hamburg) isoliert. Aus 0,5 g bis 2,0 g Pflanzengewebe wurde nach Angaben des Herstellers RNA isoliert und entweder in DEPC-behandeltem H₂O oder in deionisiertem, reinen Formamid aufgenommen.

PolyA⁺-RNA wurde aus Gesamt-RNA der verschiedenen mittels Oligo (dT)25-Dynabeads (Dynal, Hamburg) nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.8 Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosemembranen

2.8.1 DNA-Geltransfer

Jeweils 10 µg DNA wurden nach Herstellerangaben mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Der Transfer auf Hybond N⁺-Nitrozellulosemembran der Firma Amersham (Braunschweig) wurde nach Herstellerangaben oder nach den in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

2.8.2 RNA-Geltransfer

Je 10 µg Gesamt-RNA wurden im denaturierenden Agarosegel (7 % (v/v) Formaldehyd, 1,5 % (w/v) Agarose, nach Sambrook et al. 1989) aufgetrennt und anschließend auf PALL-Biodyne-Transfermembran (PALL, Großbritannien) transferiert. Dabei wurden die vom Hersteller empfohlenen Protokolle mit geringen Veränderungen befolgt. Das denaturierende Gel wurde dreimal für 2 min in H₂O gewaschen, dann 40 min in 50 mM NaOH, 10 mM NaCl, danach 25 min in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 und abschließend 20 min in 10 x SSC inkubiert, bevor der Kapillartransfer auf die Membran stattfand.

2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktiv markierte Sonden zum Hybridisieren von *Northern*- und *Southern*transfers wurden nach zwei verschiedenen Protokollen hergestellt. Bei der linearen PCR mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP nach Fischer et al. (1995) wurde die Sonde vom wenig konservierten 3'-Ende der MADS-Box-Gene synthetisiert, um genspezifische Sonden zu erhalten. Für die *random-priming*-Methode wurden 50 µg PCR-Fragment der cDNA eingesetzt, mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl eingestellt und 10 min bei 96 °C denaturiert. Dazu werden 3 µl Oligo Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,2; 100 mM MgSO₄, 1 mM DTT), 2 µl BSA (2 mg/ml), 2 µl (2 U/µl) Klenow-Fragment (Promega, Heidelberg) und 5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert. Nach beiden

Markierungsprotokollen wurde die radioaktive Sonde mit dem „High Pure PCR Purification Kit“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.10 PCR-gestützte Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde in UNO- oder TRIO-Thermoblocks der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. *Taq*-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim), „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim), und *Pfu* Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) wurden dazu nach den Angaben der Hersteller verwendet. Das Reaktionsgemisch bestand aus 1-100 ng *template*-DNA, je 20 pMol Primer, 1 x PCR-Puffer (für *Taq*-Polymerase den PCR Puffer der Firma Roche, Expand High Fidelity PCR System Puffer Nr. 2 für das Polymerase-Gemisch aus dem „Expand High Fidelity PCR System“ und den zur *Pfu*-Turbo-Polymerase gehörenden Puffer der Firma Stratagene, Heidelberg), 100 µM dATP, 100µM dTTP, 100µM dGTP, 100 µM dCTP und 2,5 U der jeweiligen Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 - 50 µl.

2.10.1 3'RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die Isolierung der partiellen MADS-Box cDNAs von *GGM10-GGM19* erfolgte nach der 3'-RACE-Methode nach Frohman et al. (1988). Die Sequenzen von sämtlichen verwendeten Primern sind im Anhang N aufgeführt.

Reverse Transkription: 50 µg RNA frisch isolierte mRNA aus *Gnetum gnemon* wurde mit 25 pM Adapterprimer P019 oder AB05 versetzt, für 3 min auf 65 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Dazu wurden 4 µl 5 x *First Strand*-Puffer und 2 µl 0,1 M DTT gegeben (beides von Gibco-BRL, Neu-Isenburg). Das Gemisch wurde auf 42 °C angewärmt bevor 1 µl (200 U) Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco-BRL, Neu-Isenburg) hinzugefügt wurde. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden lang bei 42 °C und wurde durch Zugabe von TE-Puffer auf 500 µl abgestoppt.

Amplifikation der cDNAs: Mit Hilfe eines MADS-Box-spezifischen und des RACE-Adapter Primers (P018 bzw. AB07) wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min bei 94 °C (Denaturierung); 34 Zyklen mit je 30 sec Denaturieren bei 94 °C, *Annealing* bei 54 - 58°C für 30 sec und eine Minute Synthesezeit bei 72 °C. Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen wie oben beschrieben. Die amplifizierten cDNAs wurden aufgereinigt und in pGem-T (Promega, Heidelberg) kloniert.

2.10.2 5'RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die Isolierung der 5'-Enden von unvollständigen cDNAs wurde mit Hilfe des „3'/5' RACE Kit“ der Firma Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben vorgenommen. Die Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Anhang N dieser Arbeit.

2.10.3. RAGE-PCR (Rapid Amplification of Genomic Ends)

Anhand der Herstellerangaben des „Universal Genome Walker Kits“ (Clontech, Heidelberg) wurden genomische Fragmente in 5'-Richtung synthetisiert. Genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen (*HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI* oder *BamHI*) verdaut. Die durch den Restriktionsverdau entstandenen *sticky ends* der genomischen DNA wurden mit Klenow - Fragment aufgefüllt, bevor daran der RAGE-Adapter Primer (Sequenz siehe Anhang N) ligiert wurde.

Mit einem genspezifischen (GS1) und einem adapterprimerspezifischen Primer (AP1) wurde unter folgenden Bedingungen die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt: Nach einem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C wurde „High Fidelity Polymerase“ (Roche, Mannheim) zugegeben (*Hot Start*). Darauf folgten 7 Zyklen mit je 25 sec. Denaturieren bei 94 °C und 3 min Synthese bei 72 °C. Der anschließende Denaturierungsschritt wurde 32 Zyklen, die je 25 sec. lang bei 94 °C durchgeführt und danach wurde 3 min bei 67 °C synthetisiert. Abschließend wurden in siebenminütiger Synthese bei 67 °C die unvollständig synthetisierten Fragmente vervollständigt (*Touch Down PCR*). Daraufhin folgte ein zweite PCR, die ebenfalls mit einem *Hot Start* begann und mit einem genspezifischen (GS2) und einem

adapterprimerspezifischen Startermolekül (AP2) durchgeführt wurde. Danach schlossen sich 5 Zyklen mit 94 °C für 25 sec. und 72 °C für 3 min an. Die nächsten 20 Zyklen liefen mit 25 sec. bei 94 °C und 3 min bei 67 °C. Abschließend wurde in siebenminütiger Synthese bei 67 °C die PCR-Fragmente vervollständigt. Die entstandenen ca. 2 kB großen PCR-Produkte wurden in den pGem-T Vektor (Promega, Heidelberg) kloniert und sequenziert.

2.11 Isolierung der *GGM12* cDNA durch *screening* einer cDNA Bank

Zur Isolierung der Vollängen-cDNA von *GGM12* wurden mir von Kai-Uwe Winter aus unserer Arbeitsgruppe eine cDNA-Bank aus männlichen und weiblichen Zapfen von *Gnetum Gnemon* zur Verfügung gestellt. Von dieser cDNA-Bank wurden 3×10^5 Phagen ausplattiert. Diese wurden an Protran 85 Nylonfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) gebunden und mit einer durch lineare PCR (Fischer et al. 1995) hergestellten Sonde (siehe Kapitel 2.9) der partiellen cDNA von *GGM12* (Klon ab8-4) hybridisiert. Die auf den Filtern immobilisierte Phagen-DNA wurde über Nacht mit der *GGM12* Sonde bei 53 °C hybridisiert. Die Hybridisierungslösung bestand aus 5 x SSPE, 5 x Dehnhardts, 0,5 % SDS und 100 µg/ml DNA aus Heringssperma. Anschließend wurden die Filter zweimal für 15 min in 0,1 % SDS und 2 x SSC bei Raumtemperatur und dreimal für 20 min in 0,1 % SDS und 1 x SSC bei 53 °C gewaschen. Zum Vereinzen der Plaques wurden drei Runden mit jeweils sinkenden Phagenkonzentrationen durchgeführt. Der komplette offene Leserahmen von *GGM12* (Klon 12c7) lag in den *EcoRI/SallI*-Schnittstellen des Plasmidvektors pBluescript SK (+/-) vor. Er wurde mittels phagenspezifischer Primer amplifiziert und in den pGem-T Vektor (Promega, Heidelberg) umkloniert und sequenziert.

2. 12 *In-situ*-Hybridisierung

In-situ-Hybridisierungen wurden mit geringfügigen Veränderungen wie in Winter et al. 1999 beschrieben durchgeführt.

2.12.1 Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials

FAA	2 % (v/v) Formaldehyd
	5 % (v/v) Essigsäure
	60 % (v/v) Ethanol (p. a.)

Frisches Pflanzenmaterial von *Gnetum gnemon* wurde 48 Stunden in FAA bei Raumtemperatur unter ca. 30-minütigem Anlegen von Vakuum fixiert. Anschließend wurde das Gewebe zweimal in 70 % Ethanol (p. a.) auf Eis gewaschen und in 70 % Ethanol (p. a.) bei –20 °C aufbewahrt.

Zur Einbettung wurde das Pflanzengewebe dehydriert. Dazu wurde es für jeweils 90 min bei Raumtemperatur in 85 %, 95 % und zweimal 100 % Ethanol (p. a.) transferiert. Danach wurde das Gewebe über eine Ethanol (p. a.) / Histoclear-Reihe (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, und zweimal Histoclear, für jeweils 60 min bei Raumtemperatur) in Histoclear überführt. Zu dem mit Histoclear abgesättigten Gewebe wurde flüssiges Paraplast Plus (Sherwood, USA) gegeben und bei 62 °C inkubiert. In den folgenden 5 Tagen wurde das Paraplast je zweimal pro Tag ausgetauscht und abschließend auf Eis zum Verfestigen abgekühlt.

Von den eingebetteten Gewebestücken wurden mit Hilfe eines Microtoms (Leica) ca. 7 - 8 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die auf einer 40 °C warmen Wasseroberfläche ausgebreitet und auf beschichtete SuperFrost Plus Objektträger (Menzel–Gläser) überführt wurden.

Ein großer Teil der verwendeten eingebettete Fahnen und Kolben von *Zea mays* wurden mir freundlicherweise von Luzie U. Wingen zu Verfügung gestellt.

2.12.2 Herstellen von DIG-markierten RNA-Sonden

Die *in-vitro*-Transkription der in 150 – 200 bp große Fragmente subklonierten cDNAs wurde mit dem „DIG-RNA-labelling Kit“ der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt.

Transkriptionsreaktion	200 ng aufgereinigtes PCR-Produkt der subklonierten cDNA
	2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)
	3 µl DIG-NTP Gemisch (Roche)
	2 µl T7-, T3- oder SP6-RNA-Polymerase
	ad 20 µl H ₂ O

Die Sonde wurde 2 Stunden lang bei 37 °C synthetisiert. Danach wurden 2 µl DNaseI (10U/µl) zur Degradierung des eingesetzten PCR-„Templates“ und 2 µl 20 mg/ml tRNA (aus *Saccharomyces cerevisiae*) hinzugegeben und 15 min weiter bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA stoppte die Degradierungsreaktion. Zur Fällung der Sonde wurde diese mit 7 µl 3 M NaOAc (pH 6,0), 1 µl 20 mg/ml tRNA (aus Hefe), 1 µl 10 mg/ml Poly(A), 170 µl mit DEPC behandeltem H₂O und 210 µl Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die Sonde mit 80 % Ethanol gewaschen und in 100 µl deionisiertem Formamid aufgenommen.

DIG-markierte RNA Sonden des *KNOTTED* Gens und des *DEF*-ähnlichen Klons M078 aus *Zea mays* wurden mir von Luzie U. Wingen zur Verfügung gestellt. Die cDNA des *GAPDH*-Gens aus *Gnetum gnemon* wurde unserer Arbeitsgruppe von Prof. William Martin (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) überlassen.

2.12.3 Vorbehandlung des Gewebes zur *in-situ*-Hybridisierung

Sämtliche Lösungen wurden mit autoclaviertem Wasser angesetzt, um RNase-Verunreinigungen zu minimieren.

Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte dreimal 5 min in 100 % HistoClear (National Diagnostics, Großbritannien), einmal in 100 % HistoClear : Ethanol (technisch) (1:1) und zweimal in 100 % Ethanol (technisch) bei Raumtemperatur getaucht. Durch passieren einer Alkoholreihe, die mit 0,85 % NaCl angesetzt wurde (je 2 min in 95 % Ethanol, 85 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol, 30 % Ethanol, 0,85 % NaCl) wurde das Gewebe rehydriert. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation in 0,2 M HCl mit anschließendem zweimaligem Waschen für 10 sec in H₂O. Daraufhin wurden die Schnitte 20 min in 2 x SSPE bei 70 °C inkubiert.

Proteinase K Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	2 mM CaCl ₂

Der Proteinase K-Verdau wurde mit 1 µg/ml Proteinase K (Sigma, München) in Proteinase K Puffer bei 37 °C für 30 min durchgeführt. Danach wurde das Gewebe 5 min in 2 x SSPE bei Raumtemperatur gewaschen und durch eine zweiten Alkoholreihe dehydriert: 5 min in 0,85 % NaCl, 70 % Ethanol, 95 % Ethanol, 100 % Ethanol). Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet.

2.12.4 Hybridisierung

Die DIG-markierte Sonde wurde in der Regel in einer Konzentration von 100 ng Sonde pro 100 µl Hybridisierungslösung eingesetzt.

<i>In situ</i> -Hybridisierungslösung	50 % Formamid
	500 µg/ml tRNA (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	100 µg/ml Poly(A)
	300 mM NaCl
	2 x TE Puffer (pH 7,0)
	1 x Dehnhardt's Lösung
	10 % Dextranulfat

Zuerst wurde die DIG-markierte Sonde mit H₂O, tRNA und Poly(A) 2 min bei 80 °C denaturiert und erst dann zum restlichen Hybridisierungsgemisch gegeben. Je nach Anzahl und Größe der Gewebe pro Objektträger wurde die Hybridisierung mit 40 – 70 µl Hybridisierungslösung durchgeführt. Die die Schnitte bedeckende Hybridisierungslösung wurde mit einem Deckglas abgedeckt. Die Hybridisierung fand bei 50 °C über Nacht im Hybridisierungsofen (Hybaid, Heidelberg) statt.

2.12.5 Nachbehandlung

Die hybridisierten Gewebe wurden zweimal in 3 x SSPE 5 min bei Raumtemperatur und anschließend zweimal 30 min lang in 3 x SSPE bei 56 – 60 °C gewaschen.

NTE	1 mM EDTA
	500 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Das Gewebe wurde nun zweimal für 5 min bei Raumtemperatur in NTE equilibriert. Danach folgte ein RNase-Verdau mit 40 µg/ml RNase in NTE bei 37 °C für 30 min mit anschließendem zweimaligen Waschen in NTE bei Raumtemperatur. Danach erfolgten weitere SSPE-Waschgänge bei 56 – 60 °C für je 30 min: Einmal in 1,5 x SSPE und zweimal in 0,3 x SSPE.

Puffer I	100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM NaCl

Zur Antikörper-Detektion wurde das Gewebe zunächst in Puffer I für 5 min equilibriert. Danach wurde es in Puffer I mit 0,5 % „Blocking Reagent“ (Roche, Mannheim) für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend in Puffer I mit 1 % BSA (Sigma, München) und 0,1 % Tween-20 getaucht, um freie Antikörper-Bindestellen zu blockieren. Der Anti-Digoxygenin-Alkalische-Phosphatase Antikörper (Anti-DIG Fab) der Firma Roche (Mannheim) wurde in Puffer I in einer Verdünnung von 1:3000 auf die Objektträger gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden anschließend mit 0,1 % Tween-20 in Puffer I bei ständiger Bewegung durch viermaliges Waschen (10, 15 und zweimal 20 min) entfernt.

Färbe puffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5)
	100 mM NaCl
	50 mM Mg ₂ Cl

Die Gewebeschnitte wurden nun zweimal für 5 min in Färbe puffer equilibriert. Die Farbreaktion fand über Nacht in 10 % PVA (Polyvinylalkohol, Sigma, München) in Färbe puffer mit 2 µl/ml NBT (75 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumsalz in 70 % (v/v) Dimethylformamid, Sigma, München) und 1,5 µl/ml X-P (50 mg/ml 4-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid, Sigma, München; auch BZIP genannt) bei 30 °C statt.

Nach ausreichender Färbung des Gewebes wurden die Objektträger zweimal für 5 min gewässert, luftgetrocknet und mit Entellan (Sigma, München) versiegelt.

2.13 DNA-Sequenzierungen

Sämtliche Sequenzierungsarbeiten sind von der ADIS- (Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung/Zentrale Analytik) Einheit des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung mit Abi Prism 377 und 3700 Sequenziermaschinen (Applied Biosystems, Weiterstadt) und der BigDye-Terminations-Chemie (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt worden.

2.14 Computergestützte Analysen

Zur Bearbeitung von Sequenzen wurden die Programmpakete „MacVectorTM 6.5“ und „AssemblyLIGNTM 1.0.9“ benutzt, die unter dem Betriebssystem MacOS 8.0 liefen. Alle nachfolgenden Programmpakete wurde unter dem Betriebssystem Digital Unix V4.0F OSF1 benutzt. Multiple Alignments wurden mit den Programmen „Pileup“ (benutzt wurden die Parameter der Grundeinstellung: *gap creation penalty* = 8; *gap extension penalty* = 2) des „GCG“ Programmpaketes Version 10.0 (Genetics Computer Group, Oxford Molecular Group, Inc.) errechnet. Falls nicht anders angegeben, wurden Phylogenierekonstruktionen mit der „170er Domäne“ (Theißen et al., 1996; Winter et al., 1999) errechnet. Phylogenierekonstruktionen, die den „neighbor-joining“-Algorithmus (Saitu und Nei, 1987) benutzten, wurden mit dem „PhyliP“-Programmpaket (Felsenstein, 1993) ausgeführt. Dazu wurden die Programme „ProtDist“, „Seqboot“, „Neighbor“ und „PlotTree“ verwendet. Um *multiple sequence files* des „GCG“ Programmpakets in ein von „PhyliP“ lesbares Format umzuschreiben, wurde mir von Silke Fontein das „Python Script“ zur Verfügung gestellt. Sequenzrecherchen wurden an der NCBI-Datenbank mit Hilfe des Programmes „netblast“ des „GCG“ Programmpaketes, oder an der dbEST-Datenbank mit datenbankeigenen Suchmaschinen durchgeführt (URL: <http://ncbi.nih.gov/BLAST/>). Grafiken und Textdokumente wurden mit den Programmen Adobe Photoshop 3.0.5, CanvasTM 6.0, ClarisWorks 5.0 oder Corel Draw 8.0 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der cDNAs von *GGM10-GGM19*

Zur Isolierung von MADS-Box-cDNA-Klonen aus *Gnetum gnemon* wurden cDNA-pools aus männlichen und weiblichen Zapfen unreifen Samen als *template* und die in Anhang N beschriebenen Primer zur 3'-RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), (nach Frohmann et al., 1988; Münster et al., 1997; Winter et al., 1999) benutzt. Die MADS-Box-Gene wurden *GGM10-GGM19* genannt, nach *Gnetum gnemon* MADS10-19. *GGM1-GGM9* waren schon von Kai-Uwe Winter während seiner Diplomarbeit vor Beginn dieser Arbeit isoliert und teilweise charakterisiert worden. *GGM14-GGM19* wurden in Zusammenarbeit mit Britta Grosardt, der technischen Assistentin unseres Projektes isoliert und charakterisiert. *GGM11*, *GGM12* und *GGM15-GGM18* konnten aus männlichen Zapfen isoliert werden. *GGM10*, *GGM13* und *GGM14* wurden aus weiblichen Zapfen und *GGM19* wurde aus unreifen Samen isoliert. Um die wegen der Anwendung die 3'-RACE-Technik entstandenen fehlenden 5'-Enden der cDNAs zu isolieren, wurden 5'-RACE-Experimente durchgeführt. Das 5'-Ende der cDNA von *GGM13* wurde durch 5'-RACE-PCR mit RNA aus weiblichen Zapfen und das 5'-Ende der cDNAs von *GGM11* und *GGM15-GGM17* wurde durch 5'-RACE-PCR mit RNA aus männlichen Zapfen isoliert (Primer siehe Anhang N). Die komplette *GGM12*-cDNA wurde durch *screenen* einer cDNA Bibliothek von *Gnetum gnemon* isoliert, die von Kai-Uwe Winter aus Zapfen hergestellt worden war. Dabei bestand die Sonde aus der unvollständigen cDNA des durch 3'-RACE isolierten *GGM12*-Klons. Das Hybridisieren und Waschen der Filter wurde unter moderat stringenten Bedingungen durchgeführt. Die Sequenzen der cDNAs, soweit bekannt, sind in den Anhängen A (*GGM10*), B (*GGM11*), C (*GGM12*), D (*GGM13*), E (*GGM14*), F (*GGM15*), G (*GGM16*), H (*GGM17*), I (*GGM18*) und J (*GGM19*) dargestellt.

3.2. Phylogenetische Analysen von *GGM10-GGM19* und *ZMM17*

Sequenzvergleiche der von MADS-Box-Genen aus *Gnetum gnemon* codierten Proteine zeigen, daß sie die für Gefäßpflanzen typische MIKC-Domänenstruktur aufweisen (siehe Abbildung 8). Der hohe Grad an Konservierung innerhalb der pflanzlichen MADS-Box-

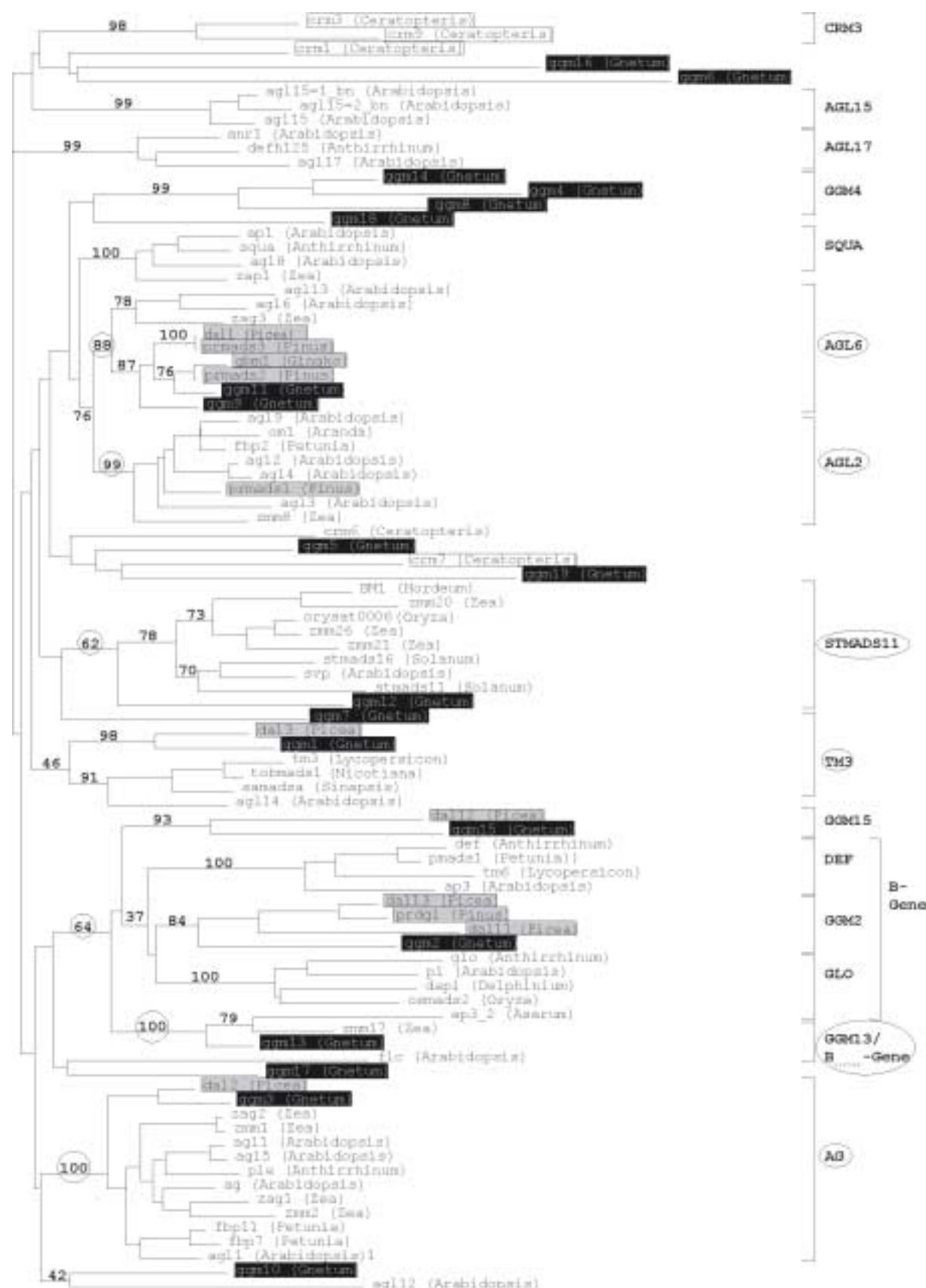


Abbildung 8: Phylogenetische Rekonstruktion, die die Verwandschaftsverhältnisse zwischen einer Teilmenge der pflanzlichen MADS-Box-Proteine zeigt. Die Genus-Namen der Arten, aus denen die Gene isoliert wurden, sind in Klammern hinter den Proteinnamen angegeben. MADS-Box-Proteine aus *Gnetum* sind in invertierten Kästen dargestellt, Proteine von anderen Gymnospermen in schattierten Boxen und Farnproteine in offenen Kästen. Proteinnamen, die nicht in einem Kasten erscheinen, repräsentieren Angiosperm-Sequenzen. *Bootstrap*-Angaben in Prozent sind neben einigen relevanten Verzweigungspunkten angegeben und zeigen die Unterstützung der Subfamilien (Theißen und Saedler, 1995; Theißen, Kim und Saedler, 1996; Münster et al., 1997; Winter et al., 1999; Becker et al., 2000) oder andere wichtige Knotenpunkte. Auf der rechten Seite sind die Subfamilien beschriftet, die die in den Klammern eingeschlossenen Sequenzen umfassen. Subfamilien, die Sequenzen von Angiospermen und Gymnospermen enthalten und deren *bootstrap-support* höher als 50 % liegt, werden von einem Kreis umschlossen.

Gene trifft auch für die aus *Gnetum gnemon* isolierten Gene zu, wie aus Abbildung 9 entnommen werden kann. Die Anwesenheit einer ausschließlich bei Pflanzen vorkommenden (Theißen et al., 1996; Theißen und Saedler 1995), mit hydrophoben Aminosäuren durchsetzten K-Domäne lässt die Vermutung zu, daß auch die *Gnetum*-MADS-Box-Gene über diese Domäne mit gleichen oder anderen Proteinen interagieren und so ein Signalnetzwerk bilden können. Andererseits sind I-Region und C-Terminus innerhalb der *Gnetum*-MADS-Box-Gene sehr unterschiedlich in Länge und Sequenz, was auf diverse Aufgaben in DNA-bindenden Dimeren und Tetrameren zur Transkriptionsaktivierung hinweist (Theißen et al., 1996; Shore und Sharrocks, 1995; Egea-Cortines et al., 1999).

Die hohe Ähnlichkeit der *Gnetum*-MADS-Box Gene zu allen anderen MIKC-Typ-Genen in Bezug auf Domänenstruktur und Sequenz, besonders in der MADS- und K-Domäne, deutet auf einen gemeinsamen Vorfahren aller MIKC-Typ MADS-Box-Gene hin, aus dem alle anderen während der Evolution durch Duplikation, Sequenzdiversifizierung und Fixierung entstanden.

Die mit dem *neighbor-joining*-Algorithmus errechnete Phylogenierekonstruktion der 170-er Domäne (Münster et al., 1997) in Abbildung 8 zeigt, daß *GGM10* mit der sehr geringen *bootstrap*-Unterstützung von 42 % mit *AGL12* aus *Arabidopsis thaliana* zusammenfällt. Da dieser Wert unter 50 % liegt, kann nicht von einer Subfamilienzugehörigkeit gesprochen werden (Becker et al., 2000). Allerdings ist diese schwache phylogenetische Beziehung der

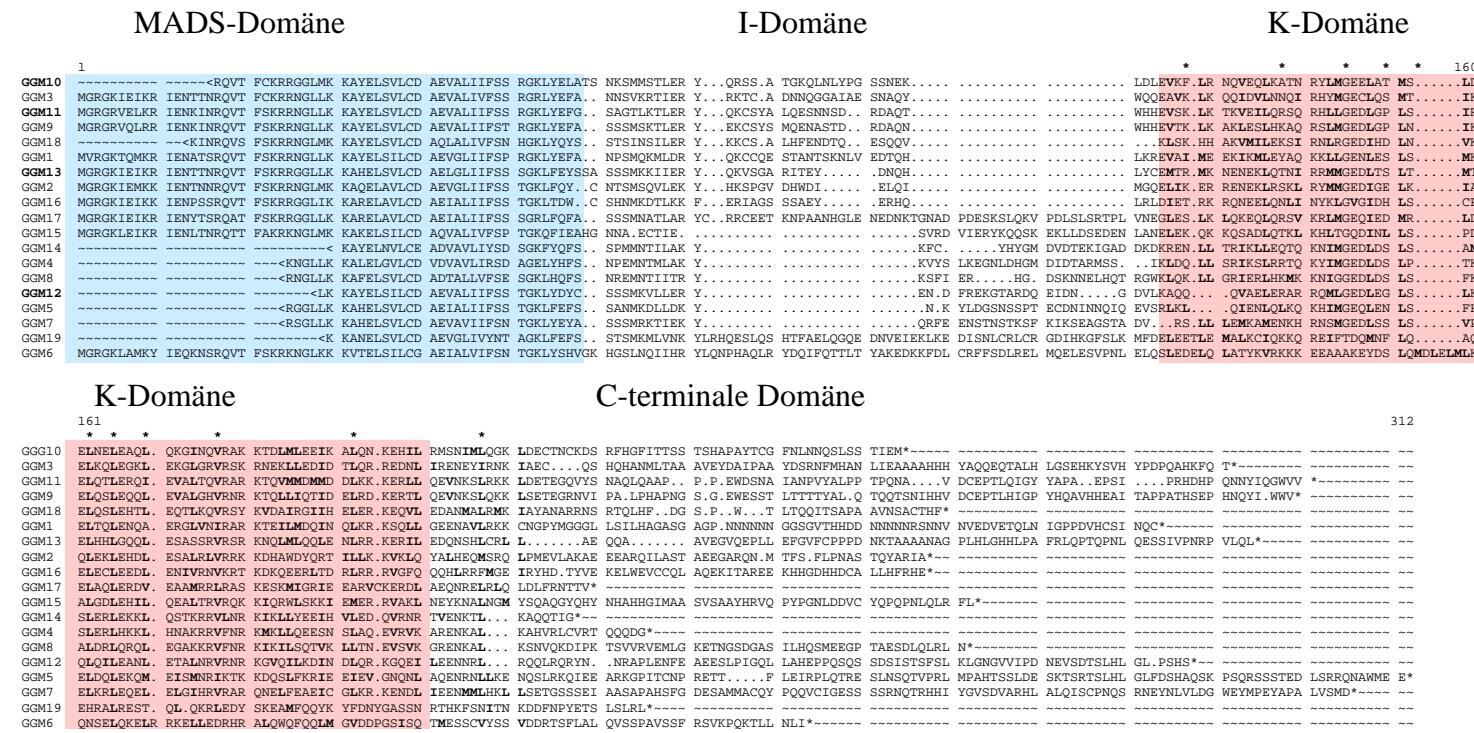


Abbildung 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Gnetum gnemon*-MADS-Box-Gene mit Hilfe des “GCG” Programmes “Pileup” unter Verwendung der Standard Parameter. Ein „<“ am Anfang einer Sequenz kennzeichnet deren Unvollständigkeit im 5‘ Bereich aufgrund der verwendete Isolierungsmethoden. Der „*“ am Ende jeder Peptidsequenz symbolisiert ein Stop-Codon. Die MADS-Domäne ist blau, die K-Domäne ist rot hinterlegt, die dazwischenliegende I-Domäne und endständige C-terminale Domäne sind beschriftet. Innerhalb der K-Domäne sind die hydrophoben Aminosäuren, die die Keratin-ähnliche Struktur ausbilden, fett hervorgehoben. Positionen, an denen mehr als 75 % der Sequenzen eine hydrophobe Aminosäure an der jeweiligen Stelle besitzen, sind mit einem Stern oberhalb der Auflistung markiert.

beiden Gene in mehreren Datensätzen und unter Berechnung mit verschiedenen Algorithmen gegeben. Im Gegensatz dazu liegt *GGM11* eindeutig in der Gruppe der *AGL6*-ähnlichen Gene, die in ihrer Gesamtheit mit 88 % *bootstrap*-Wert unterstützt wird. Aus dieser Subfamilie sind schon mehrere Gymnospermen-MADS-Box-Gene, z B. *GGM9* aus *Gnetum gnemon* (Winter, 1997; Winter et al., 1999), isoliert worden, die innerhalb der *AGL6*-ähnlichen Gene eine Untergruppe mit 87 % *bootstrap support* bilden und sich gut von der Angiospermen-Untergruppe abgrenzen, die mit 78 % unterstützt wird. Die am nächsten mit den *AGL6*-ähnlichen Genen verwandte Subfamilie, die *AGL2*-ähnlichen Gene, enthält neben mehreren Angiospermen-Genen nur ein einziges Gen aus *Pinus radiata* und wird mit 99 % *bootstrap*-Wert unterstützt.

Wie aus Abbildung 8 (Seite 36) zu entnehmen ist, fällt *GGM12* mit moderater *bootstrap*-Unterstützung von 62 % in die Subfamilie der *STMADS11*-ähnlichen MADS-Box Gene, was unabhängig davon auch von der *GGM12*-Expression in vegetativem Gewebe unterstützt wird. Auch alle anderen bisher untersuchten *STMADS11*-ähnlichen Gene werden bevorzugt in nicht-reproduktivem Gewebe exprimiert. Die Repräsentanten der Angiospermen-Sequenzen werden mit 78 % *bootstrap*-Wert unterstützt und innerhalb der Angiospermen-Proteine spalten sich klar monokotyle (73 %) und dikotyle (70 %) Sequenzen auf.

Ein gut konserviertes Aminosäuresequenzmotiv am Ende des C-terminalen Domäne, das bis auf AGL24 alle anderen bisher bekannten Mitglieder der *STMADS11*-Subfamilie und auch *GGM12* besitzen (siehe Abbildung 10, Seite 40), weist ebenso wie die *GGM12*-Position in der Phylogenierekonstruktion (siehe Abbildung 8, Seite 36) auf die Verwandtschaft von *GGM12* mit den *STMADS11*-ähnlichen Genen hin. Da für die Berechnung der Phylogenierekonstruktion nur die 170er Domäne der MADS-Box-Gene ohne C-terminale Region verwendet wurden (Münster et al., 1997), ergeben sich hier mehrere voneinander unabhängige Beweise, die die Zugehörigkeit von *GGM12* zur *STMADS11*-Subfamilie unterstützen.

Der Sequenzvergleich in Abbildung 10 (Seite 40) zeigt, daß bei den meisten Genen im STMADS-Motiv eingebettet eine putative Proteinkinase-C-Phosphorylierungssequenz liegt. Diese putative Phosphorylierungsstelle ist im Protein von *GGM12* durch den Austausch von Lysin durch Histidin zerstört. *GGM12* besitzt jedoch ca. 20 Aminosäuren vor dem STMADS-Motiv auch eine solche Phosphorylierungsstelle. Auch AGL24, das eine verkürzte C-terminalen Domäne ohne Ähnlichkeit zum STMADS-Motiv aufweist, hat am C-terminalen Ende eine putative Proteinkinase-C-Phosphorylierungssequenz.

C-terminaler Teil der C-Domäne der *STMADS11*-ähnlichen Gene

181

STMADS-Motiv 253

AGL24	TLERAKLT TL KEA *
STMADS16	EIMKGKPLLL TDMVMEEGQS SESIIT..TN NPDQDDSSNA SL KLG ...GT TAVEDDCSIT S LKLGLPFS *
SVP	ENERLGMQIC NNVHAHGGAE SENAAT..YE EGQSSEITN AGNST...G. APVDSESSDT S LRLGLPYGG *
BM1	MEMQ.VAADP LVVVYDEGQS SESVTN..TS Y...PRPPLDT
ZMM20	METQ.LGADP .EFVYEEGQS SESVTN..TS Y...PRPSTD
ZMM19	VGKQSV.ADT ENVIAEDGQS SESVMT..AL HSGS..SQDN
ZMM26	AGKQAV.ADT ENVIAEEGQS SESVMT..AL HSGS..SQDN
ORYSAT006	AEKQ.V.VDT ENFVTE.GQS SESVMT..AL HGSSQSQDN
ZMM21	AGTMVVAAAA ENILTEDGQS SESVMT..AL HSGS..SLDC
TGMADS606	RGKQAV.TDV EHVPSEDGQS SESVTY..TA HIGEP..QDY
STMADS11	..SQARLNEE GQNVIQEQQHS ADSITNNRSL VNSh...QDY N..... DS.DT S LKLCLAFP *
GGM12	..RYNNRAPL ENFEAEEESLP IGQLLAHEPP QSQSSDSIST SFSL KLG NGV VIPDNEVSDT S LHLGLPSHS *

Abbildung 10 zeigt einen Sequenzvergleich der C-terminalen Teile der C-Domäne *STMADS11*-ähnlicher MADS-Box-Proteine. Die Namen der Proteine aus Monokotyledonen sind gelb, aus Dikotyledonen blau und GGM12 aus *Gnetum gnemon* grün unterlegt. Putative Protein-Kinase-C-Phosphorylierungsstellen sind in hellgrün gedruckt. In der grauen Box am C-Terminus ist ein die Phosphorylierungsstelle umgebendes Aminosäuresequenzmotiv grau unterlegt und die häufigsten Aminosäuren sind in fett gedruckt. Dieser Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm Pileup unter Standardparametern durchgeführt mit Ausnahme von STMADS11, das zusätzlich noch per Hand ausgerichtet wurde.

Accessionnummern der gezeigten Proteine: AGL24 (AF005158), BM1 (AJ249141), ORYSAT006 (AB003322), SVP (AC006592), STMADS11 (AF008651), STMADS16 (AF008652), alle anderen bezeichnen unveröffentlichte Gene der Arbeitsgruppe Theißen.

Die Phylogenierekonstruktion in Abbildung 8 (Seite 36) zeigt eine neue Subfamilie, die der *GGM13*-ähnlichen Gene. Zu ihr gehören *GGM13* aus *Gnetum gnemon* und das ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Gen *ZMM17*, das von Susanne Werth, einer technischen Assistentin der Arbeitsgruppe Theißen, aus einer cDNA-Bank von *Zea mays* isoliert wurde. Auch *AP3-2* aus der basalen Angiosperme *Asarum europaeum* (Kramer und Irish, 2000), das kürzlich in die Sequenzdatenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) eingetragen wurde, liegt in der Subfamilie der *GGM13*-ähnlichen MADS-Box-Gene. Diese neue Subfamilie wird mit 100 % *bootstrap*-Wert unterstützt. Auffallend an der *GGM13*-Subfamilie ist ihre Verwandtschaft innerhalb dieser Phylogenierekonstruktion mit den B-Genen (*DEF*-, *GLO*-, *GGM2*- und *GGM15*-ähnliche Gene), die mit einem moderaten *bootstrap*-Wert von 64 % unterstützt wird. Dieser Wert ist mit einem anderen Datensatz in der Phylogenierekonstruktion von Becker et al. (2000) auf 75 % erhöht. In den noch folgenden Kapiteln 2.4.4. und 2.4.5. kann gezeigt werden, daß Mitglieder dieser Genfamilie trotz ihrer

MADS-Domäne

I-Domäne

K-Domäne

B/B_{sister} gap

K-Domäne

C-terminale Domäne

C-terminale Domäne

Abbildung 11: Vergleich der B_{sister}-Proteinsequenzen ZMM17 und GGM13 mit anderen pflanzlichen MADS-Box-Proteinen. Dieser Vergleich wurde mit dem Programm Pileup des GCG-Programmpaketes mit den Parametern *gap creation penalty* = 12 und *gap extension penalty* = 4 erstellt. Die MADS-, I-, K- und C-Domänen der Proteine sind durch Kästen verdeutlicht. Positionen innerhalb der K-Domäne, auf denen sich in mindestens 75 % der Fälle eine hydrophobe Aminosäure (L, I, V oder M) befindet, sind mit einem Sternchen markiert. Eine Lücke im *alignment* der I-Region aller B und B_{sister} Proteine weist auf eine charakteristisch verkürzte I-Domäne hin und ist hier als *B/B_{sister} gap* bezeichnet.

phylogenetisch nahen Verwandtschaft mit den B-Genen vorwiegend in weiblichen Reproduktionsorganen exprimiert werden. Aus diesem Grund und wegen ihrer phylogenetischen Position als Schwestergruppe der B-Gene wird die Subfamilie der *GGM13*-ähnlichen Gene nachfolgend B_{sister} genannt.

Abbildung 11 zeigt einen Sequenzvergleich einiger B-Funktionsgene (*DEF*, *GGM2*, *GLO* und *PI*), B_{sister}-Gene und anderer MIKC-Domänen MADS-Box-Proteine. Die Parameter für die

	PI Motif-Derived	PaleoAP3 Motif
PD2	--VHNLY AFR LQPLH ----P N ---- LQNE - GG-----F	GSRDLRLS
TM6	--VHNLY AFR LQPLH ----P N ---- LQNE - GG-----F	GSRDLRLS
PtAP3-1a	--SHI FAFR LHPN ----QP N ---- LHIN - GGG-----Y	GFHNLHLA
PtAP3-1b	--SHL FAFR LHPN ----QP N ---- LHIN - GGG-----Y	GFHNLHLA
PnAP3-2	--PNI FAFR LQPS ----QP N ---- LHN - GGG-----Y	NCHDLRLA
DeAp3	--QNI FAFR LQPS ----QP N ---- LHD - GGG-----Y	GSHDLRLA
CpAP3	----VFS FR LQPS ----QT N ---- LHND - EE-----Y	EIHDLRLA
RbAP3	APQ--VFS FR LQPS ----QP N ---- LHDD - EE-----Y	EIHDLRLV
PhAP3	--PHFLGYN MQGN ----P YHES -AHSDV TTANNISSAY GIYDLRLA	
MfAP3	--AHI---- ----- LHDT - G-----F	GIHDLRLA
GGM2	--QNMT FSF - L -----P N ----A----- -----	STQYARIA
GGM13	----PA FR LQPT ----QP N ---- LQESS IV-----P	NRPVQLQ*
ZMM17	----L-G FR LQPT ----QP N ---- LQDPA APCGG----L	HGHGLQL*
AP3-2	----LHP FR LQPA ----QP N ---- LQDAN -----L	LPHDLQL*
	PI Motif	
GLOBOSA	Q- MP -- FAFR VQPM ----QP N ---- LQERF	
FBP1	H- MP -- FAFR VQPM ----QP N ---- LQERL	
NTGLO	Q- MP -- FAFR VQPM ----QP N ---- LQERF	
PISTILLATA	Q---- FGYR VQPI ----QP N ---- LQEKIMSLVID	
CpPI	Q- MP -PFTFQ LHPS ----QP N ---- LQEIK	
RbPI-1	Q- MPMPFTFR VQPA ----QP N ---- LQDN	
PrDGL	A--P--L-LR LQPN ----QP N ---- LQDIGY	
DAL11	---PDPE-L-LR LQPN ----QP N ---- LKDSGY	
DAL13	A--P--L-LR LQPN ----QP N ---- LQDIGY	

Abbildung 12: Vergleich der C-terminalen Enden von *GGM13* und *ZMM17* mit einigen MADS-Box Proteinen aus Angiospermen und Gymnospermen, verändert nach Kramer and Irish, 1998. *GGM13* und *ZMM17* enthalten ein konserviertes Aminosäuremotiv (*PI Motif-Derived*), das für putative B-Funktionsgene typisch ist. Oben: *TM6*-ähnliche Proteine von Eudicotyledonen (*PD2* und *TM6*), *DEF*-ähnliche Proteine von basalen Angiospermen, das *GGM2*-Protein aus *Gnetum gnemon*, *GGM13* und *ZMM17*; Unten: *GGM2*-ähnliche Proteine aus Gymnospermen (*PRDGL*, *DAL11*, *DAL13*) und einige *GLO*-ähnliche Proteine aus Angiospermen. Regionen, die ein spezifisches Sequenzmotiv definieren, sind von farbigen Kästen umgeben. Innerhalb dieser Kästen wurde die häufigste Aminosäure auf einer bestimmten Position fett gedruckt.

Berechnung dieses *alignments* waren auf *gap creation penalty* = 12 und *gap extension penalty* = 4 eingestellt. Aus diesem Vergleich wird leicht ersichtlich, daß die B_{sister} -Gene nahe mit den B-Funktionsgenen verwandt sind. Besonders die strukturelle Gemeinsamkeit einer Insertion/Deletion in der I-Domäne, die zur Verkürzung derselben führt und hier B/B_s *gap* genannt wird, ist diagnostisch für die B/B_{sister} -Superfamilie. Auch das Vorhandensein des bis dato für B-Funktionsgene spezifischen Aminosäuresequenzmotiv *PI motif derived* (Kramer

and Irish, 1998) im nur sehr schwach konservierten C-Terminus deutet auf eine enge Verwandtschaft zwischen B-Funktionsgenen und B_{sister}-Genen hin. Im Sequenzvergleich in Abbildung 12 (Seite 36) fällt besonders auf, daß die B_{sister}-Proteine weniger vom Konsensus des *PI motif derived* abweichen als einige der B-Funktionsproteine. Besonders einige Proteine der B-Funktionsgene aus basalen Angiospermen, wie zum Beispiel PhAP3 (*Peperomia hirta*), MfAP3 (*Michelia figo*) und auch GGM2 aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* weichen besonders im vorderen Teil des *PI motif derived* sehr stark von Konsensus ab, im MfAP3-Protein scheint sogar das gesamte *PI motif derived* deletiert zu sein.

Charakteristisch für B_{sister}-Gene ist, soweit das den drei bisher zur Verfügung stehenden Sequenzen entnehmbar ist, ein Alanin oder Tyrosin an Position 8 des *derived PI motif*. Dort habe alle putativen B-Funktionsgene Leucin, Serin oder Asparagin. Ein noch besserer Indikator für die B_{sister}-Gene sind die letzten 3 Aminosäuren dieser Proteine, die an dieser Stelle eine Leucin-Glutamin-Leucin Sequenz aufweisen. Alle B-Funktionsproteine terminieren nicht nach dem letzten Leucin und in keiner dieser Sequenzen läßt sich ein von Leucin umgebenes Glutamin feststellen. Aminosäuren, die in B- und B_{sister}-Genen übereinstimmen, stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Sequenz des Vorläufers aller B- und B_{sister}-Gene ab, der sich im Laufe der Evolution in die B- und B_{sister}-Genlinie aufgespalten hat.

Die Phylogenierekonstruktion (siehe Abbildung 8, Seite 36) zeigt, daß sich innerhalb der B-Funktionsgene die *bootstrap*-Unterstützung der einzelnen Gruppen jedoch drastisch verringert, so daß die gezeigte Phylogenierekonstruktion die Verwandtschaftsverhältnisse der *DAL12/GGM15*-, *DEF*-, *GGM2*- und *GLO*-Subfamilien nicht genügend gut darstellen kann. Die Zugehörigkeit zur *DEF*-, *GLO*-, *DAL12/GGM15*-, und der Gymnospermen B-Funktionsclade *GGM2* kann jedoch mit hoher Unterstützung von jeweils 84 % - 100 % für deren Mitglieder festgelegt werden.

In der in Abbildung 8 (Seite 36) gezeigten Phylogenierekonstruktion wird die in anderen Veröffentlichungen wie z.B. Winter et al. (1999) durchaus gut unterstützte Subfamilie der *TM3*-ähnlichen Gene in ihrer Gesamtheit nur mit 46 % *bootstrap*-Wert unterstützt. Innerhalb dieser Subfamilie werden jedoch Gymnospermen-Gene mit 98 % und Angiospermen-Gene mit 91 % unterstützt.

Alle anderen, in der Literatur beschriebenen Subfamilien (Winter et al., 1999; Münster et al., 1997; Theißen et al., 2000; Becker et al., 2000), wie die *CRM3*-, *AGL15*-, *AGL17*-, *GGM4*- und *AGAMOUS*-Subfamilie werden mit jeweils 98 % - 100 % *bootstrap*-Wert unterstützt.

GGM14 und *GGM18* fallen mit *GGM4* und *GGM8* (Winter et al., 1999) in die Subfamilie der *GGM4*-ähnlichen Gen, die mit 99 % *bootstrap*-Wert unterstützt wird. Die einzigen Mitglieder dieser Subfamilie sind die aus *Gnetum* isolierten Gene. *GGM15* bildet zusammen mit *DAL12* (Sundström et al., 1999) eine Subfamilie, die mit 93 % *bootstrap*-Wert unterstützt wird. Beide MADS-Box-Subfamilien beinhalten keinen Angiospermen-Vertreter und sind möglicherweise gymnospermen-spezifisch. *GGM10*, *GGM16*, *GGM17* und *GGM19* gehören zu keiner Genfamilie, da sie mit keinem anderen Gen nahe genug verwandt sind, um mit einem *Gootstrap*-Wert von mindestens 50 % als Subfamilie unterstützt zu werden.

In diesem Kapitel werden 5 Subfamilien (*AG*, *AGL2*, *AGL6*, *GGM13* und *STMADS11*) vorgestellt, die in der Phylogenierekonstruktion (Abbildung 8) aus MADS-Box-Genen von Gymnospermen- und Angiospermen bestehen. Leidiglich aus der Subfamilie der *AGL2*-ähnlichen Gene ist kein Mitglied aus *Gnetum* isoliert worden. Unter den Vertretern der *AG*-Subfamilie sind einige C-Funktionsgene zu finden. Die Funktion aller anderen oben aufgeführten Subfamilien ist noch weitgehend unbekannt.

GGM4, *GGM8*, *GGM14* und *GGM18* bilden eine Subfamilie, die keinen Angiosperm-Vertreter enthält und *GGM16*, *GGM17* und *GGM19* fallen in keine Subfamilie.

GGM13 aus *Gnetum* und *ZMM17* aus *Zea mays* begründen eine neue MADS-Box-Gen-Subfamilie, *B_{sister}* genannt, die aufgrund ihrer Position in der Phylogenierekonstruktion (Abbildung 8, Seite 36), strukturellen Ähnlichkeiten (siehe Abbildung 11, Seite 42) und des Vorhandenseins eines Sequenzmotivs in der C-terminalen Domäne (siehe Abbildung 12, Seite 35) eine nahe Verwandtschaft zu den B-Genen aufweist.

3.3. Genomische *Southernblot*-Analysen der Gene *GGM10-GGM19*

Die Autoradiographien in Abbildungen 13-15 (Seiten 44-46) zeigen *Southernblot*-Analysen von *GGM10-GGM19* unter stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen mit den verschiedenen genspezifischen Sonden. Die Filter enthalten genomische DNA eines einzelnen *Gnetum gnemon* Baumes aus dem botanischen Garten Bochum. Die *Southernblot*-Analysen der Gene *GGM14-GGM19* wurden von der technischen Assistentin Britta Grosardt durchgeführt. Mit Ausnahme von *GGM10* (siehe Abbildung 13) und *GGM18* (Abbildung 15) zeigen alle

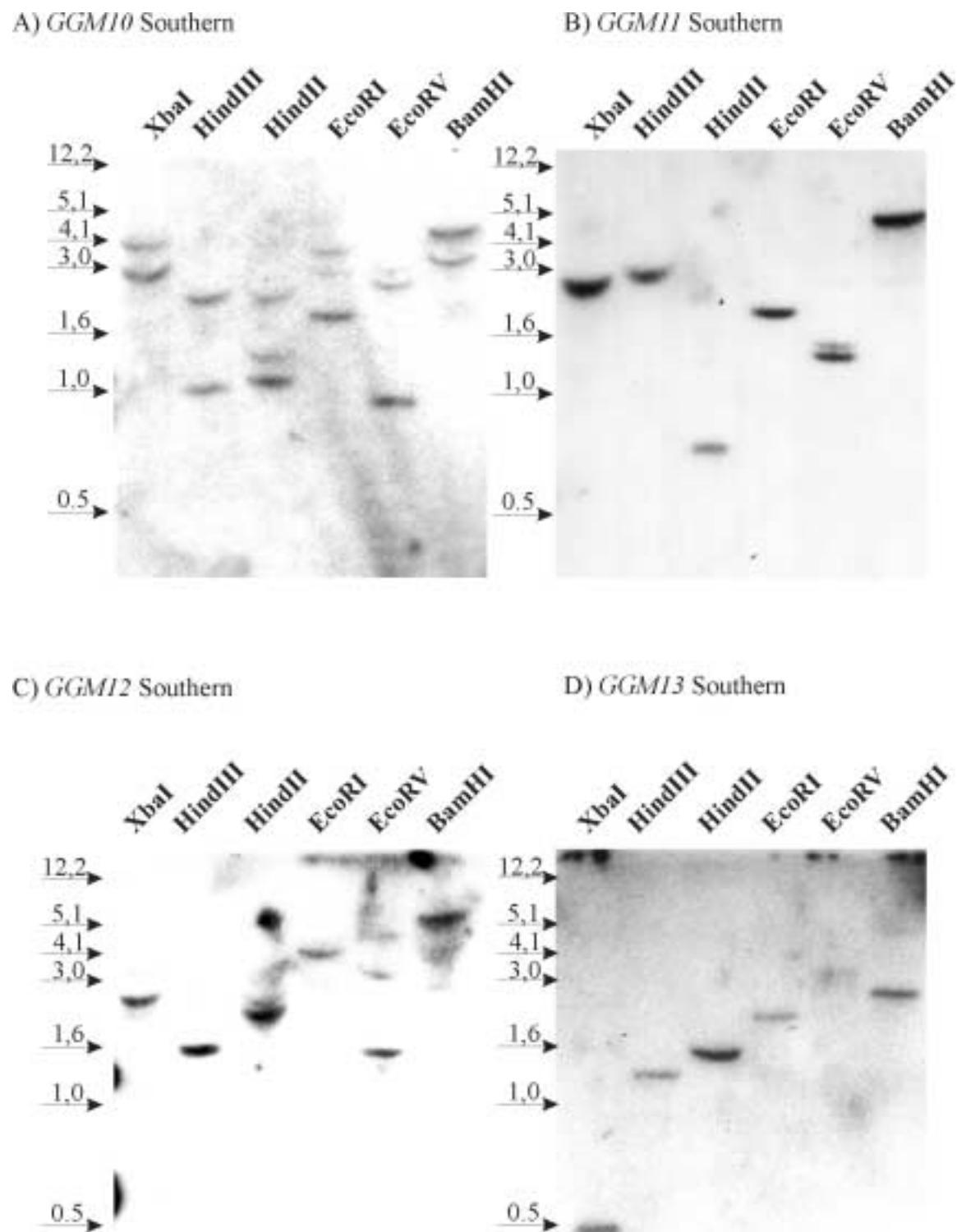


Abbildung 13: Autoradiographien der genomischen *Southern blot*-Analysen von *GGM10*-*GGM13* nach Hybridisierung mit den jeweiligen genspezifischen Sonden unter stringenten Bedingungen. Die genomische DNA stammt aus den Blättern eines einzelnen *Gnetum-gnemon*-Exemplars des botanischen Gartens Bochum. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind oberhalb der einzelnen Spuren angegeben, die Größen der DNA-Marker-Fragmente sind links neben den Autoradiographien in Kilobasenpaaren angegeben.

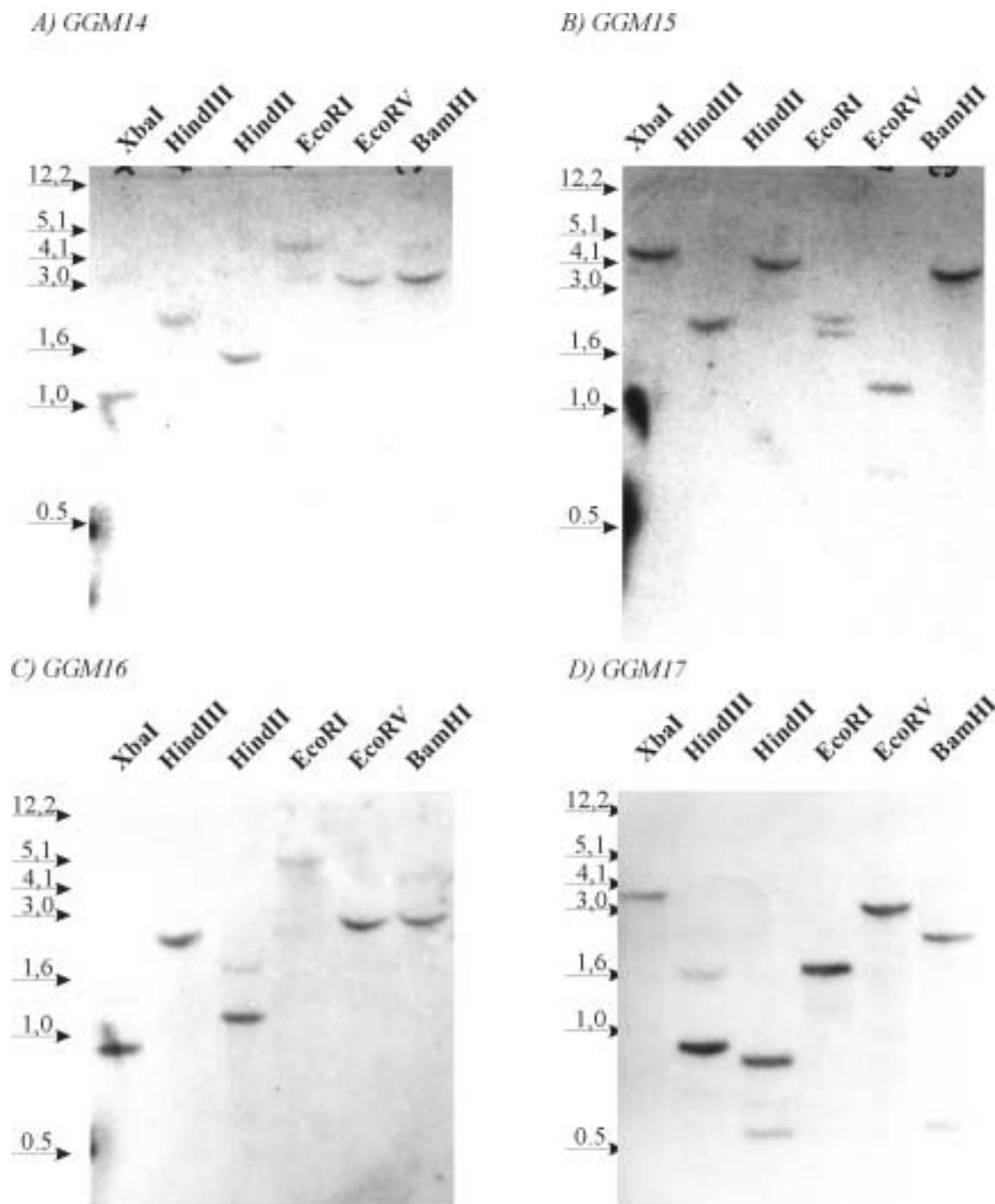
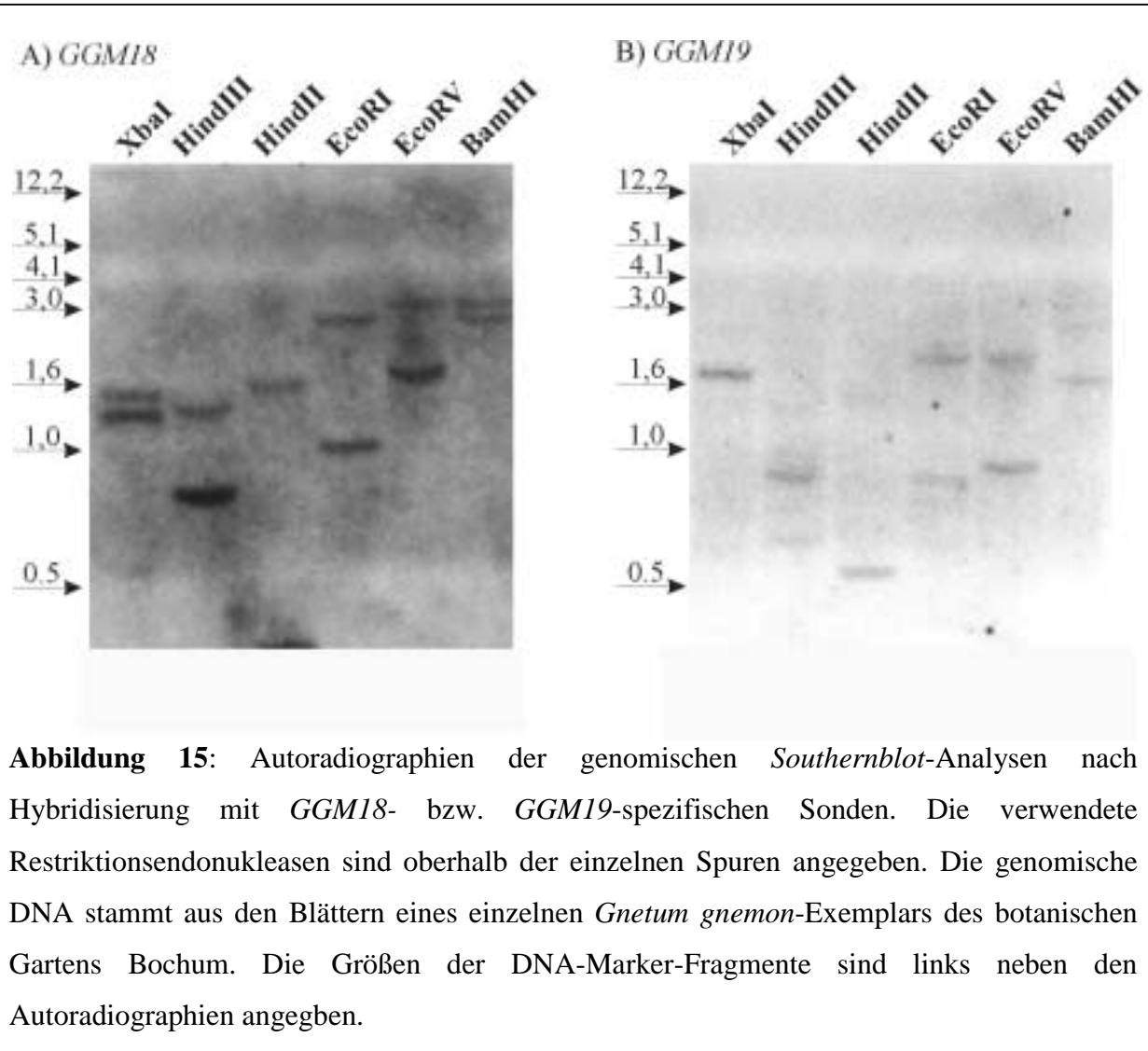


Abbildung 14: Autoradiographien der genomischen *Southern blot*-Analysen von *GGM14*-*GGM17* nach Hybridisierung mit den jeweiligen genspezifischen Sonden unter stringenten Bedingungen. Die genomische DNA stammt aus den Blättern eines einzelnen *Gnetum-gnemon*-Exemplars des botanischen Gartens Bochum. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind oberhalb der einzelnen Spuren angegeben, die Größen der DNA-Marker-Fragmente sind links neben den Autoradiographien in Kilobasenpaaren angegeben.



Southernblot-Analysen in mindestens einer Spur nur eine einzige Bande. Daher kann angenommen werden, daß diese Gene in einfacher Kopienzahl vorliegen (*single copy gene*) und es auch keine unterschiedlichen Allele gibt. *GGM10* jedoch weist in jeder Spur mindestens zwei Banden auf. Restriktionsanalysen dieses Genes zeigen jedoch Schnittstellen für XbaI und HindIII innerhalb der unvollständigen cDNA Sequenz, was die Doppelbanden in diesen Spuren erklärt. Also liegt auch *GGM10* als Gen in Einzelkopie vor und besitzt keine unterschiedlichen Allele. In der cDNA des Gen *GGM18* können solche Schnittstellen für die im *Southernblot*-Experiment verwendeten Restriktionsendonukleasen nicht gefunden werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß *GGM18* in zwei Allelen vorliegt oder im Genom von *Gnetum gnemon* ein zweites, zu *GGM18* sehr ähnliches Gen existiert.

In Abbildung 16 (Seite 48) ist eine genomische *Southernblot*-Analyse zu sehen, die unter moderat stringenten Bedingungen mit *GGM12*-spezifischer Sonden hybridisiert und gewaschen wurde. In allen Spuren sind mindestens 3 verschiedene Banden zu sehen, die

stärkste stammt von *GGM12* selbst und eine der anderen von *GGM6* (Winter, 1997; Winter et al., 1999). Die Bande, die nicht zugeordnet werden kann, gehört zu einem *Gnetum*-MADS-Box-Gen, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *GGM12* aufweist, aber noch nicht isoliert werden konnte.

Genomische *Southernblot*-Analysen unter moderat stringenten Wasch- und Hybridisierungsbedingungen mit *GGM10*-, *GGM11*- und *GGM13*-spezifischen Sonden ergaben keine neuen Banden (Daten nicht gezeigt). *GGM10* und *GGM13* scheinen die einzigen Vertreter ihrer Subfamilien in *Gnetum gnemon* zu sein, und die Subfamilie der *AGL6*-ähnlichen MADS-Box Gene besteht nur aus *GGM9* und *GGM11*.

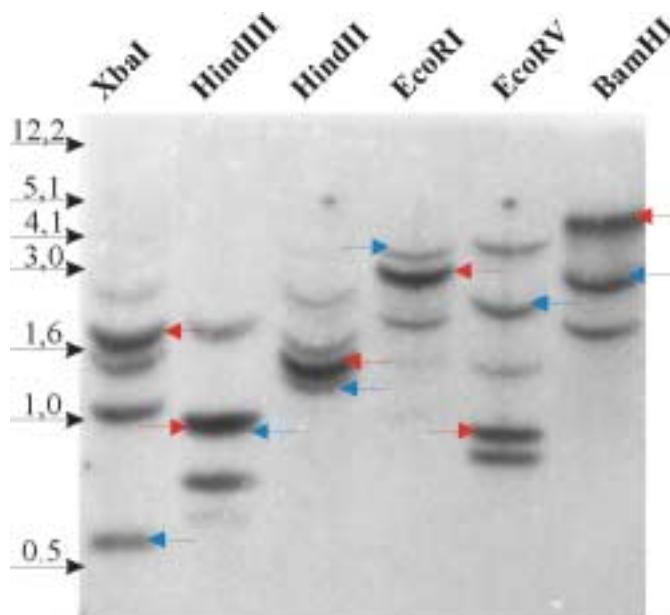


Abbildung 16: Autoradiographie eines *Southernblots* mit genetischer DNA aus *Gnetum gnemon*, der mit einer *GGM12*-spezifischen Sonde unter moderat stringenten Bedingungen gewaschen und hybridisiert wurde. Über den einzelnen Spuren sind die verwendeten Restriktionsendonukleasen angegeben und links neben dem *Southernblot* die Größen der verwendeten Markermoleküle in Kilobasenpaaren. Die roten Pfeile markieren *GGM12* Banden, die blauen Pfeile kennzeichnen Banden, die aus Kreuzhybridisierung mit *GGM6* (Becker et al., 2000) hervorgegangen sind.

3.4 Expressionsstudien

Um Erkenntnisse über Expressionsort und –zeit der verschiedenen MADS-Box-Gene zu erlangen, wurden *Northernblot*-Experimente (Abbildung 17, Seite 50) durchgeführt, und von einigen Genen wurden zur genaueren Charakterisierung *in-situ*-Hybridisierungen ganzer Gewebsschnitte angefertigt.

MADS-Box-Gene, die einer bestimmten Subfamilie angehören, zeigen im allgemeinen auch ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Aufgrund ähnlicher Expressionsmuster von Angiospermen- und Gymnospermengenen allein können sicherlich nicht orthologe Gene identifiziert werden. Jedoch können Ähnlichkeiten im Expressionsmuster zweier Gene zusätzlich zu phylogenetischen Analysen einen weiteren Hinweis auf deren Orthologie geben. Darüber hinaus kann das Wissen über Expressionsort und –zeit der Gene einen ersten Hinweis auf deren Funktion geben. Obwohl die *Northern*-Experimente nur eine sehr geringe Auflösung zeigen, werden die verschiedenen MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon* divers exprimiert (siehe auch Winter et al., 1999).

GGM10- und *GGM17*-Transkripte konnten in keinem der uns zur Verfügung stehenden Gewebetypen von *Gnetum gnemon* (Blatt, männlicher und weiblicher Zapfen) nachgewiesen werden. Möglicherweise wird werden diese beiden Gene in einem anderen Gewebe z.B. der Wurzel exprimiert oder aber die Expressionsrate liegt unterhalb eines detektierbaren Niveaus.

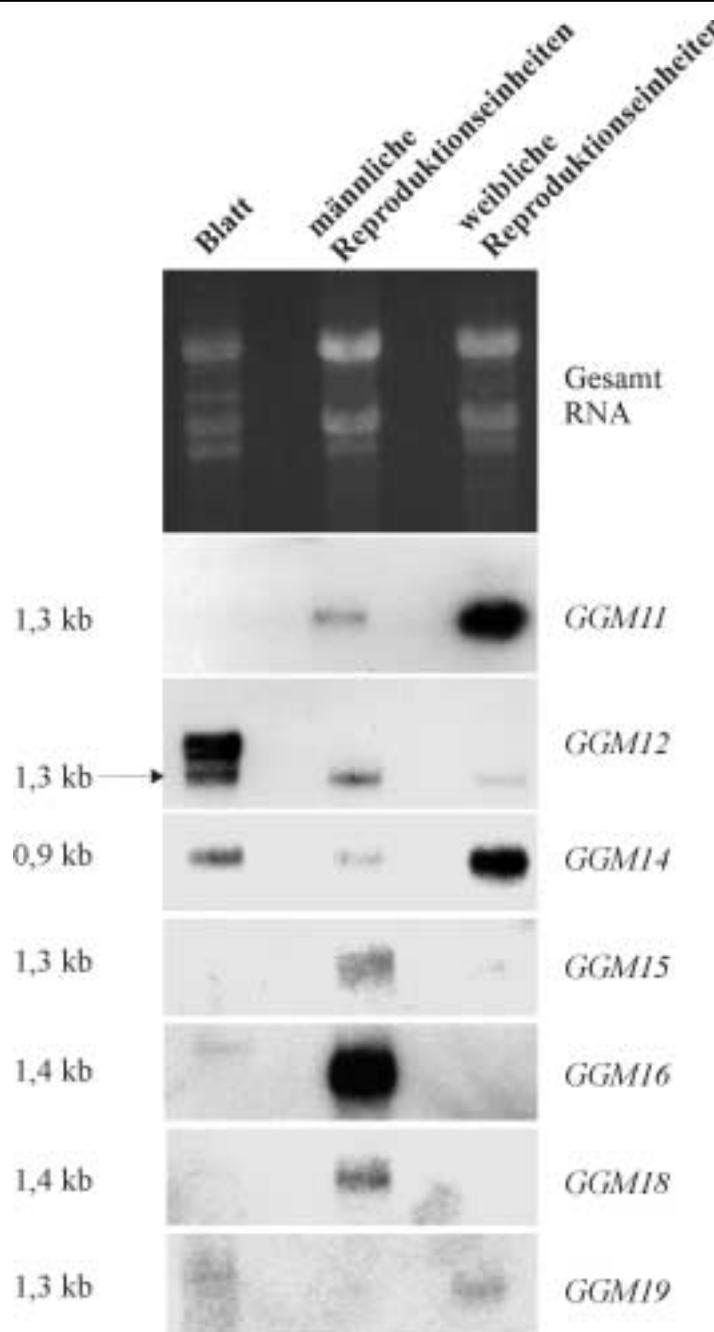


Abbildung 17: Autoradiographien der *Northernblot*-Analysen von *GGM11*, *GGM12*, *GGM14*, *GGM15*, *GGM16*, *GGM18* und *GGM19* mit Gesamt-RNA aus *Gnetum gnemon* nach Hybridisierung mit den jeweiligen genspezifischen Sonden. Die Herkunft der Gesamt-RNA ist oberhalb der einzelnen Spuren angegeben. Links neben den Autoradiographien sind die Längen der mRNAs in kBp angegeben, rechts der Name des Gens. Das Foto des mit Ethidiumbromid gefärbten *Northern*-Gels vor dem Kapillarblotting dient als Ladekontrolle und ist über den Autoradiographien gezeigt.

3.4.1 Expressionsmuster der hauptsächlich auf männliche Reproduktionseinheiten beschränkten Gene *GGM7* und *GGM15*

Die *Northern blot*-Analysen von *GGM7* (Daten nicht gezeigt, siehe Winter, 1997 und Becker et al., 2000) und *GGM15* (siehe Abbildung 17, Seite 50) zeigen für *GGM15* eine ausschließliche und für *GGM7* eine vorherrschende Expression in männlichen Zapfen. Daher wurde die Expression dieser beiden Gene mittels *in-situ*-Hybridisierungen detaillierter analysiert, wie Abbildung 18 zeigt.

Dabei ergab sich ein räumlich ausgedehntes Expressionsmuster für *GGM7*, das in fast allen Gewebetypen des männlichen Zapfens nachzuweisen war (siehe Abbildung 18-A, Seite 52). Besonders starke Expression fand sich im äußeren Integument der sterilen Ovula und in noch undifferenzierten Entwicklungsstadien der jungen Antherophoren. Auch die Regionen unterhalb des sporogenen Gewebes wurden von der Digoxigenin-markierten antisense-*GGM7*-RNA angefärbt. Die *GAPDH*-Positivkontrolle (William Martin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung) in Abbildung 18-E hingegen zeigt eine wesentlich stärkere Expression, die besonders intensiv im Nucellus, im sporogenen Gewebe der Antherophoren und in sehr jungen Antherophoren sichtbar ist. Sowohl die *GGM7*- als auch die *GGM15-sense*-Negativkontrolle (Abbildung 18B und 18D) zeigen keinerlei deutliche Hybridisierungen, was auf eine sehr spezifische Hybridisierung der verwendeten antisense-Sonden hindeutet.

Im Gegensatz dazu beschränkte sich die Expression von *GGM15* auf die eng umgrenzten Bereiche der Antherophoren innerhalb des männlichen Zapfens von *Gnetum gnemon* (siehe Abbildung 18C, Seite 52). Schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium grenzt *GGM15*-Expression sehr scharf Antherophoren- von Integumentprimordien ab. Innerhalb der Antherophoren konnte *GGM15* mRNA sowohl in sporogenen als auch in den umgebenden Geweben festgestellt werden. Jedoch ließ sich auch in späteren Entwicklungsstadien *GGM15*-Transkript nie in Integumenten nachweisen. *GGM15* wird daher früher und räumlich enger begrenzt exprimiert als das putative orthologe der B-Funktionsgene, *GGM2* aus *Gnetum gnemon* (Winter et al., 1999). Die mögliche Assoziation von *GGM15* mit den B-Genen lässt sich auch aus der Phylogenierekonstruktion in Abbildung 8 (Seite 36) entnehmen, in der *GGM15* eindeutig in die *GGM2/DEF/GLO*-Superfamilie fällt und möglicherweise ortholog zu *DAL12* (Sundström et al., 1999) ist.

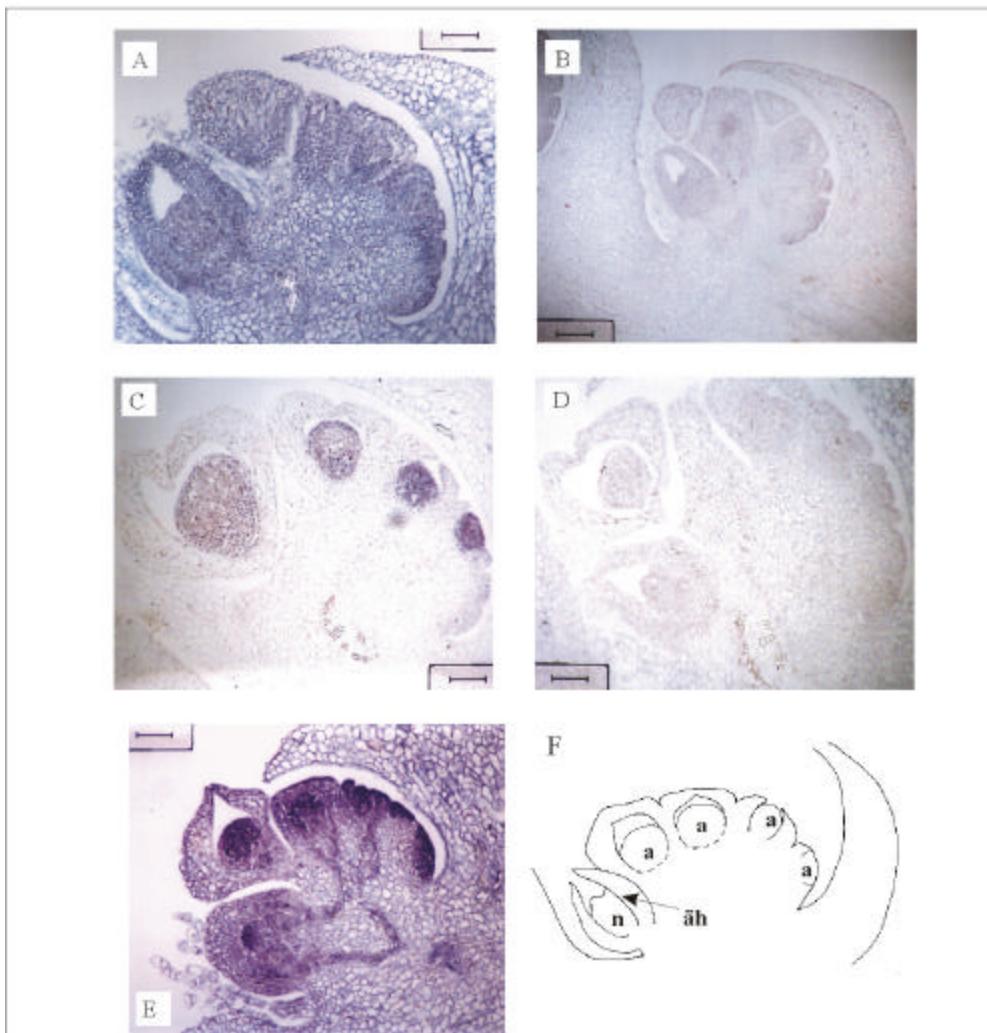


Abbildung 18: *In-situ*-Expressionsmuster von *GGM7* und *GGM15* in jungen männlichen Strobili von *Gnetum gnemon*, die mit Digoxigenin-markierter RNA hybridisiert wurden. A wurde mit einer *GGM7-antisense*-Sonde zur Detektion des *GGM7*-Transkripts überschichtet, B mit einer *GGM7-sense*-Sonde als Negativkontrolle. In C zeigt die *GGM15 antisense* Sonde das spezifische Expressionsmuster der *GGM15*-mRNA in sporogenem Gewebe, und in D wird die mit der *GGM15-sense*-Sonde hybridisierte Negativkontrolle gezeigt. Die mit der *GAPDH-antisense*-Sonde überschichteten Präparate in E dienen als Positivkontrolle. Die Schnitte sind jeweils so angeordnet, daß sich die jüngeren Stadien des Strobilus auf der rechten Seite befinden und sich die älteren Entwicklungsstadien nach links anschließen. Bis auf C läßt sich in allen Schnitten auf der linken Seite ein steriles Ovulum erkennen. Der Schemazeichnung F sind die Bezeichnungen der Strukturen innerhalb des Strobilus entnehmbar. Der eingeblendete Größenbalken entspricht in B 100 µm und in allen anderen Teilabbildungen 200 µm

Abkürzungen: a, Antherophore; n, Nucellus; äh, äußere Hüllstruktur

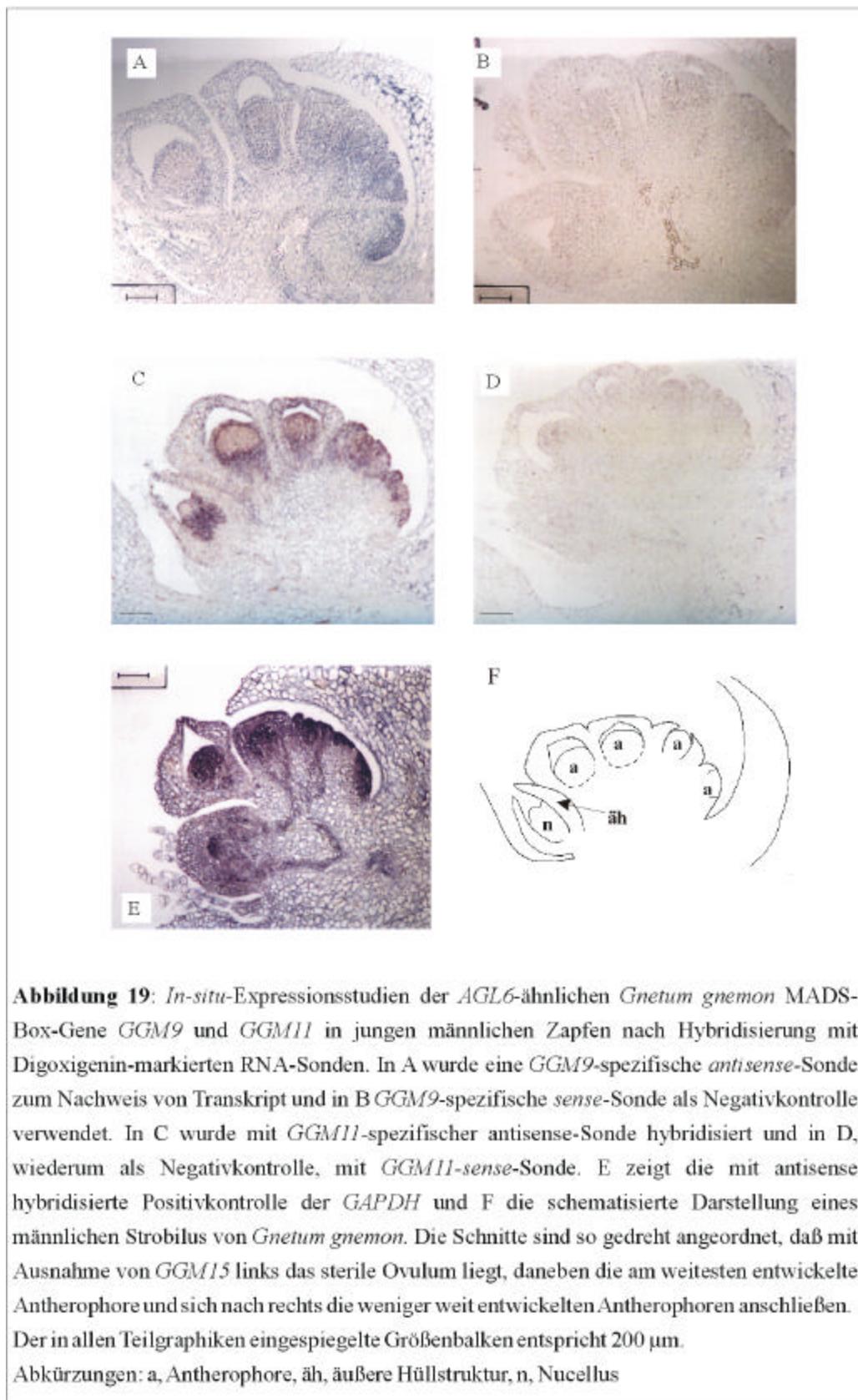
3.4.2 Expressionsmuster der *AGL6*-ähnliche Gene *GGM9* und *GGM11*

Die mRNA-Transkripte von *GGM9* (siehe Winter et al., 1999) und *GGM11* (siehe Abbildung 17, Seite 50) sind sowohl im männlichen, als auch im weiblichen Zapfen von *Gnetum gnemon* nachweisbar, nicht jedoch in Blättern. Dabei ist die Expression von *GGM11* in weiblichen Zapfen um ein Vielfaches stärker als in männlichen. *AGL6*-ähnliche Gene in Angiospermen sind ebenfalls nur in reproduktiven Geweben exprimiert (Ma et al., 1991; Jack et al., 1992).

In-situ-Experimente zeigen jedoch die feineren Unterschiede in der Expression von *GGM9* und *GGM11*, wie in Abbildung 19 zu sehen. In den untersuchten jungen männlichen Strobili zeigt *GGM9* (siehe Abbildung 19A) einen sehr frühen Transkriptionsbeginn in einem Entwicklungsstadium, in dem noch nicht zwischen sporogenem Gewebe und Integumentprimordien unterschieden werden kann. Dort ist *GGM9*-Transkript in der gesamten sich entwickelnden Antherophore nachweisbar. In etwas späteren Stadien verringert sich die Gesamttranskriptmenge jedoch drastisch und ist nur noch an der Basis des späteren sporogenen Gewebes zu sehen. In späteren Entwicklungsstadien männlicher Strobili konnte kein Transkript mehr nachgewiesen werden. Auch im weiblichen Zapfen konnte keine *GGM9*-mRNA mehr nachgewiesen werden, obwohl *Northern*-Experimente eine etwa gleich starke Expression von *GGM9* in männliche und weiblichen Zapfen zeigen (Winter et al., 1999).

Die *GAPDH*-Positivkontrolle für die *GGM11*-und *GGM9*-*in-situ*-Experimente lässt eine stärkere und räumlich weiter ausgedehnte Expression dieses Gens erkennen und ist deutlich unterschiedlich zu *GGM9* und *GGM11*. Die *sense*-Negativkontrollen dieser Experimente zeigen keine spezifische Färbung innerhalb der männlichen Zapfen. Die *GGM9* und *GGM11*-*antisense*-Sonden scheinen somit eine hohe Spezifität zu besitzen.

GGM11-Expression (siehe Abbildung 19C, Seite 54) im jungen männlichen Strobilus ist stärker und auf engere Bereich beschränkt als *GGM9*-Expression. Auch hier kann ein sehr früher Transkriptionsbeginn festgestellt werden. Anfänglich ist *GGM11*-mRNA in der gesamten sich entwickelnden Antherophore anwesend und zieht sich in etwas älteren Stadien aus den Integumenten zurück. Die verbleibende Expression ist in einer einzelnen, das sporogene Gewebe umgebenden Zellschicht und in einer breiteren Zone unterhalb des sporogenen Gewebes nachweisbar. In dem sterilen jungen Ovulum zeigt sich das *GGM11*-Transkript in einer eng umgrenzten Region unterhalb des Nucellus und ist daneben in den Primordien des inneren und mittleren Integuments sichtbar. Auch in sterilen Ovula ist



GGM11-Transkript nicht in dem äußeren Integument zu sehen. Auch das *GGM9*-Transkript konnte bisher nicht in den weiblichen Zapfen nachgewiesen werden.

3.4.3 Expressionsmuster des *STMADS11*-ähnlichen Gens *GGM12*

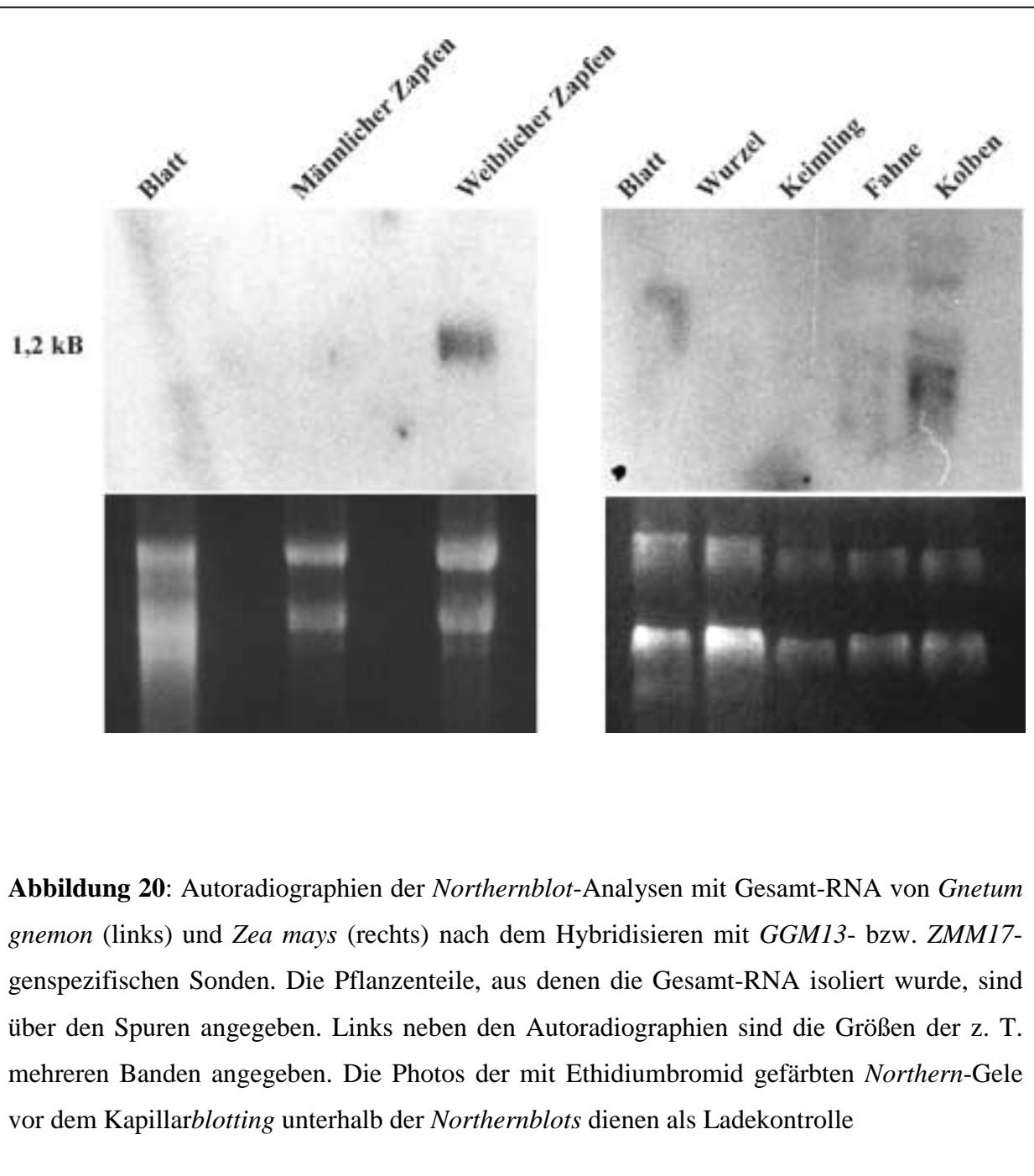
GGM12 zeigt in den *Northernblot*-Analysen (siehe Abbildung 17, Seite 50), wie für *STMADS11*-ähnliche Gene typisch, eine besonders starke Expression in vegetativen Organen (Carmona et al., 1998; Garcia-Maroto et al., 2000; Schmitz et al., 2000). In Blättern konnte ein Mehrfaches an *GGM12*-mRNA detektiert werden als in den Reproduktionsorganen. Dabei wird *GGM12* in männlichen Zapfen mindestens doppelt so stark exprimiert wie in weiblichen Zapfen. In der Blattspur konnten zusätzlich zu den in Reproduktionsorganen auftretenden RNA-Banden weitere größere Banden festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen mRNA Größen wäre differentielles Spleißen der *GGM12*-mRNA. Andererseits könnte die *GGM12*-spezifische Sonde aber auch mit anderen *GGM12*-ähnlichen MADS-Box Genen kreuzhybridisieren, was nach Betrachtung des unstringenten *Southern*-Experiments in Abbildung 16 (Seite 48) nicht ausgeschlossen werden kann.

In-situ-Hybridisierungen von Blattgewebe, Apikalmeristemen und Reproduktionseinheiten mit *GGM12*-spezifischen Sonden ergaben kein reproduzierbares Ergebnis.

3.4.4 Expressionsmuster des B_{sister} -Gens *GGM13*

GGM13 ist das einzige bisher aus *Gnetum gnemon* isolierte MADS-Box Gen, dessen Expression auf weibliche Zapfen beschränkt ist, wie aus den *Northernblot* Analysen in Abbildung 20 (Seite 56) ersichtlich ist. Die Expression dieses Gens ist, auch im Vergleich mit anderen Transkriptionsfaktoren, sehr schwach.

In-situ-Hybridisierungen verschiedener Entwicklungsstadien des weiblichen Zapfens von *Gnetum gnemon* mit *GGM13* spezifischen Sonden zeigten die Anwesenheit des Transkripts in sämtlichen untersuchten Entwicklungsstadien vom extrem jungen Zapfen bis hin zu ausdifferenzierten Ovula.



Die *GAPDH-antisense*-Sonde zeigt in jedem untersuchten Stadium eine deutlich unterschiedliche Expression, die in frühen Stadien (Abbildung 21B und 21F, Seite 57) im gesamten Zapfen zu finden ist und auch in späteren Stadien (Abbildung 21J und 21N, Seite 57) noch deutlich erkennbar ist. Die in Abbildung 21C, 21G, 21K und 21O (Seite 57) gezeigten Hybridisierungen mit *GGM13-sense*-RNA zeigen keine starken Signale. Beide Ergebnisse lassen auf die hohe Spezifität der *GGM13-antisense*-Sonde schließen.

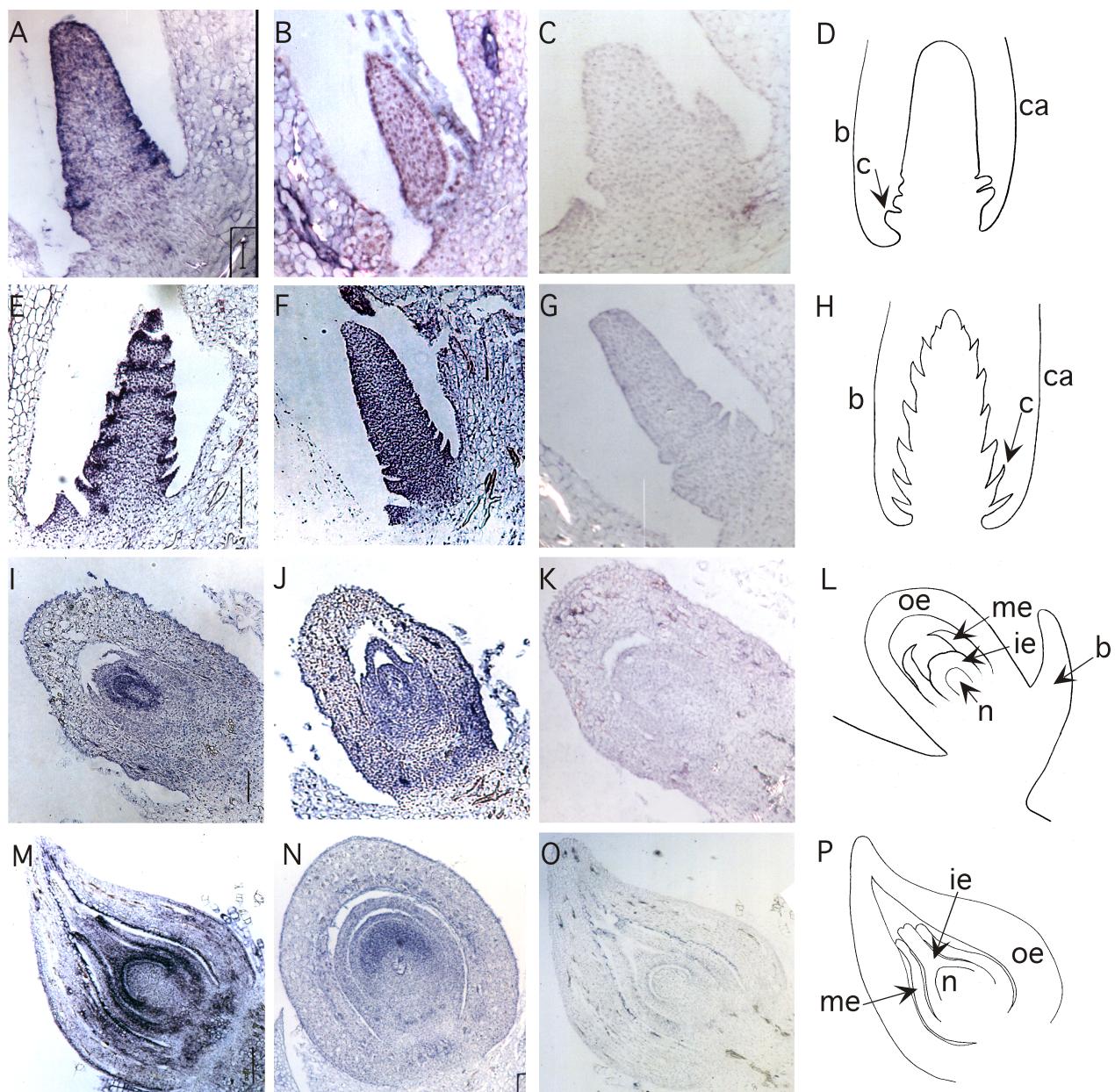


Abbildung 21: *In-situ*-Expressionsmuster von *GGM13* und *GAPDH* (Positivkontrolle) in weiblichen Zapfen von *Gnetum gnemon*. Zur Hybridisierung wurden mit Digoxigenin markierte RNA-Sonden verwendet. In A, E, I und M wurden *GGM13-antisense*-Sonden verwendet, die *GGM13* Transkripte detektieren. B, F, J und N zeigen Hybridisierungen mit *Gnetum gnemon-GAPDH-antisense*-Sonden. C, G, K und O wurden mit *sense*-Sonden der *GGM13*-cDNA (Negativkontrolle) hybridisiert. Die schematischen Zeichnungen in D, H, L und P verdeutlichen die verschiedenen Organe, die während der Ontogenie des weiblichen Zapfens von *Gnetum gnemon* angelegt werden (Takaso und Bouman, 1986) A-D: Längsschnitte durch einen sehr jungen Strobilus; E-H: Längsschnitte durch einen jungen Strobilus in einem späteren Entwicklungsstadium; I-L: Längsschnitt durch ein junges Ovulum; M-P: Medianer Längsschnitt durch ein fertig entwickeltes Ovulum. Der eingespiegelte Längenbalken entspricht 50 µm in A, 100 µm in E und 200 µm in M. Abkürzungen: b, Tragschuppe („bract“); c, Cupula; ca, zentrale Achse („central axis“); ie, innere Hüllstruktur („inner envelope“); me, mittlere Hüllstruktur („middle envelope“); n, Nucellus; oe: äußere Hüllstruktur („outer envelope“)

Im sehr jungen Zapfen (Abbildung 21A, Seite 57) konnte *GGM13* mRNA an den Positionen sichtbar gemacht werden, an denen in einem späteren Entwicklungsstadium die Ovula initiiert werden. Außerdem zeigt sich *GGM13*-Transkript auch noch in einer den gesamten undifferenzierten Zapfen umgebenden Zellschicht. In Abbildung 21E (Seite 57) ist *GGM13* Expression in einem ringförmigem Muster wiederum nur dort zu finden, wo sich später die Cupula entwickeln wird. In jungen, sich entwickelnden Ovula (Abbildung 21I, Seite 57) ist die *GGM13* Expression auf den Nucellus und den inneren Teil der ihn umgebenden Hüllstruktur beschränkt. In fast ausgewachsenen Ovula (Abbildung 21M) konnte *GGM13*-Transkript in der äußeren, den Nucellus umgebenden Zellschicht nachgewiesen werden. Auch im unteren Teil der inneren Hüllstruktur und in der inneren Hälfte der mittleren Hüllstruktur konnte *GGM13*-mRNA visualisiert werden. Die starke Färbung der inneren Zellschicht der äußeren Hüllstruktur könnte sich nach Vergleich mit der etwas schwächer angefärbten *sense*-Negativkontrolle als Artefakt herausstellen.

3.4.5 Expressionsmuster des B_{sister}-Gens *ZMM17*

Die *Northern blot*-Analyse in Abbildung 20 (Seite 56) zeigt, daß *ZMM17* hauptsächlich in den weiblichen Infloreszenzen von *Zea mays*, den Kolben, exprimiert wird. Schwache Expression läßt sich auch in den männlichen Infloreszenzen, den Fahnen feststellen. Wie auch bei *GGM13*, dem anderen Mitglied der B_{sister}-Subfamilie, ist jedoch in vegetativem Gewebe auch bei längerer Exposition der Autoradiographie keine Expression zu erkennen.

Genauere Untersuchungen des Expressionsmusters von *ZMM17* durch *in-situ*-Hybridisierungen zeigen, wie auch bei *GGM13*, einen sehr frühen Beginn der Expression im Maiskolben und ein Aufrechterhalten dieser Expression bis in Entwicklungsstadien, in denen die Blütenorgane schon ausdifferenziert sind.

Die Expression von *KNOTTED1 (KN1)* (Vollbrecht et al., 1991) innerhalb der Mais-Infloreszenzen unterscheidet sich in allen Entwicklungsstadien stark von der *ZMM17*-Expression (siehe Abbildung 22B, 22F und 22J, Seite 60). *KN1* ist insgesamt stärker exprimiert und kommt im Gewebe hauptsächlich in Primordien vor. Die Hybridisierungen von *ZMM17-sense*-Sonden als Negativkontrollen sind in Abbildung 22C, 22G und 22K (Seite 60) zu sehen und ergeben kein sichtbares Signal.

Im Entwicklungsstadium F (Die Entwicklungsstadien der Mais-Infloreszenz sind nach Cheng et al. (1983) definiert), ist *ZMM17*-Transkript in sämtlichen Primordien des Ährchens nachzuweisen (siehe Abbildung 22A, Seite 60). Im Entwicklungsstadium I-K in Abbildung 22E (Seite 60) zog sich die *ZMM17*-Expression in das auswachsende Karpell (Seide) und in das sich entwickelnde Ovulum zurück, während kein Transkript mehr in anderen Primordien sichtbar ist. In dem Entwicklungsstadium kurz vor Reife der Infloreszenz kann die anfängliche Expression von *ZMM17* in Ovula nicht mehr nachgewiesen werden; jedoch bleibt die Expression innerhalb des Karpells bestehen, wie Abbildung 22I (Seite 60) zeigt.

Damit zeigte *ZMM17* eine ähnliche Expression wie sein putative orthologes Gen aus *Gnetum gnemon*, *GGM13*. Beide Gene werden früh in der Entwicklung der weiblichen Infloreszenz (bzw. des Zapfens) angeschaltet und behalten diesen Zustand bis zur Ausreifung dieser Reproduktionsorgane bei. Zu diesem Expressionsmuster wurde jedoch im Angiospermen-Gen *ZMM17* eine neue Komponente hinzugefügt, nämlich die Expression im

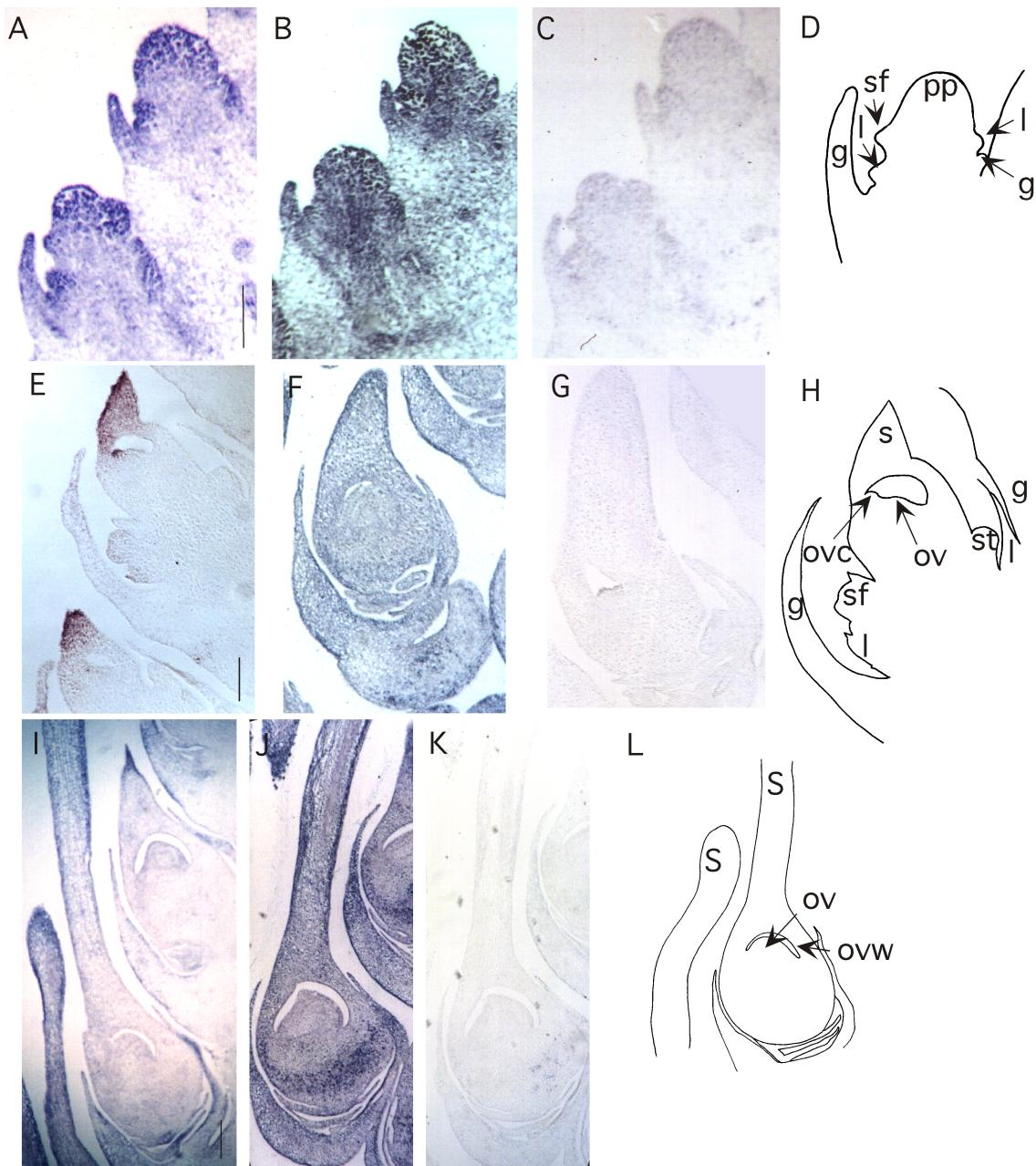


Abbildung 22: *In-situ*-Expressionsstudien der *ZMM17* und *KN1* (Positivkontrolle) mRNAs in jungen weiblichen Infloreszenzen von *Zea mays* (Maiskolben) mittels Hybridisierung mit durch Digoxigenin markierten RNA-Sonden. In A, E und I wurden *antisense*-Sonden verwendet, die das *ZMM17* Transkript nachweisen. B, F und J zeigen die Hybridisierung mit *antisense* Sonde von *KN1*, während in C, G und K die Hybridisierung mit *sense*-RNA als Negativkontrolle vorgenommen wurde. Die schematischen Zeichnungen in D, H und L verdeutlichen die verschiedenen Strukturen, die während der Entwicklung des Maiskolbens entstehen. Die Zuordnung der Schnitte zu verschiedenen Entwicklungsstadien wurde nach Cheng et al. (1983) vorgenommen. A-D: Mediane Längsschnitte durch einen Maiskolben in Entwicklungsstadium F; E-H: Längsschnitte durch ein Ährchen des Stadiums I bis K; I-L: Längsschnitt eines fast vollständig entwickelten Ährchens. Die eingespiegelten Längenbalken entsprechen in A und E 100 µm und 200 µm in I.

Abkürzungen: g, Hüllspelze („glume“); l, Lemma; ovc, Primordium des inneren Integuments („ovule coat“); oww, Karpellwand („ovule wall“); pp, Primordium des Pistills; sf, Primordium der sterilen Blüte („sterile flower“: untere Blüte, die abortiert wird); s, Seide (Karpell); st, Primordium des Stamens der fertilen oberen Blüte, das später abortiert wird.

Karpell, das bekanntlich in Gymnospermen nicht vorhanden ist und eine Autapomorphie der Angiospermen darstellt. Damit scheinen *B_{sister}*-Gene nicht nur in der Ovula-, sondern auch in der Karpellentwicklung von Angiospermen eine Rolle zu spielen.

Um das Ergebnis der *Northern*-Analyse besser interpretieren zu können, wurde auch die Expression von *ZMM17* in der Fahne durch *in-situ*-Hybridisierungen analysiert (siehe Abbildung 23). Die Expression von *ZMM17* ist in der männlichen Infloreszenz im Vergleich zum Maiskolben schwächer, durchläuft aber auch hier alle bisher analysierten Entwicklungsstadien.

Wie auch bei den *in-situ*-Hybridisierungen des Maiskolbens kann in der Kontrollhybridisierung von *KN1-antisense*-Sonden ein völlig anderes Expressionsmuster als bei *ZMM17-antisense*-Hybridisierung gezeigt werden. Die Negativkontrolle der *ZMM17-sense*-Hybridisierung lässt ebenfalls Signale erkennen, die aber im Vergleich zu den Hybridisierungen mit *antisense*-RNA schwächer sind.

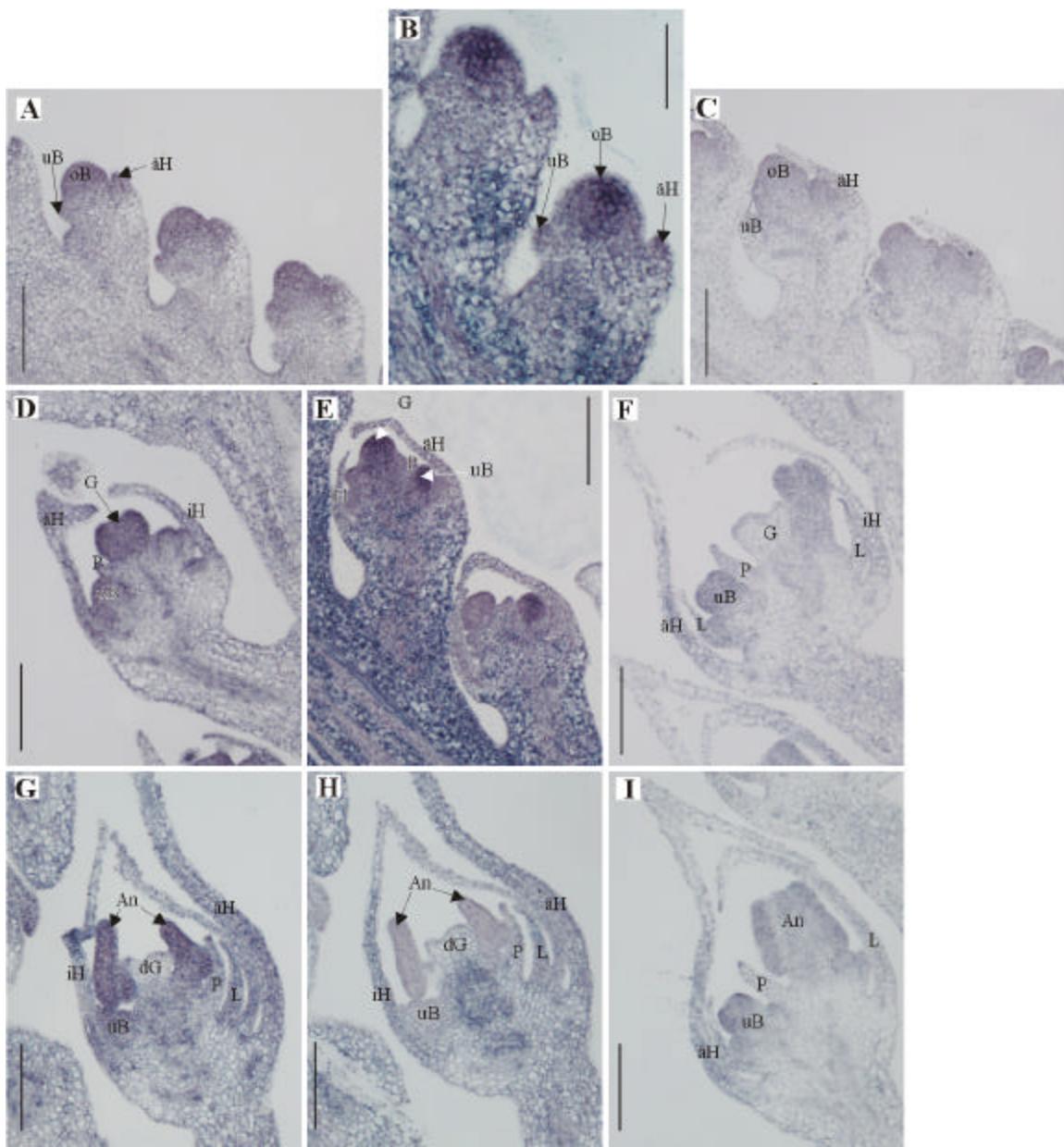


Abbildung 23: *In-situ*-Hybridisierungen von Digoxigenin-markierten *ZMM17* und *KN1* (Positivkontrolle) RNA Sonden auf männlichen Infloreszenzen von *Zea mays*. A, D und E wurden mit *ZMM17-antisense*-Sonden hybridisiert, die *ZMM17*-mRNA detektieren. B, E und H wurden mit *KN1-antisense*-Sonden (Positivkontrolle) überschichtet und C, F und I mit *ZMM17-sense*-Sonden als Negativkontrolle. A, B und C stellen Längsschnitte männlicher Mais-Infloreszenzen im Entwicklungsstadium D dar; D, E und F zeigt einen Ährchenlängsschnitt in Stadium F; die längsgeschnittenen Ährchen in G, H und I befinden sich in Entwicklungsstadium I-J. Das Einordnen der Strukturen innerhalb der Mais-Infloreszenz in verschiedene Entwicklungsstadien wurde nach Cheng et al. (1983) vorgenommen. Die eingezeichneten Größenbalken entsprechen in B 200 µm und in allen anderen Darstellungen 100 µm.

Abkürzungen: An, Anthere; äH: äußere Hüllspelze; dG: degenerierendes Gynöceum; G, Gynöceum; iH: innere Hüllspelze; L: Lemma; P: Palea; oB: oberes Blütchen; uB: unteres Blütchen

Die in Abbildung 23A (Seite 62) gezeigten Schnitte lassen eine *ZMM17* Expression im oberen Teil der oberen Blüteprimordien ebenso wie in den Primordien des unteren Blütchens und der äußeren Hüllspelze erkennen. In diesem Entwicklungstadium ähneln sich die Blütchenstrukturen der männlichen und weiblichen (siehe Abbildung 23A, Seite 62) Infloreszenz sehr und das Expressionsmuster von *ZMM17* in beiden Ährchentypen unterscheidet sich kaum. Das Entwicklungsstadium F in Abbildung 23D (Seite 62) zeigt eine starke Expression im sich noch entwickelnden Gynöceum der oberen Büte. Eine schwächere *ZMM17* Expression kann auch in den Primordien des unteren Blütchens und der Palea festgestellt werden. Jedoch kann das Signal innerhalb der beiden Hüllspelzen nicht als authentisch angesehen werden, da auch eine schwache Färbung der Hüllspelzen in der *sense*-Negativkontrolle zu sehen ist. Das älteste analysierte Entwicklungsstadium der Maisfahne, I-J, ist in Abbildung 23G dargestellt. Erkennbare *ZMM17*-Hybridisierung fand nur in den Antheren statt. Auf dieser Entwicklungsstufe ist die Degeneration des Gynöceums schon fortgeschritten und es konnte dort auch keine *ZMM17*-mRNA mehr nachgewiesen werden. Auch innerhalb dieses Stadiums kann man in den *sense*-Negativkontrollen eine blaue Digoxigenin-Färbung erkennen, so daß die Signale im unteren Blütchen, in der Hüllspelze und im Lemma artefaktisch sind. Aufgrund von Materialbeschaffungsproblemen konnten spätere Entwicklungsstadien der Maisfahne leider nicht analysiert werden und deshalb keine

Aussage darüber getroffen werden, ob die recht schwache Expression von *ZMM17* in den Antheren bis zu deren Reife anhält oder aber vorher beendet wird.

3.5 Aufklärung der Exon/Intron-Struktur von *GGM13* und *ZMM17*

Mittels PCR-Technik wurde der genomische Locus von *ZMM17* (Sequenz siehe Anhang K) identifiziert, indem die Primer so gelegt wurden, daß intronüberspannende Bereiche amplifiziert werden konnten.

Die Exon/Intron-Struktur von *ZMM17* besteht aus 6 Exons und 7 Introns und ist, wie aus Abbildung 24 (Seite 65) ersichtlich, in ihrem Aufbau sehr ähnlich der anderer Angiospermen MADS-Box-Gene (Schwarz-Sommer et al., 1992; Theißen et al., 1995). Sämtliche identifizierten Introns zeigen ein GU am 5'-Donor- und ein AG am 3'-Akzeptor Ende, welche die Spleißosomen als Introngrenzen erkennen und die zum Ausschneiden der Introns führen (Luehrsen et al., 1994). Die innerhalb der codierenden Region liegenden Introns weisen eine Durchschnittslänge von 329 Bp auf, was in der Größenordnung pflanzlicher Introns liegt. Die *ZMM17*-Introns weisen außerdem im Vergleich zu den Exons einen relativ hohen A+T-Gehalt auf, was ebenfalls zur Definition von Exon/Intron-Grenzen beiträgt (Luehrsen et al., 1994).

Die 3'-UTR-Region und die MADS-Domäne liegen bei *ZMM17* auf dem ersten Exon, die I-, K- und C-Domäne und das 5'-UTR sind auf die restlichen Exons verteilt. Das zweite Exon fängt innerhalb eines Codons an. Eine Besonderheit des genomischen Locus von *ZMM17* ist das 162 Bp große Exon 3, das möglicherweise durch Fusion zweier Exons zustande gekommen ist. Im genomischen Locus von *AGAMOUS* finden sich an gleicher Stelle zwei Exons mit je 62 Bp und 100 Bp. Das erste Exon geht mit 188 codierenden Basenpaaren acht Basenpaare über die MADS-Box hinaus. Wie bei den meisten anderen genomischen Loci von pflanzlichen MADS-Box-Genen wird die MADS-Box durch das erste Intron von den anderen Domänen abgetrennt.

Exons fünf und sechs, die in B-Funktionsgenen unterschiedliche Größen haben, sind in *B_{sister}*-Genen in ihrer wahrscheinlich ursprünglichen Größe, nämlich je 42 Bp, erhalten geblieben.

Die genomische Struktur von *GGM13* (Sequenz siehe Anhang L) wurde auf gleiche Weise determiniert wie die von *ZMM17*. Jedoch fehlen noch Daten über die Länge und Sequenz der ersten beiden Exons und Introns. Mit der Ausnahme des Introns 4 weisen alle sämtliche Introns die für *ZMM17* beschriebenen typischen 5'-Donor- und 3'-Akzeptor-Seiten.

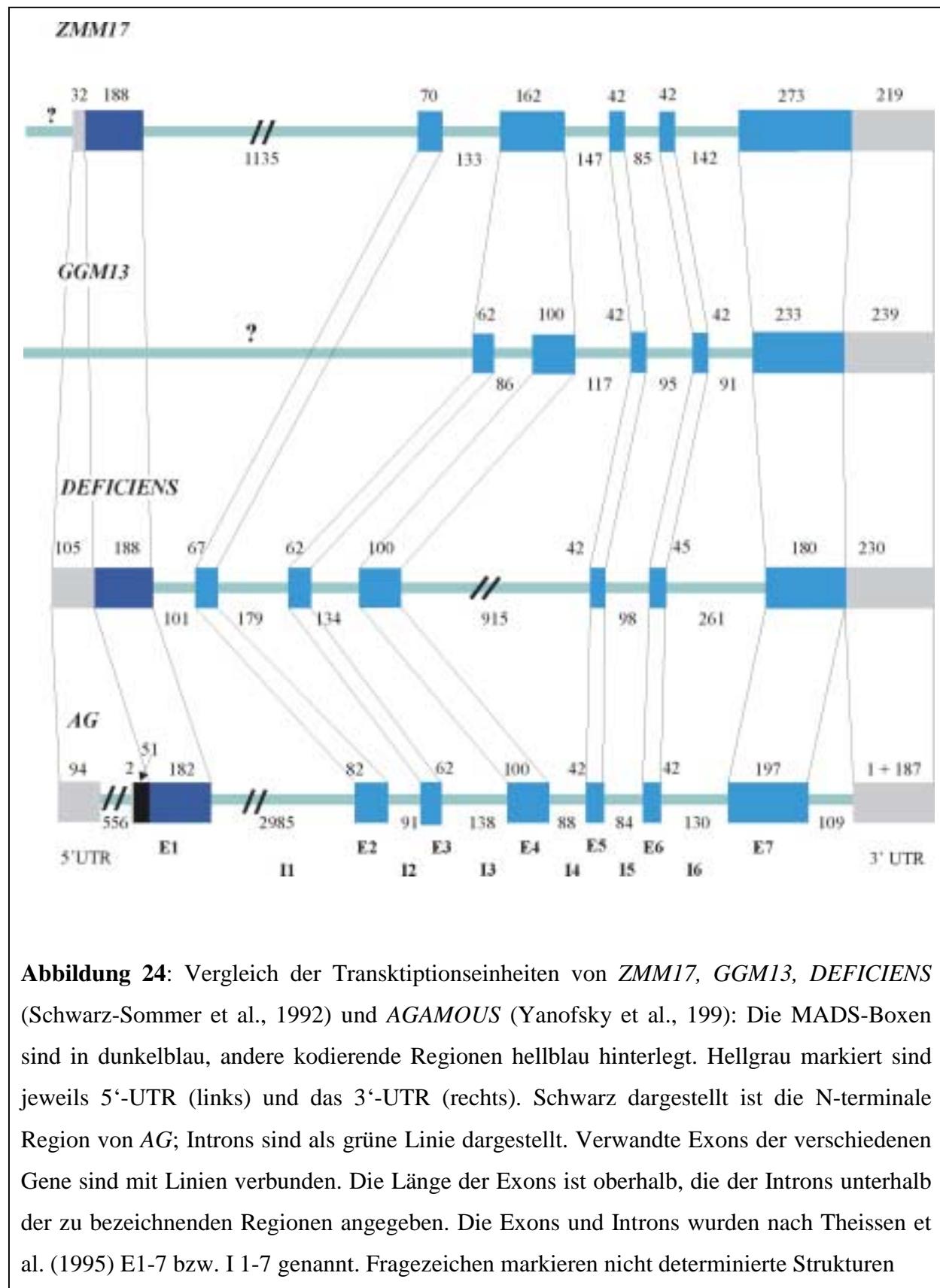


Abbildung 24: Vergleich der Transkriptionseinheiten von *ZMM17*, *GGM13*, *DEFICIENS* (Schwarz-Sommer et al., 1992) und *AGAMOUS* (Yanofsky et al., 1999): Die MADS-Boxen sind in dunkelblau, andere kodierende Regionen hellblau hinterlegt. Hellgrau markiert sind jeweils 5'-UTR (links) und das 3'-UTR (rechts). Schwarz dargestellt ist die N-terminale Region von *AG*; Introns sind als grüne Linie dargestellt. Verwandte Exons der verschiedenen Gene sind mit Linien verbunden. Die Länge der Exons ist oberhalb, die der Introns unterhalb der zu bezeichnenden Regionen angegeben. Die Exons und Introns wurden nach Theissen et al. (1995) E1-7 bzw. I 1-7 genannt. Fragezeichen markieren nicht determinierte Strukturen

auf. Ebenso wie die *ZMM17*-Exons zeigen auch die Exons von *GGM13* einen im Vergleich mit den Introns viel höheren A/T-Gehalt.

Wie die genomischen Loci von *DEF* und *ZMM17* zeigt auch *GGM13* vor dem 3'-UTR kein Intron. Die Exons 5 und 6 haben beide eine Länge von 42 Bp, was für MADS-Box Gene mit Ausnahme der B-Funktionsgene, bei denen diese Exons unterschiedliche Längen aufweisen können, typisch ist. Exons 4 und 5 sind bei *GGM13* wie bei *DEF* und *AG* separiert, was die Vermutung nahelegt, daß es sich bei dem fusionierten Exon 4/5 von *ZMM17* um einen abgeleiteten Zustand handelt.

3.6 Analyse des putativen *GGM13*-Promotors

Die Anwendung der RAGE-PCR (*Rapid Amplification of Genomic Ends*) erlaubte die Isolierung eines ca. 1,5 kBp großen Promotorfragments stromaufwärts des längsten, durch 5'-RACE-Klonierung bekannten 5'-UTR-Region von *GGM13* (Sequenz siehe Anhang O).

Zur Suche nach TATA-Boxen wurde das Sequenzanalyse-Teilprogramm von MacVector verwendet. Dabei stellte sich heraus, daß die Promotorsequenz drei putative TATA-Boxen beinhaltet, die bei - 680 (TATTATA), - 882 (TATTAAT) und -1209 (TATTTAA) starten. Dabei liegt keine dieser Boxen im erwarteten Bereich von ca. 30 Bp vor dem putativen Transkriptionsstart (Joshi, 1987a). Dieses Ergebnis könnte daraufhin deuten, daß das 5'-Ende des 5'-UTR noch nicht erreicht ist und ca. 30 Bp hinter der letzten TATA-Box bei ca. - 650 liegen könnte.

Eine CArG-Box (Davies und Schwarz-Sommer, 1994; Hill et al., 1998), die in vielen Promotoren von MADS-Box-Genen vorkommt, konnte in der putativen Promotor-Sequenz von *GGM13* nicht gefunden werden.

Für eine mögliche Aktivierung von *GGM13* durch ein *LEAFY*-Homolog aus *Gnetum* (für den aktuellsten Überblick über die *LEAFY* aus *A. thaliana* siehe Ng und Yanofsky, 2000) spricht das Vorhandensein einer putativen *LEAFY*-Bindestelle zwischen - 1172 und - 1167 mit der Sequenz CCATGG, deren Kernsequenz exakt mit der *LEAFY*-Bindestelle im *AGAMOUS*-Promotor übereinstimmt (Busch et al., 1999). Möglicherweise aktiviert das *LFY*-Homolog *GGM13* in *Gnetum* genauso direkt wie *AGAMOUS* in *Arabidopsis*.

4. Diskussion

4.1 Diversität der MADS-Box-Gene in *Gnetum gnemon*

In dieser Arbeit wurden zehn verschiedene MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon* isoliert (*GGM10-GGM19*) und in unterschiedlichem Umfang charakterisiert. Zusammen mit den neun von Kai-Uwe Winter analysierten MADS-Box-Genen (Winter, 97; Winter et al., 1999) zählt die MADS-Box-Genfamilie in *Gnetum gnemon* somit mindestens 19 Mitglieder. Nicht stringente *Southern*-Hybridisierungs-Experimente weisen allerdings darauf hin, daß *Gnetum gnemon* noch mehr MADS-Box-Gene als die bisher isolierten enthält. Diese bisher isolierten Gene liegen, wie *Southern*-Hybridisierungs-Experimente zeigen, mit Ausnahme von *GGM18* alle als *single-copy*-Gene vor. Daß die MADS-Box-Genfamilie auch in anderen Gymnospermen zahlreiche Mitglieder hat, zeigt auch die PCR-Klonierung von 61 Bp-Fragmenten von 27 verschiedenen MADS-Box-Genen aus *Picea mariana* (Rutledge et al., 1998). Die MADS-Box-Genfamilie in Gymnospermen ähnelt, wie von beiden Arbeiten unterstützt wird, in ihrer Komplexität somit der MADS-Box-Genfamilie der Angiospermen.

Im Gegensatz zur Arbeit von Rutledge et al. (1998) liegen die isolierten MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon* jedoch fast alle als Vollängen-cDNAs vor und können deshalb in Phylogenierekonstruktionen analysiert werden. Phylogenetische Analysen ergeben, daß die 19 *Gnetum gnemon*-MADS-Box-Gene in 16 verschiedene Subfamilien fallen. Einige dieser Subfamilien sind aus Angiospermen bekannt; so gehört *GGM1* (Winter et al., 1999) zur Familie der *TM3*-ähnlichen Gene, *GGM2* (Winter et al., 1999) zu den *DEF/GLO*-ähnlichen Genen, *GGM3* (Winter et al., 1999) zu den *AG*-ähnlichen Genen, *GGM9* (Winter et al., 1999) und *GGM11* zu den *AGL6*-ähnlichen Genen und *GGM12* zu den *STMADS11*-ähnlichen Genen. *GGM13* wiederum bildet zusammen mit dem *Zea mays*-Gen *ZMM17* und dem erst kürzlich isolierten Gen *AP3-2* aus *Asarum europaeum* eine neue Subfamilie, die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben wird.

GGM4 (Winter et al., 1999), *GGM8* (Winter et al., 1999) und *GGM14* fallen mit einer *bootstrap*-Unterstützung von 99 % in die Subfamilie der *GGM4*-ähnlichen Gene, eine Subfamilie, aus der noch kein Vertreter aus Angiospermen bekannt ist. Auch die Subfamilie der *GGM15*-ähnlichen Gene umfaßt neben *GGM15* bislang nur das aus *Picea abies* isolierte *DAL12* (Sundström et al., 1999). *GGM5* (Winter et al., 1999), *GGM6* (Winter et al., 1999), *GGM7* (Winter et al., 1999), *GGM10*, *GGM16*, *GGM17* und *GGM19* können zu diesem

Zeitpunkt keiner Subfamilie zugeordnet werden. Die *bootstrap*-Werte der Knoten, die sie mit anderen Gymnospermen- oder Angiospermen-MADS-Box-Genen verbinden, sind allesamt kleiner als 50 %. Möglicherweise sind diese Gene Gymnospermen- oder gar *Gnetum*-spezifisch, denkbar wäre aber auch, daß Angiospermen-Orthologe von diesen Genen existieren, aber bisher noch nicht isoliert worden sind. Jedoch könnte die komplette Sequenzierung einiger Angiospermen-Genome diese Vermutungen bestätigen. Teile der oben aufgeführten Phylogenierekonstruktion stehen im Gegensatz zu Becker et al. (2000), in der *GGM5* mit *GGM17* eine Subfamilie mit 57 %-iger *bootstrap*-Unterstützung bilden. Allerdings ist dieser Wert recht niedrig und reicht für eine stabile Gruppierung dieser beiden Gene in eine Subfamilie nicht aus, um mit einer anderen Auswahl an MADS-Box-Genen in Phylogenierekonstruktionen reproduziert zu werden. Auch *GGM1*, das in Winter et al. (1999) mit 88 %-iger und in Becker et al. (2000) mit 71 %-iger *bootstrap*-Unterstützung in die Familie der *TM3*-ähnlichen Gene fällt, konnte in dieser Arbeit nicht in diese Subfamilie eingeordnet werden. Möglicherweise spiegelt auch dieses Ergebnis die Abhängigkeit der Topologie der Phylogenierekonstruktionen von der Auswahl der Taxa wider. Alle anderen, in Winter et al. (1999) und Becker et al. (2000) beschriebenen Subfamilien, lassen sich auch in der hier gezeigten Phylogenierekonstruktion (Abbildung 8, Seite 36) wiederfinden.

Die Expressionsmuster der isolierten MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon* sind sehr divers (siehe Abbildung 17, Seite 50). Nur zwei Gene, *GGM12* und *GGM19*, werden stärker in Blättern als in den Reproduktionseinheiten exprimiert. Alle übrigen Gene werden stärker in reproduktivem Gewebe exprimiert. *GGM13* ist das einzige bisher gefundene *Gnetum*-MADS-Box-Gen, das nur in weiblichen Reproduktionseinheiten exprimiert wird. Dagegen sind *GGM2* (Winter et al., 1999), *GGM6* (Becker et al., 2000), *GGM15*, *GGM16* und *GGM18* nur in männlichen Reproduktionseinheiten angeschaltet. *GGM4* (Becker et al., 2000), *GGM7* (Becker et al., 2000), *GGM11* und *GGM14* werden stärker in weiblichen als in männlichen Reproduktionseinheiten exprimiert. *GGM3* (Winter et al., 1999), *GGM8* und *GGM9* werden gleich stark in männlichen und weiblichen Reproduktionseinheiten exprimiert. Nur *GGM1* (Winter et al., 1999) wird ubiquitär in Blättern, männlichen und weiblichen Reproduktionseinheiten angeschaltet. Die nur sehr begrenzte Auswahl an Organen, die zur *Northern*-Analyse zur Verfügung stand, erklärt möglicherweise die Abwesenheit von Expressionssignalen der Gene *GGM10* und *GGM17* ebenso wie deren eventuell sehr schwache Expression. Es könnten so aber auch andere interessante Expressionsorte der übrigen MADS-Box-Gene unerkannt geblieben sein.

Die MADS-Box-Genfamilie in *Gnetum gnemon* besitzt eine große Komplexität in Bezug auf Anzahl der Gene, deren vielfältige Expressionsmuster und ihre möglicherweise sehr unterschiedlichen Funktionen. Das Vorhandensein von Genen wie z. B. *GGM18*, das zu einer MADS-Box-Gen-Subfamilie gehört, in der es keinen bekannten Angiospermen-Vertreter gibt, könnte ein Indiz für neue, in Angiospermen noch nicht beschriebene Genfunktionen von MADS-Box-Genen sein. Der Focus dieser Arbeit, nämlich die Analyse von *Gnetum*-MADS-Box-Genen aus weniger bekannten Subfamilien wie *AGL6*-, *GGM13*- und *STMADS11*-ähnlichen Genen hingegen kann neben der weiteren Klärung der Funktion dieser Subfamilien auch dazu beitragen, ihre Rolle während der Evolution der Samenpflanzen besser zu verstehen. Besonders, da Subfamilien, die Angiospermen- und Gymnospermen-Vertreter aufweisen, schon im letzten gemeinsamen Vorfahren von rezenten Angiospermen und Gymnospermen vorhanden waren und somit vor 300 – 400 Millionen Jahren entstanden sein müssen.

4.2 Rekonstruktion der Anzahl von MADS-Box-Genen im letzten gemeinsamen Vorfahren der Angiospermen und Gymnospermen

MADS-Box-Gene wurden bisher aus Farnen (Münster et al., 1997), *Lycopodium annotinum* (Svensson et al., 2000), Koniferen (Tandre et al., 1995; Tandre et al., 1998; Mouradov et al., 1998; Rutledge et al., 1998; Walden et al., 1998), Gnetales (Winter et al., 1999; Becker et al., 2000), *Ginkgo* (Winter et al., 1999, Hasebe, 1999) und einer Vielzahl von Angiospermen (zur Übersicht siehe Theißen et al., 2000) isoliert. Nach Münster et al. (1997) hatten der letzte gemeinsame Vorfahre der Farne und Samenpflanzen schon mindestens zwei verschiedene MADS-Box-Gene vom MIKC-Typ. Nach Theißen et al. (2000) umfaßt die MADS-Box-Genfamilie in Angiospermen mindestens 12 verschiedene Subfamilien (*AG*-, *AGL*-2, *AGL*-6, *AGL*1-2, *AGL*15-, *AGL*17-, *DEF*-, *GGM*13-, *GLO*-, *SQUA*-, *TM3*- und *TM8*-ähnliche Gene). Hinzu kommen noch nach derzeitigem Kenntnisstand die *STMADS11*-Subfamilie (Carmona et al., 1998) und *FLC* (Sheldon et al., 2000), zu dem noch kein orthologes Gen veröffentlicht wurde. Der letzte gemeinsame Vorfahre von Angiospermen und Gymnospermen, der vor ca. 300 Millionen Jahren existierte (Goremykin et al., 1997), muß mit einem minimalen Satz von MADS-Box-Genen ausgestattet gewesen sein, der aus Subfamilien mit Angiospermen- und Gymnospermen-Vertretern bestand.

In dieser Arbeit können fünf MADS-Box-Gen-Subfamilien gezeigt werden, die Gymnospermen- und Angiospermen-Mitglieder aufweisen. Innerhalb der *AG*-Subfamilie (C-Funktionsgene der Angiospermen), liegen mit 100 % *bootstrap*-Unterstützung *GGM3* aus *Gnetum gnemon* (Winter et al., 1999), *DAL2* aus *Picea abies* (Tandre et al., 1995) und *SAG1* aus *Picea mariana* (Rutledge et al., 1998). *GGM13* aus *Gnetum*, *ZMM17* aus Mais und *AP3-2* aus *Asarum* bilden eine weitere Subfamilie mit einem *bootstrap*-Wert von 100 %. Einen immer noch recht hohen *bootstrap*-Wert von 88 % weist die *AGL6*-Subfamilie auf. Sie ist die

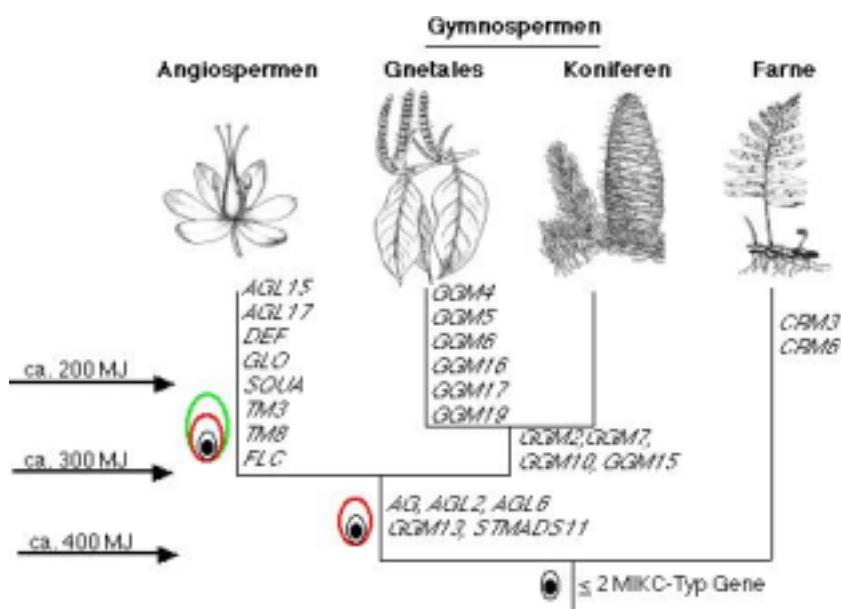


Abbildung 25: Ursprung der MADS-Box-Genfamilien während der Evolution der Gefäßpflanzen. Hier ist ein phylogenetischer Baum einiger Hauptgruppen der Gefäßpflanzen gezeigt. Das Alter der Verzweigungen, in Millionen Jahren (MJ) angegeben, beruht auf groben Schätzungen anhand von molekularen Daten. Links von der Wurzel und einigen Ästen sind die drei wichtigen Stadien der Evolution des Megasporangiums dargestellt (von unten nach oben): Ein Sporangium, das nicht von einem Integument umhüllt wird, ein Zustand, der immer noch in Farnen zu finden ist; ein Sporangium, das von einem Integument umschlossen wird (Ovulum, in rot dargestellt); ein Sporangium, das zusätzlich von einem Karpell (grün) umgeben ist. Die Gennamen neben den Ästen benennen Subfamilien, nicht einzelne Gene. Diese sind spätestens während der Zeitspanne entstanden, die von den entsprechenden Ästen des phylogenetischen Baums repräsentiert wird. “2 \leq MIKC-Typ“ Gene symbolisiert, daß der letzte gemeinsame Vorfahre der Farne und Samenpflanzen mindestens 2 MIKC-Typ MADS-Box-Gene besessen hat (Münster et al., 1997).

Subfamilie mit dem bisher höchsten Anteil an Gymnospermen-Genen, und umfaßt Vertreter aus *Gnetum* (*GGM9*, Winter et al., 1999; und *GGM11*), *Ginkgo biloba* (*GBM1*, Winter et al., 1999; Hasebe, 1999) *Picea abies* (*DAL1*, Tandre et al., 1995) und *Pinus radiata* (*PRMADS2* und *PRMADS3*, Mouradov et al., 1998). Die *STMADS11*-Subfamilie wird nur mit einem moderaten *bootstrap*-Wert von 62 % unterstützt und ihr einziges Gymnospermen-Mitglied ist *GGM12*.

Die fünfte MADS-Box-Gen-Subfamilie, die neben den Angiospermen-Genen auch einen Vertreter der Gymnospermen enthält, nämlich *PRMADS1* aus *Pinus radiata* (Mouradov et al., 1998), ist die der *AGL2*-ähnlichen Gene. *PRMADS1* liegt inmitten der Angiospermen Gene und nicht, wie für die meisten anderen Gymnospermen-MADS-Box-Gene beschrieben, ancestral zu den Angiospermen-Genen der gleichen Subfamilie. Auch die *AGL2*-Subfamilie wird durch einen hohen *bootstrap*-Wert von 99 % unterstützt.

Das Vorhandensein der in Winter et al. (1999) und Becker et al. (2000) beschriebenen Subfamilie der *TM3*-ähnlichen Gene kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die dafür Ausschlag gebenden Gründe sind bereits in Kapitel 4.1 genannt. Auch die Topologie der in Winter et al. (1999) ausführlich beschriebenen und in Becker et al. (2000) bestätigten Phylogenierekonstruktion in Bezug zu B-Funktionsgene (*DEF*, *GLO* aus Angiospermen und *DEF/GLO* aus Gymnospermen) ist in dieser Arbeit verändert. Die *DEF/GLO*-ähnlichen Gymnospermen-Genen zweigen in beiden Publikationen ancestral zu den Angiospermen-B-Funktionsgenen ab, in Winter et al. (1999) jedoch mit recht niedriger *bootstrap*-Unterstützung. In dieser Arbeit liegen die *DEF/GLO*-Gene innerhalb der Angiospermen-B-Funktionsgene und näher an der *GLO*-Subfamilie. Allerdings liegen die *bootstrap*-Werte für jeden einzelnen Knoten unter 50 % und bestätigen somit diese Topologie nur sehr schwach.

Setzt man die Monophylie der Gymnospermen voraus, kann aus den vorgelegten Daten geschlossen werden, daß der gemeinsame Vorfahre von Angiospermen und Gymnospermen mindestens fünf verschiedene MADS-Box-Gene besessen hat, nämlich die von einander unterschiedlichen Genfamilien *AG*, *AGL2*, *AGL6*, *GGM13* und *STMADS11*. Mitglieder von all diesen Genfamilien können daher auch in anderen Gymnospermen wie Koniferen, *Ginkgo* und Cycadaceen, sowie in sämtlichen Angiospermen erwartet werden. Allerdings kann die Möglichkeit nicht außer Betracht gelassen werden, daß einige Genlinien während der Evolution verloren gegangen sind. Das bedeutet einerseits, daß einige dieser fünf MADS-Box-Genlinien möglicherweise nicht in allen Samenpflanzen gefunden werden und ihre Funktion dort eventuell von anderen Genen übernommen wurde. Andererseits könnte durch den Verlust von Genen auch erklärt werden, warum ein Teil der Subfamilien (z. B. *AGL15*,

AGL17, *FLC* aus Angiospermen und *GGM4* aus Gymnospermen) nur Vertreter von entweder Angiospermen oder Gymnospermen enthalten. Falls innerhalb dieser Subfamilien die Mitglieder entweder der Gymnospermen oder aber der Angiospermen verloren gegangen wären, was allerdings nur sehr schwer nachweisbar ist, müßte die Zahl der MADS-Box-Genlinien des letzten gemeinsamen Vorfahren von Gymnospermen und Angiospermen bedeutend höher eingeschätzt werden.

Die minimale Zahl der MADS-Box-Gene des Vorläufers extanter Gefäßpflanzen wird in Münster et al. (1997) mit zwei angegeben. In der Zeit von vor ca. 400 und 300 Millionen Jahren (Stewart und Rothwell, 1993) hat sich die Zahl der MADS-Box-Gene des gemeinsamen Vorläufers der rezenten Angiospermen und Gymnospermen von mindestens zwei auf mindestens fünf erhöht. Innerhalb dieser 100 Millionen Jahre entstanden Samenpflanzen aus Progymnospermen. Die sich in dieser Zeit entwickelnden evolutiven Neuerungen innerhalb der Linie, die zu den rezenten Samenpflanzen führte, wie z.B. Heterosporie oder Ovula, könnten in engem Zusammenhang mit der an Komplexität zunehmenden MADS-Box-Genfamilie stehen.

Den Daten dieser Arbeit zufolge spalteten sich die Vorläufer der paralogen *GGM*-Gene (*GGM2*, *3*, *6*, *11*, *12*, und *13*) vor mehr als 300 Millionen Jahren auf, was zumindest zum Teil die große Diversität der rezenten *GGM*-Proteine in der I- und C-Domäne erklärt.

4.3 *GGM9* und *GGM11* spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Reproduktionseinheiten

GGM9 (Winter et al., 1999) und *GGM11* sind Gnetales-Vertreter der *AGL6*-Subfamilie. Zusammen mit *DAL1* aus *Picea abies* (Tandre et al., 1995), *PRMADS2* und *PRMADS3* aus *Pinus radiata* (Mouradov et al., 1998) und *GBM1* aus *Ginkgo biloba* (Winter et al., 1999) bilden sie innerhalb der *AGL6*-Subfamilie eine eigene Gymnospermen-Untergruppe, die mit 87 % *bootstrap*-Wert unterstützt wird. Der Topologie des Stammbaums zufolge ist *GGM11* näher mit *PRMADS2* und *GBM1* verwandt (*bootstrap*-Wert: 76 %) als mit *DAL1* und *PRMADS3*; *GGM9* steht an ancestraler Position innerhalb der Gymnospermen-Untergruppe der *AGL6*-ähnlichen Gene. Die Untergruppe der Angiospermen, die in der hier gezeigten Phylogenierekonstruktion (Abbildung 8) aus *AGL6* und *AGL13* (beide aus *Arabidopsis thaliana*; Ma et al., 1991) und *ZAG3* aus *Zea* (Mena et al., 1995) besteht, ist mit 78 %

bootstrap-Unterstützung abgesichert. Angiospermen- und Gymnospermen-Gene werden wiederum mit 88 % *bootstrap*-Unterstützung zusammengefaßt, was die Monophylie der Gymnospermen unterstützt.

Bis auf *GBM1* aus *Ginkgo* (Winter et al., 1999) sind die Expressionsmuster aller *AGL6*-ähnlichen Gene aus Gymnospermen und Angiospermen bekannt. Expression von *AGL6* aus *Arabidopsis thaliana* ist bisher nur in Blüten detektiert worden (Ma et al., 1991)

AGL13, das paraloge Gen zu *AGL6*, ist am stärksten in den Schötchen von *Arabidopsis* und etwas schwächer in Keimlingen, Infloreszenzen und Blättern exprimiert. *In-situ*-Analysen zeigten, daß *AGL13* in einer kleinen Gruppe von Zellen innerhalb der Ovule exprimiert wird, und zwar nur kurz bevor ein sichtbar vom Embryosack unterschiedliches Endothelium um den Embryosack gebildet wird (Rounsley et al., 1995).

ZAG3 aus *Zea mays* wird ebenfalls Blüten-spezifisch exprimiert und ist zwar in Karpellen, nicht jedoch in Stamina nachweisbar (Mena et al., 1995).

PRMADS3 aus *Pinus radiata* (Mouradov et al., 1998; Mouradov et al., 1999) ist hauptsächlich in weiblichen und etwas schwächer in männlichen Reproduktionseinheiten exprimiert, es konnte aber auch in vegetativen Knospen und ausgewachsenen Nadeln Expression auf niedrigem Niveau festgestellt werden. In weiblichen Expressionseinheiten ist das Signal hauptsächlich auf das Primordium der Samenschuppe beschränkt und in männlichen Reproduktionseinheiten kann *PRMADS3*-Transkript in einer Gruppe von Zellen nachgewiesen werden, die sporogene Zellen bildet, in Pollenmutterzellen und im Tapetum (Mouradov et al., 1999). Das zu *PRMADS3* orthologe Gen aus *Picea abies*, *DAL1* ist gleichmäßig stark in männlichen und weiblichen Zapfen und auch, wie *PRMADS3*, im vegetativen Sproß exprimiert.

Die zweite Gruppe (*bootstrap*-Wert: 76 %) innerhalb der *AGL6*-ähnlichen Gene, zu denen *GBM1*, *PRMADS2* und auch *GGM11* aus *Gnetum* gehören, sind, soweit bisher untersucht, nur in Reproduktionseinheiten exprimiert und nicht, wie ihre Schwestergruppe, auch in vegetativen Sprossen. Sowohl *GGM11* als auch *PRMADS2* werden stärker in weiblichen Reproduktionseinheiten exprimiert als in männlichen. *PRMADS2* aus *Pinus radiata* (Mouradov et al., 1998; Mouradov et al., 1999) kann am stärksten in Ovula-Primordien nachgewiesen werden, aber auch in früheren Stadien, in denen sich die Samenschuppe entwickelt. Das Expressionssignal der *GGM11*-mRNA in männlichen Reproduktionseinheiten von *Gnetum gnemon* (siehe Abbildung 19, Seite 54) ist, ebenso wie das *PRMADS2*-Signal, in den Primordien der sterilen Ovula in recht späten Stadien nachweisbar. Auch *PRMADS2*-Transkript kann in späten Stadien der Ovula-Entwicklung detektiert werden. Außerdem kann

gezeigt werden, daß *GGM11* auch während der Antherophoren-Entwicklung in einer breiten Zeitspanne angeschaltet ist und die Expression bis in späte Stadien anhält. Möglicherweise führt diese Gruppe der *AGL6*-ähnlichen Gene wichtige Funktionen in den späteren Entwicklungsphasen der Ovula aus. Wegen der teilweise überlappenden Expressionsmuster von *GGM3* (Winter et al., 1999), *GGM9*, *GGM11* (beide siehe Abbildung 17, Seite 50) und *GGM13* (siehe Abbildung 20, Seite 56) könnten die von diesen Genen codierten Proteine zusammen als Mitglieder eines Proteinkomplexes die Ovulaentwicklung beeinflussen.

GGM9 zeigt im *Northern*-Experiment (Winter et al., 1999) keinerlei Expression in Blättern, dafür aber eine gleich starke Expression in männlichen und weiblichen Reproduktionseinheiten von *Gnetum gnemon*. Die *in situ*-Hybridisierungen (siehe Abbildung 19, Seite 54) zeigen eine weitere räumliche Ausdehnung des *GGM9*-Transkripts als des *GGM11*-Transkripts und die Expression geht in späten Stadien der Antherophoren-Entwicklung zurück. Wie *GGM11* wird auch *GGM9* nicht in sporogenem Gewebe exprimiert. Demnach könnte *GGM9* in einen Mechanismus involviert sein, der in früheren Stadien der Entwicklung von Reproduktionseinheiten seine Wirkung zeigt. In zwei verschiedenen zeitlichen Rahmen (*GGM9* früher und *GGM11* später) könnten diese beiden *AGL6*-ähnlichen Gene in die Etablierung und Erhaltung von männlichen und weiblichen Reproduktionseinheiten involviert sein, wobei *GGM11* aufgrund seiner stärkeren Expression in weiblichen Reproduktionseinheiten wahrscheinlich auch eine größere Rolle in weiblichen als in männlichen Reproduktionseinheiten spielt.

Aus den Expressionsmustern der *AGL6*-ähnliche Gene in Angiospermen, wie z. B. *AGL13*, kann geschlossen werden, daß sie genau so wie deren putative Orthologe aus Gymnospermen Funktionen in räumlich eng begrenzten Bereichen innerhalb der Ovula ausüben. Möglicherweise hat sich die Aufgabe der *AGL6*-ähnlichen Gene im Laufe der Evolution nicht sehr stark verändert. *DEF/GLO*-ähnliche Gene in Gymnospermen z.B. spezifizieren höchstwahrscheinlich zusammen mit C-Funktionsgenen die Identität der männlichen Reproduktionseinheiten (Winter et al., 1999; Theissen et al., 2000) während die orthologen Gene aus Angiospermen während der Evolution eine Funktionserweiterung erfahren haben. Sie legen zwar immer noch zusammen mit C-Funktionsgenen die Organidentität von Stamina fest, spezifizieren aber auch in Kombination mit A-Funktionsgenen die Petalen der Angiospermenblüte. Die von der *AGL6*-Subfamilie vorliegenden Daten sprechen jedoch nicht für eine Funktionserweiterung innerhalb der Angiospermen, da die Expression dieser Gene nicht in Organen wie Karpell, Petalen oder Sepalen detektiert werden kann, die erst während

der Angiospermen-Evolution entstanden sind, sondern im stammesgeschichtlich alten Ovulum verblieben ist.

4.4 *GGM12* als Phasentransitions-Gen der Gymnospermen

GGM12 gehört zur MADS-Box-Subfamilie der *STMADS11*-ähnlichen Gene, über die fast ebenso wenig bekannt ist wie über die im letzten Kapitel beschriebenen *AGL6*-ähnlichen Gene. *GGM12* ist das einzige bisher bekannte Mitglied dieser Genfamilie aus Gymnospermen und liegt in der Phylogenierekonstruktion (siehe Abbildung 8, Seite 36) ancestral zu den Angiospermen-Genen. Die gesamte Subfamilie wird in den hier dargestellten Analysen (siehe Abbildung 8, Seite 36) mit einem *bootstrap*-Wert von 62 % unterstützt. Innerhalb der Angiospermen-Mitglieder der *STMADS11*-ähnlichen Gene kann eine klare Trennung in zwei Gruppen festgestellt werden, einerseits die Gene aus dikotylen Pflanzen, die mit 70 % *bootstrap*-Wert unterstützt werden und die Gene aus Monokotylen, die mit 73 % *bootstrap*-Wert unterstützt werden. In die erste Untergruppe fallen *STMADS11* und *STMADS16* aus Kartoffel (Carmona et al., 1998), und *SVP* aus *Arabidopsis*. *SVP* und *JOINTLESS* sind die einzigen Mitglieder dieser Subfamilie, von denen eine publizierte Mutante existiert (Hartmann et al., 2000; Mao et al., 2000). In die Monokotylen-Untergruppe fallen die Gene *ZMM19*, *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26* aus *Zea mays* (G. Theißen und L. Wingen, persönliche Mitteilung), *BMI* aus Gerste und *ORYSAT0006* aus Reis. Die einzige publizierte Information über diese Untergruppe der *STMADS11*-ähnlichen Gene stammt von *BMI*, von dem die *mapping*-Position und das Expressionsmuster bekannt ist (Schmitz et al., 2000). Die ektopische Expression von *ZMM19* ist mit sehr großer Wahrscheinlichkeit für den seit langem beschriebenen Phänotyp der *tunicate*-Mutante in Mais verantwortlich (L. Wingen und G. Theißen, persönliche Mitteilung).

BMI aus Gerste und *SVP* aus *Arabidopsis* zeigen beide das Phänomen des alternativen *splicing*: In beiden Fällen konnten mRNA-Transkripte mit unterschiedlicher Länge isoliert werden. Möglicherweise trifft das auch auf *GGM12* zu, da das *Northern*-Experiment (siehe Abbildung 17, Seite 50) Banden verschiedener Länge zeigt. Bisher konnte nur aus reproduktivem Gewebe von *Gnetum gnemon* *GGM12*-cDNAs in voller Länge isoliert werden, und diese waren alle identisch. Möglicherweise können jedoch aus anderen Geweben, wie z.B. Blättern, *GGM12*-cDNAs, mit anderen Längen isoliert werden, besonders, da der

Northern (siehe Abbildung 17, Seite 50) nur in der Blattspur unterschiedliche lange cDNAs zeigt.

Über die Bedeutung des STMADS-Motivs am Ende der Proteine fast aller STMADS11-ähnlichen Sequenzen (siehe Abbildung 10, Seite 40) kann bislang nur spekuliert werden; eingebettet in dieses Motiv liegt die Konsensus-Sequenz für Phosphorylierungen der Protein-Kinase-C. Möglicherweise unterliegen diese Proteine einer posttranslativen Regulation, und können sich je nach Phosphorylierung in mindestens zwei Aktivierungszuständen befinden, nämlich phosphoryliert und unphosphoryliert, und reagieren somit eventuell schneller auf Veränderungen als durch bloße transkriptionelle oder translativen Regulation. Eine Aussage über die Aktivität dieser Phosphorylierungsstelle oder auf welche Einflüsse hin und mit welcher Kinetik dort Phosphorylierungen stattfinden, kann zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht getroffen werden.

Das *Gnetum*-Protein GGM12 bildet zusammen mit AGL24 aus *Arabidopsis* eine Ausnahme zu den anderen *STMADS11*-ähnlichen Proteinen. AGL24 ist kürzer und weist in der C-terminalen Domäne kein STMADS-Motiv auf, enthält jedoch ebenfalls eine Phosphorylierungsstelle für die Protein-Kinase-C recht nahe am C-Terminus. Die Aminosäuren-Sequenz von GGM12 hingegen zeigt zwar C-terminal das STMADS-Motiv, das allerdings, durch einen Aminosäure-Austausch hervorgerufen, keine Protein-Kinase-C-Phosphorylierungsstelle mehr aufweist. Allerdings liegt 14 Aminosäuren vor dem STMADS-Motiv eine putative Phosphorylierungsstelle der Protein-Kinase-C. Da das STMADS-Motiv jedoch in Gymnospermen und Angiospermen zu finden ist, handelt es sich bei der verkürzten C-Terminalen-Domäne von AGL24 wahrscheinlich um eine Besonderheit innerhalb dieser Gruppe der *STMADS11*-ähnlichen Gene.

Alle Mitglieder der *STMADS11*-Subfamilie sind in vegetativen Organen weit stärker exprimiert als in Reproduktionsorganen. *BM1*-Transkript beispielsweise konnte besonders stark in einer einzigen meristematischen Zellschicht im ersten Nodus des Embryos sichtbar gemacht werden und etwas schwächer in einigen Blattscheiden sowie in den Leitgefäßen einiger Internodien. Schmitz et al. (2000) schließen aus diesem Expressionsmuster auf eine Rolle von *BM1* in der Regulation des vegetativen Sproßwachstums. Eine andere Interpretation könnte aber auch auf die besonders starke Expression dieses Gens im ersten Nodus des Embryos eingehen. Möglicherweise ist *BM1* dort in eine Signalkette involviert, die den Übergang zwischen dem Stadium des Embryos zu dem des Keimlings vermittelt und ist somit an einem Vorgang der Phasentransition beteiligt.

Untersucht man nun andere Veröffentlichungen von *STMADS11*-ähnlichen Genen auf ihre mögliche Rolle bei der Regulation von Phasentransitionen in verschiedenen Bereichen der pflanzlichen Entwicklung, so kann man viele Hinweise auf diese Gemeinsamkeit finden.

Innerhalb der *STMADS11*-ähnlichen Gene aus Angiospermen könnten sich zwei Gruppen mit unterschiedlichen Funktionen herauskristallisieren: Zum einen die putativ orthologen Gene *SVP* und *STMADS16* mit einem räumlich und zeitlich weniger begrenzten Expressionsmuster und zum andern *STMADS11* mit einer viel spezifischeren Expression im Sproß.

SVP wird in allen Entwicklungsstadien der Pflanze exprimiert und in der blühenden Pflanze in allen vegetativen Organen, etwas schwächer jedoch in Infloreszenzen, kaum in Blüten und gar nicht in Schötchen. Das putativ orthologe Gen aus Kartoffel, *STMADS16*, zeigt Transkription in allen Organen, wird jedoch ebenfalls nicht in Blüten und kaum in ruhenden Kartoffelknollen exprimiert (Garcia-Maroto et al., 2000). Die Insertion eines *En-1*-Transposons im ersten Exon von *SVP* führt zu einer Beschleunigung der vegetativen Entwicklung. Beispielsweise findet eine schnellere Transition von juvenilen in adulte Blattformen statt, was durch frühere Trichombildung an der abaxialen Blattseite sichtbar wird, zudem blühen die Pflanzen früher als Wildtypen. Daher kann angenommen werden, daß das *SVP*-Protein im Wildtyp alle vegetativen Phasen des Wachstums verlängert und somit die florale Transition verzögert. *SVP* kann nun einerseits ein direkt wirkender negativer Regulator von Blüten-fördernden Genen sein oder aber einen floralen Repressor aktivieren (Hartmann et al., 2000).

Überexpressionen von Genen der *SVP/STMADS16*-Untergruppe zeigen, daß diese Proteine möglicherweise mit anderen Faktoren interagieren, um Phasentransitionen beeinflussen zu können. Exprimiert man *STMADS16* unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *Nicotiana tabacum*, stellt man keine Verlängerung der vegetativen Phase fest, sondern lediglich weniger Blätter und längere Internodien. Überexpressionen dieses Gens zeigen jedoch einen starken Infloreszenz- und Blüten-Phänotyp: Die durchschnittliche Länge der Infloreszenz-Achsen steigt deutlich an, ebenso die Zahl der Blüten, wodurch die Zeit während der Blüte verlängert ist und Pflanze später seneszent wird. Daneben wird für die Sepalen der frühen Blüten einer Infloreszenz eine Transformation in vegetative Blätter beschrieben (Garcia-Maroto et al., 2000). Da jedoch keine Expression von *STMADS16* in Wildtyp-Infloreszenzen stattfindet, kann dieser Überexpressions-Phänotyp nur schwer bewertet werden. Allerdings könnten *STMADS11*-ähnliche Gene ausreichend sein, um Blüten einen vegetativen Charakter zu verleihen. Andererseits scheinen die *SVP* und *STMADS16* zwar notwendig, aber alleine nicht ausreichend, um gravierende Veränderungen von Phasentransitionen hervorzurufen.

STMADS11 aus *Solanum tuberosum* hingegen scheint mit dem Wachstum von Leitgefäßen assoziiert zu sein. Seine Expression kann in fast allen Organen (außer Infloreszenzen und ruhenden Kartoffelknollen) in den jeweiligen Leitgefäßen festgestellt werden. Möglicherweise ist *STMADS11* daher als vegetatives Regulationsgen in die Entwicklung der Leitgefäße involviert (Carmona et al., 1998) und hat somit eine speziellere Funktion als sein paraloges Gen *STMADS16*. Ob es ebenfalls in der Lage ist, Sepalen in blattförmige Strukturen zu konvertieren, ist bislang nicht bekannt.

Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Theißen mit monokotylen Vertretern der *STMADS11*-Subfamilie scheinen diesen Befund zu bestätigen. Exprimiert man *ZMM19* unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *Arabidopsis thaliana*, so kann beobachtet werden, daß auch dieses Gen in der Lage ist, Sepalen in einen Zustand zu versetzen, der blattähnlich ist: Sie sind stark vergrößert und schalenförmig (L.-U. Wingen, T. Münster, W. Deleu und G. Theißen, persönliche Mitteilung). Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit beruht auch der Phänotyp der *tunicate*-Mutante in Mais auf der Überexpression von *ZMM19*, wodurch jedes einzelne Mais-Korn des Kolbens von einer blattscheidenartigen Hüllspelze umgeben wird (L.-U. Wingen und G. Theißen, persönliche Mitteilung).

Die Blattscheide ist in der Ontogenese des Blattes der ursprünglichere Zustand, erst später wird die Spreite gebildet (Freeling et al., 1992; Freeling, 1992). Während der Blattentwicklung kann also auch eine Folge von zwei verschiedenen Entwicklungsprozessen beobachtet werden. Die Lieschblätter von *Zea mays*, in denen *ZMM19* im Wildtyp exprimiert wird, bestehen nahezu ausschließlich aus Blattsscheiden-Gewebe und nur selten kann an deren oberem Ende eine kleine Spreite entdeckt werden. Die Funktion von *ZMM19* könnte möglicherweise darin bestehen, die Identität der Blattscheide festzulegen.

Mitglieder der *STMADS11*-ähnlichen Gene, sowohl aus Monokotylen wie auch aus Dikotylen, sind demnach wahrscheinlich in die unterschiedlichsten Prozesse der Phasentransition in Pflanzen eingebunden (*BM1*: Embryo - Keimling; *SVP* und *STMADS16*: Transition vegetativer Phasen; *ZMM19*: Blattscheide – Blattspreite). *GGM12*, der Gymnospermen-Vertreter dieser MADS-Box-Genfamilie könnte ebenso wie die oben genannten Angiospermen-Mitglieder der *STMADS11*-ähnlichen Subfamilie in ein Netzwerk eingebunden sein, das die Transition verschiedener Wachstumsphasen in Gymnospermen reguliert. Die hauptsächliche Expression von *GGM12* in den Blättern, die eher untypisch für die anderen MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon* ist, deutet auf funktionelle Ähnlichkeiten dieses Gymnospermen-Gens mit den Angiospermen-Genen hin. Unterschiede in den Längen

der mRNA-Transkripte von *GGM12*, *BM1* und *SVP* können ebenfalls als typisch für diese Subfamilie angesehen werden, auch wenn ihre funktionelle Bedeutung bislang unklar ist. *GGM12* wäre somit das erste *STMADS11*-ähnliche Gen aus Gymnospermen. Nach unseren Informationen aus Angiospermen könnte seine Funktion ebenfalls im Bereich der Phasentransition während der Pflanzenentwicklung liegen. *GGM12* könnte also einen evolutionär ursprünglichen Typ einer Art „Zeitgeber“ repräsentieren.

4.5 *GGM13* und *ZMM17* bilden die neue Subfamilie B_{sister} , die Schwestergruppe der B-Gene

Datenbanksuchen und Phylogenierekonstruktionen (siehe Abbildung 8, Seite 36) zeigen, daß *GGM13* aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* am nächsten mit *ZMM17* aus der Monokotylen-Art *Zea mays* und dem Gen *AP3-2* aus der basalen Angiosperme *Asarum europaeum* verwandt ist, was auf eine putative Orthologie dieser drei Gene hinweist. In der Phylogenierekonstruktion in Abbildung 8 (Seite 36) bilden *ZMM17* und *AP3-2* die Schwestergruppe von *GGM13*.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden kann, sind die B-Gene (*DEF*-, *GLO*-, *GGM2*- und *GGM15*-Subfamilien) die nächsten Verwandten dieser Gene und werden daher B_{sister} -Gene genannt. Mehrere Merkmale unterstützen diese Hypothese deutlich:

- (1) Phylogenierekonstruktionen (Abbildung 8, Seite 36) in dieser Arbeit unterstützen die Schwestergruppenbeziehung von B- und B_{sister} -Genen mit einem moderaten *bootstrap*-Wert von 64 %, in Becker et al. (2000) wird er mit 75 % angegeben.
- (2) B- und B_{sister} -Gene weisen ein gemeinsames Strukturmerkmal auf: Eine um charakteristische 6 Aminosäuren verkürzte I-Domäne (Abbildung 11, Seite 41), die möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der selektiven Formation von DNA-bindenden Dimeren einnimmt (Riechmann et al., 1996).
- (3) B- und B_{sister} -Genen besitzen als einzige bislang bekannte Gene „*PI Motiv-Derived*“-Sequenzen (Abbildung 12, Seite 42) (Kramer und Irish, 1998) in der bei MADS-Box-Genen nur sehr schlecht konservierten C-terminalen Domäne.

Die B_{sister} -Gene kommen sowohl in Monokotylen (*ZMM17*), als auch in basalen Angiospermen (*AP3-2*) und in Gymnospermen (*GGM13*) vor, daher erscheint es plausibel, daß der letzte gemeinsame Vorfahre von Gymnospermen und Angiospermen, der vor ca. 300 Millionen Jahren existierte, schon ein Gen aus dieser Subfamilie besaß. Das Gleiche gilt auch für B-Gene, die ebenfalls aus Gymnospermen und Angiospermen isoliert werden konnten. Da Farne mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Orthologen der floralen homöotischen Gene besitzen (Münster et al., 1997), entstanden B- und B_{sister} -Gene erst nachdem sich die Farn-Linie vor ca. 400 Millionen Jahren von der Samenpflanzen-Linie getrennt hatte. Die Konservierung der B_{sister} -Gene über mehr als 300 Millionen Jahre lässt auf eine wichtige Funktion dieser Gene schließen.

Die Expression der B_{sister} -Gene ähnelt jedoch mehr den *AG*-ähnlichen Genen, von denen einige die C-Funktion innerhalb der Blütenentwicklung einnehmen. B_{sister} -Gene sind nämlich, im Gegensatz zu den in männlichen Reproduktionsorganen angeschalteten B-Genen, hauptsächlich in weiblichen reproduktiven Strukturen exprimiert. Trotz dieser gegensätzlichen Expressionsorte stehen die engen Verwandtschaftsverhältnisse der B_{sister} -Gene mit den B-Genen, die auf Phylogenierekonstruktionen, strukturellen Ähnlichkeiten und spezifischen Sequenzmerkmalen beruhen, außer Zweifel.

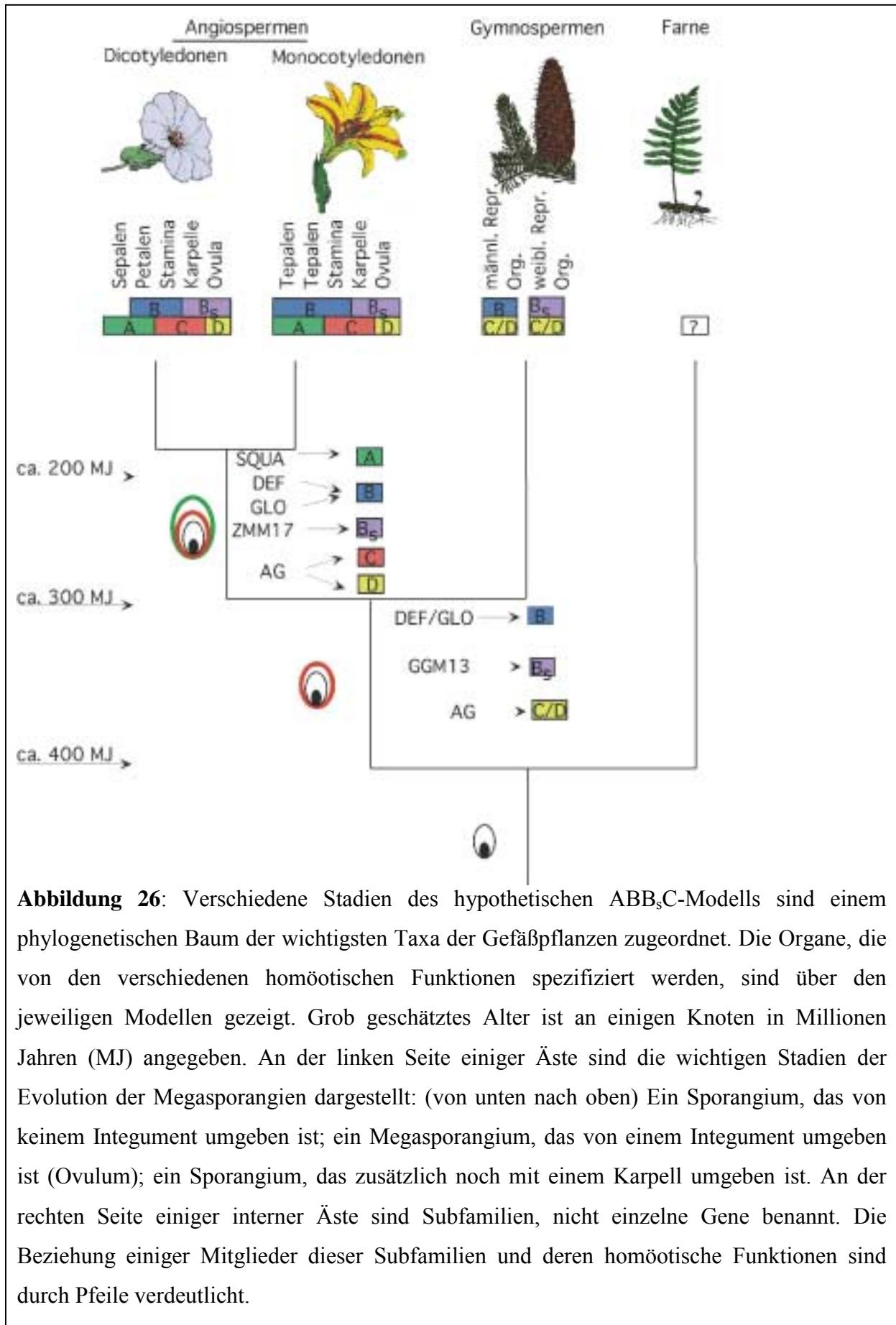
4.5.1 Hypothesen über die Funktion der B_{sister} -Gene in Gymnospermen und Angiospermen

Der hohe Grad an Konservierung sowohl der Sequenz als auch des Expressionsmusters der B_{sister} -Gene über mehr als 300 Millionen Jahre hinweg deutet auf eine wichtige Funktion dieser Subfamilie hin (siehe Kapitel 4.5.). Die B_{sister} -Gene umfassen jedoch bislang nur drei bekannte Gene (*GGM13*, *ZMM17* und *AP3-2*), und zur umfassenden Klärung ihrer Funktion fehlt eine Mutante aus dieser Subfamilie. Daher kann über die Aufgabe der B_{sister} -Gene nur aufgrund der bekannten Expressionsmuster spekuliert werden. Alle bisher veröffentlichten und gut charakterisierten MADS-Box-Gene üben ihre Funktion dort aus, wo sie exprimiert werden, somit werden B_{sister} -Gene möglicherweise ihre Funktion ebenfalls an ihrem Expressionsort ausüben. B_{sister} -Gene sind hauptsächlich in weiblichen Reproduktionseinheiten exprimiert und sind daher wahrscheinlich an der Entwicklung weiblicher Reproduktionsorgane beteiligt. Eine mögliche Rolle in der Spezifikation der Ovula in

Gymnospermen ebenso wie der Ovula und den Karpellen der Angiospermen, oder auch deren Substrukturen, scheint durchaus denkbar. Die Expression von *GGM13* (siehe Abbildung 21) wie auch von *ZMM17* (siehe Abbildung 22) beginnt in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der weiblichen Reproduktionseinheit, kann durch sämtliche weiteren untersuchten Stadien detektiert werden und ist deutlich in den letzten verfügbaren Stadien, die schon fast ausdifferenziert sind zu erkennen. Sowohl *GGM13* als auch *ZMM17* könnten somit nicht nur an der Identität der weiblichen Reproduktionsorgane, sondern auch an der weiteren Ontogenese dieser Strukturen beteiligt sein.

Anhand des in Kapitel 1.3 vorgestellten ABC-Modells (Weigel und Meyerowitz, 1994) wird die Entwicklung der Identität der Blütenorgane der Angiospermen mittels dreier verschiedener Genfunktionen erklärt: Die A-Funktion alleine spezifiziert die Organidentität der Sepalen, A- und B-Funktion zusammen bewirken Petalen-Organidentität, B-Funktion zusammen mit C-Funktion legen die Organidentität der Stamina fest, und die C-Funktion alleine spezifiziert die Karpelle. Das Vorhandensein der C-Funktion führt somit zur Ausbildung der reproduktiven Strukturen innerhalb der Angiospermen-Blüte. Wird zusätzlich zur C-Funktion noch die B-Funktion exprimiert, werden männlichen Reproduktionseinheiten, die Stamina gebildet. Werden C-Funktionsgene alleine exprimiert, führt das zur Bildung von weiblichen Reproduktionseinheiten, den Karpellen. Die C-Funktion legt also den Bereich der Reproduktionsorgane innerhalb der Blüte fest und die B-Funktion gibt Reproduktionseinheiten eine männliche Identität. Die bloße Abwesenheit der Expression von B-Funktionsgenen im reproduktiven Bereich der Blüte reicht nach dem herkömmlichen ABC-Modell somit aus, die Identität weiblicher Reproduktionsorgane festzulegen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten über B_{sister} -Gene zeigen eine Expression in weiblichen Reproduktionseinheiten, welche die gesamte Entwicklung derselben durchzieht. Einer naheliegenden Hypothese zufolge könnten sich auch die B_{sister} -Gene in ein nun erweitertes ABB_sC -Modell integrieren lassen: Demnach reicht die Abwesenheit von B-Funktionsgenen im reproduktiven Bereich der Blüte allein nicht aus, um weibliche Organidentität zu spezifizieren. Vielmehr muß zusätzlich zur Expression der C-Funktion auch B_{sister} -Genaktivität vorhanden sein, damit weibliche Reproduktionsorgane gebildet werden können (siehe Abbildung 26, Seite 90). Da „weiblich“ und „männlich“ im allgemeinen gegensätzliche Zustände darstellen, müßten demzufolge auch die B-Gene antagonistisch zu B_{sister} -Genen sein, wobei sich die beiden Funktionen gegenseitig inhibieren könnten.

Die hypothetische Evolution dieses ABB_sC -Systems ist in Abbildung 26 (Seite 90) dargestellt. In Gymnospermen konnten bislang noch keine A-Funktionsgene isoliert werden..



Da Gymnospermen jedoch auch keinerlei Petalen- oder Sepalen-ähnliche Strukturen besitzen, enthalten sie möglicherweise auch keine A-Funktionsgene. Die Entwicklung der Reproduktionseinheiten in Gymnospermen würde demnach mittels eines vereinfachten BB_sC-Modells erfolgen: Die Expression von C-Funktionsgenen stellt einen reproduktiven Grundzustand her. Eine zusätzliche Expression der B-Funktion spezifiziert männliche und Expression der B_{sister}-Gene weibliche Organidentität.

B_{sister}-Gene haben wahrscheinlich während der Evolution der Angiospermen, ebenso wie die B-Gene, eine Funktionserweiterung erfahren. Beide Genfamilien haben Funktionen in den während der Amgiospermen-Evolution entstandenen neuen Blütenstrukturen übernommen. B-Gene, die in Gymnospermen wahrscheinlich die Organidentität der männlichen Reproduktionseinheiten spezifizieren (Winter et al., 1999), legen in Angiospermen zusätzlich dazu noch die Organidentität von Petalen fest. B_{sister}-Gene hingegen, die in Gymnospermen möglicherweise an der Entwicklung von weiblichen Reproduktionsorganen beteiligt sind, zeigen in der Angiosperme Mais zusätzlich zur Expression im Ovulum auch Expression im Karpell (siehe Abbildung 22, Seite 60). Daher erscheint es denkbar, daß B_{sister}-Gene auch in die Spezifizierung der Organidentität des Karpells involviert sind.

Auf welche Weise die Organidentität der Sporangia von Farnen festgelegt wird, ist bislang unklar, da sie zwar MADS-Box Gene vom MIKC-Typ aufweisen, diese aber nicht den floralen homöotischen Genen der Angiospermen ortholog sind (Münster et al., 1997).

Einige B-Funktionsgene, wie z. B. *DEFICIENS* (Schwarz-Sommer et al., 1992) aus *Antirrhinum majus* werden neben ihrer vorherrschenden Expression in Stamina und Petalen ebenfalls während früher Entwicklungsstadien des Karpells exprimiert (Schwarz-Sommer et al., 1992). Die Funktionalität des in weiblichen Reproduktionsorganen transkribierten DEF-Proteins wurde bislang jedoch nicht intensiv untersucht. Ein ähnliches Phänomen kann auch bei der Expression des B_{sister}-Gens *ZMM17* aus *Zea mays* beschrieben werden. Obwohl *ZMM17* Expression hauptsächlich in weiblichen Infloreszenzen nachgewiesen werden kann, wird *ZMM17* auch in nicht zu vernachlässigender Menge in Maisfahnen exprimiert (siehe Abbildungen 21, Seite 57; Abbildung 22, Seite 60; Abbildung 23, Seite 62). Morphologische Studien über die Blütenentwicklung von Mais zeigen, daß während der Entwicklung der männlichen Blüte ein Gynöceum angelegt wird, das aber im weiteren Verlauf der Entwicklung abortiert wird. Genauere Expressionsstudien durch *in-situ*-Hybridisierungen zeigen, daß *ZMM17* während der Entwicklung des Gynöceums angeschaltet ist (Abbildung 23 D, Seite 62), daß jedoch nach dessen Degeneration *ZMM17* auch in den sich entwickelnden Antheren exprimiert wird (Abbildung 23 G, Seite 26). Die *ZMM17*-Expression in späteren

Stadien der Antherenentwicklung ist zwar nicht besonders stark, aber immerhin gut nachweisbar. Dieser Befund stellt die oben aufgestellte Hypothese in Frage, der zufolge B_{sister} -Gene zusammen mit der C-Funktion weibliche Reproduktionsorgane spezifizieren könnten, da *ZMM17*-Expression auch in männlichen Reproduktionsorganen nachweisbar ist. Bislang konnte jedoch für das in männlichen Reproduktionsorganen exprimierte *ZMM17* nicht gezeigt werden, daß *ZMM17*-Protein translatiert wird und ob dieses Protein funktional ist. Möglicherweise besteht ein Antagonismus zwischen B - und B_{sister} -Genen nicht auf der Ebene der Expression, sondern auf posttranslativer Ebene.

Möglicherweise könnten auch neue *in-situ*-Hybridisierungen mit neuen Sonden zeigen, ob wirklich eine Expression in männlichen Infloreszenzen besteht, da in den hier gezeigten Versuchen auch die *sense*-Negativkontrolle Signale zeigt.

B - und B_{sister} -Gene weisen als synapomorphes Strukturmerkmal eine um ca. 6 Aminosäuren verkürzte I-Domäne auf. Riechmann et al. (1996) weisen in ihren Arbeiten auf die Möglichkeit hin, daß Proteine mit einer kürzeren I-Domäne möglicherweise nur mit Proteinen dimerisieren können, die ebenfalls eine verkürzte I-Domäne besitzen. Würde sich diese Hypothese als wahr herausstellen, wäre es durchaus denkbar, daß B - und B_{sister} -Gene in Angiospermen dimerisieren, wenn sich ihre Expressionsmuster überlappen. Das könnte zum einen während der frühen Entwicklungsphase des Karpells stattfinden, aber auch während der Ontogenese der Stamina.

Andererseits könnte sich die Expression von B_{sister} -Genen in männlichen Reproduktionseinheiten als spezifisch für Monokotylen herausstellen, oder sich möglicherweise sogar nur auf Mais beschränkt erweisen. In *Gnetum gnemon* kann keinerlei Expression von *GGM13* in männlichen Reproduktionseinheiten festgestellt werden, und *AP3-2* aus der basalen Angiospermen *Asarum europaeum* ist ebenfalls nur in Karpellen exprimiert (persönliche Mitteilung V. Irish, Yale University, New Haven, CT, USA). Die Funktion der B_{sister} -Genexpression in männlichen und weiblichen Reproduktionsorganen kann möglicherweise erst dann geklärt werden, wenn Mutanten von B_{sister} -Genen zur Verfügung stehen. Isolation von B_{sister} -Genen aus mehreren phylogenetisch aussagekräftigen Taxa und Untersuchungen zu deren Expression könnten Auskunft darüber geben, wie häufig und in welchem Umfang B_{sister} -Gene in männlichen Reproduktionsorganen exprimiert werden.

4.3.2 Mögliche Regulation der B_{sister}-Gene in Gymnospermen und Angiospermen

In dieser Arbeit wird die putative Promotor-Sequenz von *GGM13* in Anhang M vorgestellt. Im Gegensatz zu den meisten bisher isolierten Promotoren von MADS-Box-Genen (z.B. *GGM2* aus *Gnetum gnemon*, persönliche Mitteilung, Kai-Uwe Winter, oder *DEF* aus *Antirrhinum majus*, Schwarz-Sommer et al., 1992) kann in dem putativen ca. 1,5 kB großen Promotor-Fragment von *GGM13* keine CArG-Box gefunden werden, die auf eine mögliche Regulation durch andere MADS-Box-Gene schließen lassen könnte (Schwarz-Sommer et al., 1992; Hill et al., 1998). Allerdings kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, daß ein großer Teil der hier zum Promotor gezählten Sequenz Teil des 5'UTR ist, da der Transkriptionsstart noch nicht ausreichend charakterisiert ist. Die erste TATA-Box liegt nämlich ca. 660 Bp stromaufwärts der bislang als 5'UTR definierten Sequenz. Mögliche CArG-Boxen könnten noch weiter stromaufwärts liegen als das bisher isolierte Promotor-Fragment.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Chen et al. (2000) wurde allerdings gezeigt, daß der Promotor des B-Funktionsgens *PISTILLATA (PI)* aus *Arabidopsis thaliana* ebenfalls keine CArG-Box enthält, trotzdem aber in Abhängigkeit eines Dimers aus APETALA3 (AP3) und PISTILLATA reguliert wird. Weiterhin stellen die Autoren die Hypothese auf, daß AP3/PI-Dimere nicht direkt an den *PI*-Promotor bindet, sondern zusätzliche Faktoren benötigt. Eine ähnliche, CArG-Box-unabhängige Regulation könnte auch für *GGM13* eine Rolle spielen. Andererseits sind CArG-Boxen aus Gymnospermen noch nicht untersucht worden und zeigen möglicherweise eine etwas andere Sequenz als die gut charakterisierten CArG-Boxen aus Angiospermen.

Eine Regulierung von B_{sister}-Genen durch andere Transkriptionsfaktoren, die keine MADS-Box-Gene sind, wäre auch denkbar, insbesondere, da in der putativen Promotor-Sequenz von *GGM13* eine Sequenz zu finden ist, die mit der Kernsequenz des DNA-Bindemotivs im *AGAMOUS (AG)*-Promotor des Blütenmeristem-Identitäts-Proteins LEAFY (LFY) aus *A. thaliana* übereinstimmt. LFY, so haben Busch et al. (1999) zeigen können, kann direkt an ein kurzes Motiv im zweiten Intron von *AG* binden, um *AG*-Transkription zu stimulieren. LFY-Protein ist ebenfalls in der Lage, die frühe Expression des A-Funktionsgens *APETALA1 (API)* durch direkte transkriptionelle Aktivierung zu induzieren (Wagner et al., 1999). Das B-Funktionsgen *AP3* aus *A. thaliana* wird jedoch nur durch eine Kombination von LFY mit UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) aktiviert (Parcy et al., 1998). Die Expression von B_{sister}-Genen könnte also direkt durch LFY, möglicherweise auch unter Mithilfe eines

anderen Faktors, initiiert werden. Die Aufrechterhaltung der Expression von B_{sister} -Genen könnte dann in ähnlicher Weise reguliert werden wie die *PI*-Expression, nämlich ebenfalls durch Autoregulation und einen nicht-autoregulativen Mechanismus.

Die meisten Gymnospermen besitzen, im Gegensatz zu Angiospermen, die nur eine einzige Kopie aufweisen, eine zweite Kopie von *LFY*, genannt *NEEDLY (NLY)*. Obwohl *LFY* schon aus *Gnetum* isoliert wurde (Frohlich und Meyerowitz, 1997) konnte das paraloge Gen *NLY* trotz intensiver Suche (Kai-Uwe Winter, persönliche Mitteilung) noch nicht aus *Gnetum* isoliert werden. *LFY*-Orthologe aus Gymnospermen werden bevorzugt in männlichen und *NLY*-Orthologen hauptsächlich in weiblichen Reproduktionsorganen exprimiert (Frohlich und Parker, 2000). Somit liegt die Hypothese nahe, daß die Expression des putativen B -Funktionsgens aus *Gnetum*, *GGM2*, durch *Gnetum-LFY* initiiert wird, denn auch in dessen Promotor konnte die Kernsequenz der *LFY*-Bindestelle identifiziert werden (Kai-Uwe Winter, persönliche Mitteilung), und daß das B_{sister} -Gen *GGM13* durch *Gnetum-NLY* aktiviert wird. Falls in *Gnetum* wirklich kein *NLY* existiert, wäre denkbar, daß *LFY GGM2* und *GGM13* aktiviert.

Über die Regulation der B_{sister} -Gene in Gymnospermen und Angiospermen kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden, da noch keine Promotoren isoliert wurden, und auch noch keine genetischen Interaktionen untersucht wurden. Denkbar wäre jedoch, daß auch B_{sister} -Gene in Angiospermen von *LFY*-Orthologen aktiviert werden.

4.5.3 Der Zusammenhang zwischen der Aufspaltung der B - und B_{sister} -Gen-Linien und der Evolution der Heterosporie

Große Datierungen unter Annahme einer molekularen Uhr datieren die Aufspaltung der B - und B_{sister} -Genlinie von ihrem gemeinsamen Vorfahren auf einen Zeitraum von 400 – 300 Millionen Jahren (Becker et al., Daten in der Vorbereitung). Möglicherweise hatte dieser Vorfahre eine allgemeine Funktion in der Entwicklung von einheitlichen (homosporen) Reproduktionseinheiten eines Farn- oder Progymnospermen-ähnlichen Vorläufers der Samenpflanzen. Die Aufspaltung in männlich-spezifische B - und weiblich-spezifische B_{sister} -Gene könnte entweder parallel zur Evolution von heterosporen Reproduktionsorganen abgelaufen oder sogar deren auslösendes Moment gewesen sein. B_{sister} -Gene wurden anfangs möglicherweise in Megasporophyllen exprimiert, die nur geringfügig größer waren als die

Mikrosporophylle, in denen B-Gene exprimiert wurden. Im Laufe der Evolution verdeutlichten sich dann wahrscheinlich die Größenunterschiede zwischen Mikro- und Megasporen, ihre Morphologie änderte sich in unterschiedlicher Weise bei gleichzeitiger Differenzierung in Mikro- und Megasporangia fand.

Das Endprodukt dieses Differenzierungsprozesses sind die in rezenten Samenpflanzen zu findenden morphologisch unterschiedlichen Mikro- und Megasporophylle, die Mikro- und Megasporen verschiedener Größe und Morphologie tragen.

Heterosporie wird nach Bateman und DiMichele (1994) durch das Vorhandensein von lebensfähigen dimorphen Sporen definiert. Neben den Samenpflanzen, die alle heterospor sind, ist die Heterosporie während der Evolution der Landpflanzen mehrfach unabhängig voneinander entstanden. Innerhalb der Lycopodiaceae (Bärlappgewächse) besteht bei den Selaginellales und der Gruppe der Isoetales Heterosporie. Die Equisetales weisen keinen gut dokumentierten Fall von Heterosporie auf, jedoch lässt sich bei den an extreme Standorte angepaßten Schwimmfarne wie Azolla und Salvinia deutlich heterospore Reproduktion erkennen. Alle anderen Farne sind jedoch homospor. Die Progymnospermen des oberen Devons wie z. B. die Archaeopteridales sind heterospor und ihre Sporangien enthalten nur ein Sporengeschlecht, bereits hier gibt es Mikro- und Megasporangien. Obwohl sich die Morphologie der Mikro- und Megasporen dieser Progymnospermen fast gleicht, sind die Megasporen ungefähr doppelt so groß wie die Mikrosporen (Bateman und DiMichele, 1994).

Mit großer Wahrscheinlichkeit beruht die Heterosporie der Selaginellales, Isoetales und der heterosporen Schwimmfarne auf einem anderen Mechanismus als die der Progymnospermen und Samenpflanzen. Aus Farnen (Münster et al., 1997) und Bärlappgewächsen (Svensson et al., 2000) sind zwar MADS-Box-Gene isoliert worden, jedoch sind diese Gene nicht homolog zu den floralen homöotischen Genen der Angiospermen, sondern sind Mitglieder in Genfamilien, die zumindest bislang ausschließlich aus Vertretern der Farne bzw. Bärlappe bestehen. Gene, die den floralen homöotischen Genen ortholog sind, entstanden wahrscheinlich erst in Progymnospermen, nachdem diese sich von den Farnen abgespalten hatten. Das Vorläufer-Gen der B- und B_{sister}-Genlinie muß jedoch schon erkennbare Ähnlichkeiten zu den floralen homöotischen Genen aufgewiesen haben, da zumindest einige seiner Nachfahren, die B-Gene, florale homöotische Funktionen spezifiziert.

Da die verschiedengradig heterosporen Progymnospermen ausgestorben sind, kann nur spekuliert werden, daß sie schon Orthologe der floralen homöotischen Gene besaßen und daß die heute in Samenpflanzen vorzufindende Heterosporie während der Ära der Progymnospermen entstanden ist. Diese Hypothese gewinnt dadurch zusätzlich an

Glaubwürdigkeit, daß die Nachfahren der Progymnospermen, die echten Gymnospermen, per Definition heterospor sind (Bateman und DiMichele, 1994) und schon eindeutige putative Orthologe der floralen homöotischen Gene besitzen (Winter et al., 1999).

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zehn MADS-Box-Gene aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* vorgestellt. Unter diesen Genen fallen einige in Subfamilien, die keinen Angiospermen-Vertreter aufweisen. Andere Gene lassen sich Subfamilien zuordnen, denen zwar Mitglieder aus Angiospermen angehören, die jedoch nur sehr oberflächlich charakterisiert sind. MADS-Box-Gene aus *Gnetum gnemon*, die der zweiten Kategorie von Subfamilien angehören, wurden genauer auf ihre Expression hin untersucht.

Bis auf ein wenig aufgelöstes Expressionsmuster und die Position in Phylogenetierekonstruktionen ist über die Gene, die keine Verwandten unter den Angiospermen besitzen, nichts bekannt. Um zumindest herauszufinden, in welchen Entwicklungsstadien welcher Organe sie ihre Funktion ausüben, wären *in-situ*-Hybridisierungen nötig. Weitere funktionelle und vergleichende Studien würden sich als schwierig erweisen, da Angiospermen-Gene zum Vergleich fehlen und auch keine Mutanten zur Verfügung stehen, die möglicherweise Aussagen über die Funktion dieser *Gnetum*-MADS-Box-Gene Auskunft geben könnten.

Untersuchungen zur möglichen Funktion der MADS-Box-Gene aus *Gnetum*, die zusammen mit Angiosperm-Genen in eine Subfamilie fallen, fehlen ebenso. Einen Hinweis auf die Funktion von *GGM12* und die Konservierung der *STMADS11*-Subfamilie könnte die Komplementation der *SVP*- und *JOINTLESS*-Mutanten mit *GGM12* sein. Zusätzlich könnten heterologe Überexpressionen von *GGM12* unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *Arabidopsis thaliana* die mögliche Funktion von *GGM12* als ursprünglichen Zeitgeber testen. Allerdings könnte eine detaillierte *Northern*-Analyse, die verschiedene Entwicklungsstadien umfaßt, zumindest schon auf entwicklungsabhängige Veränderungen im *GGM12*-Expressionsmuster hinweisen.

Nach Mutanten in *AGL6*-ähnliche Genen aus *Arabidopsis thaliana* müßte noch aktiv gesucht werden, da in der Literatur bis jetzt noch keine solche Mutante beschrieben ist. Um jedoch den hohen Grad an Konservierung des Expressionsmusters der *AGL6*-ähnliche Gene aus *Gnetum* und Angiospermen auch funktional überprüfen zu können, sind Mutanten unentbehrlich.

Sämtliche in den letzten Kapiteln beschriebenen Hypothesen im Zusammenhang mit den B_{sister} -Genen beruhen letztlich auf Expressionsstudien und können bislang nicht durch Informationen über die Funktionalität der B_{sister} -Gene untermauert werden. Funktionsstudien an *GG13* und *ZMM17* sind daher unabdingbar. Am wichtigsten wäre es, ein B_{sister} -Gen aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren, damit Funktionsstudien wie Überexpressionen und Charakterisierung von Mutanten im homologen System ausgeführt werden können. Im Vordergrund der Funktionsanalyse würde der Zusammenhang zwischen den Genfunktionen des ABC-Modells und den B_{sister} -Genen stehen, um zu klären, ob auch die B_{sister} -Gene florale homöotische Funktionen ausüben.

Zusätzlich müßte auch weiterhin durch Datenbanksuche überprüft werden, ob die B_{sister} -Genfamilie nicht schon Mitglieder anderer Spezies enthält, die dann charakterisiert werden können, um sicher zu gehen, daß mit *ZMM17* und *GGM13* nicht die Ausnahmen unter den B_{sister} -Genen untersucht wurden. Bislang konnte in den Sequenzdatenbanken außer *AP3-2* aus *Asarum europaeum* noch kein anderes Gen gefunden werden, das in die Subfamilie der B_{sister} -Gene fällt.

Interessant wäre sicherlich auch, die Einbindung der B_{sister} -Gene in das regulatorische Netzwerk der Blütenentwicklung zu charakterisieren. Mit Hilfe des *yeast-one-hybrid*-Systems könnten Transkriptionsfaktoren isoliert werden, die an der Regulation der B_{sister} -Gene auf Transkriptionsebene beteiligt sind. Untersuchungen mittels des *yeast-two-hybrid*-Systems hingegen könnte Auskunft über mögliche Interaktionspartner der B_{sister} -Proteine geben.

5. Zusammenfassung

Über die Evolution der Blütenpflanzen aus Gymnospermen-ähnlichen Vorläufern ist bislang aufgrund der großen morphologischen Unterschiede zwischen Angiospermen und Gymnospermen und einer nur sehr lückenhaften fossilen Dokumentation wenig bekannt. Molekulare Untersuchungen könnten dazu beitragen, Mechanismen der Angiospermen-Evolution aufzuklären, da wichtige Gene für die Ontogenese eines Organismus wahrscheinlich auch an dessen Evolution beteiligt waren. Vergleichende Studien über Transkriptionsfaktoren aus Angiospermen und ihren nächsten Verwandten, den Gymnospermen, könnten Aufschluß über die molekulare Evolution der Angiospermen geben. MADS-Box-Gene nehmen wichtige Rollen als Kontrollgene verschiedener pflanzlicher Entwicklungsprozesse ein und könnten somit auch an der Evolution der Angiospermen maßgeblich beteiligt gewesen sein.

Im dieser Arbeit werden zehn aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* isolierte MADS-Box-Gene (*GGM10-GGM19*) vorgestellt. Sie zeigen sehr diverse Expressionsmuster sowohl in männlichen und weiblichen Reproduktionseinheiten, als auch in Blättern, was auf eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen schließen lässt. Phylogenetische Rekonstruktionen zeigen, daß einige dieser MADS-Box-Gene in bereits aus Angiospermen bekannte Subfamilien fallen, andere Gene jedoch keiner bislang in Angiospermen charakterisierten Subfamilie zugeordnet werden können. Aus der Anzahl der Subfamilien, die MADS-Box-Gene aus Gymnospermen und Angiospermen enthalten, konnte geschlossen werden, daß der gemeinsame Vorfahre von Angiospermen und Gymnospermen bereits mindestens fünf verschiedene MADS-Box-Gene besessen haben muß.

Die Gene, die in schon aus Angiospermen bekannte, aber noch nicht ausgiebig charakterisierte Subfamilien fallen, wurden detaillierteren Expressionsstudien unterworfen. Aufgrund dieser Expressionsstudien stellte sich heraus, daß die Subfamilie der *AGL6*-ähnlichen Gene wahrscheinlich in Gymnospermen und Angiospermen an der Entwicklung der männlichen und weiblichen Reproduktionsorgane beteiligt sind.

GGM12 ist das erste Gymnospermen-Gen aus der Subfamilie der *STMADS11*-ähnliche Gene, die möglicherweise Aspekte der Phasentransition während des Pflanzenwachstums regulieren. *GGM12* könnte somit einen alten Typus eines Phasentransitionsgens repräsentieren.

GGM13 bildet zusammen mit dem Mais-Gen *ZMM17* und *AP3-2* aus der basalen Angiospermen *Asarum europaeum* eine neue Subfamilie, die, phylogenetischen Untersuchungen zufolge, die Schwestergruppe der B-Gene (*DEF-*, *GLO-*, *GGM2*- und

GGM15-ähnliche Gene) ist. Da diese neue Subfamilie zwar nahe mit den B-Genen verwandt ist, jedoch hauptsächlich in weiblichen Reproduktionseinheiten exprimiert ist, wurde sie B_{sister}-Gene genannt. Der hohe Grad an Konservierung über mehr als 300 Millionen Jahre und die Expression der B_{sister}-Gene in allen untersuchten Entwicklungsstadien der Ovula (*GGM13*, *ZMM17*) und auch im Karpell (*ZMM17*) deutet auf eine wichtige Funktion in diesen Organen hin.

Grobe Schätzungen datieren die Aufspaltung der B- und B_{sister}-Gene von einem gemeinsamen Vorfahren auf den Zeitraum von vor 400 – 300 Millionen Jahren. In diesem Zeitfenster entstand wahrscheinlich auch die für alle Samenpflanzen charakteristische Heterosporie aus einer homosporen Ausgangssituation. Möglicherweise besteht eine enge Verbindung zwischen der Evolution der Heterosporie in Samenpflanzen und der Aufspaltung der männliche Organidentität spezifizierende B- und weibliche Organidentität spezifizierende B_{sister}-Genlinien.

6. English abstract

The evolution of angiosperms from gymnosperm-like ancestors still remains enigmatic. The morphological gap between gymnosperms and angiosperms accounts for this lack of information as much as the fragmentary fossil record. Studying genes of ontogenetic importance at the molecular level could improve our knowledge on the mechanisms of angiosperm evolution as these genes probably not only play an important role in the development of an organism but also in its evolution. Comparative analyses on transcription factors of angiosperms and their gymnosperm sister group could help to understand molecular evolution. Especially MADS-box transcription factors are significantly involved in different aspects of plant development and probably also played an important role during angiosperm evolution.

Here we introduce ten new MADS-box genes (*GGM10-GGM19*) that were isolated from the gymnosperm species *Gnetum gnemon*. They exhibit diverse expression patterns in male and female reproductive organs as well as in leaves, which may indicate equally diverse functions of the different proteins. Phylogeny reconstructions show that some *GGM* genes fall into MADS-box gene subfamilies known from angiosperms, but others could not be assigned to any known angiosperm subfamily. From the number of subfamilies containing members of both, gymnosperms and angiosperms, we can estimate that the common ancestor of gymnosperms and angiosperms possessed already at least five different MADS box genes. *GGM* genes falling together with angiosperm genes in subfamilies which so far are relatively superficially characterized were analyzed in more detailed expression studies.

Expression analyses of the *AGL6*-like genes *GGM9* (Winter et al., 1999) and *GGM11* indicate a high degree of conservation between gymnosperm and angiosperm genes, as they all show expression in ovule primordia. Also their function might not have changed much during angiosperm evolution.

GGM12 is the first *STMADS11*-like gene isolated from a gymnosperm species. As angiosperm members of the *STMADS11* subfamily are involved in different aspects of phase transition processes, *GGM12* might be a representative of an evolutionary old of a “time keeper” gene.

GGM13 forms together with *ZMM17* and *AP3-2* a new MADS box gene subfamily which, in phylogeny reconstructions, is the sister group of B genes (*DEF-*, *GLO-*, *GGM2-* and *GGM15*-like genes). Even though this new subfamily is closely related to the B-genes, its members are predominantly expressed in female rather than in male reproductive units which is the reason

for naming them B_{sister} genes. A high degree of conservation over more than 300 million years together with expression throughout all examined developmental stages of ovules (*GGM13*, *ZMM17*) and carpels (*ZMM17*) indicate an important function of B_{sister} genes in the development of these organs.

Rough estimates date the split of B and B_{sister} genes from a common ancestor to 400 to 300 million years ago. Also the evolution of heterospory, an important seed plant character, from homospory happened within this time frame. Very likely there is an association between the split of the B (specifying microsporangia) and B_{sister} gene lineage (specifying megasporangia) and the evolution of heterospory.

7. Literaturverzeichnis

Albert, V.A., Backlund, A., Bremer, K., Chase, M.W., Manhart, J.R., Mishler, B.D. & Nixon, K.C. (1994). Functional constraints and *rbcL* evidence for land plant phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81: 537-567

Alting-Mees, M.A. & Short, J.M. (1989). pBluescript II gene mapping vectors. *Nucl. Acids Res.* 17(22): 9494

Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Ribas de Pouplana, L., Martinez-Castilla, L. & Yanofsky, M.F. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 97(10): 5328-5333

Angenent, G.C. & Colombo, L. (1996). Molecular control of ovule development. *Trends Plant Sci.* 1: 228-232

Arber, E.A.N. & Parkin, J. (1907). On the origin of angiosperms. *J. Linn. Soc. Bot.* 38: 29-80

Arber, E.A.N. & Parkin, J. (1908). Studies on the evolution of angiosperms: the relationship of the angiosperms to the Gnetales. *Ann. Bot.* 22: 489-515

Barnabas, S., Krishnan, S. & Barnabas, J. (1995). The branching pattern of major groups of land plants inferred from parsimony analysis of ribosomal RNA sequences. *Bioscie.* 20 (2): 259-272

Bateman, R.M. & DiMichele, W.A. (1994). Heterospory: the most iterative key innovation in the evolutionary history of the plant kingdom. *Biol. Rev.* 69: 345-417

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

Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. & Theißen, G. (2000). MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Mol. Biol. Evol.*, in press

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res.* 7(6): 1513-1523

Bowe, L.M., Coat, G. & dePamphilis, C.W. (2000). Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and gnetales' closest relatives are conifers. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 97(8): 4092-4097

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

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). XL1-Blue – a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galacosidase selection. *Biotechniques* 5(4): 376

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

Carmichael, J.S., Friedman, W.E. (1996). Double fertilization of *Gnetum gnemon* (Gnetaceae): its bearing on the evolution of sexual reproduction within the Gnetales and the Anthophyte clade. *Am. J. Bot.* 83(6): 767-780

Carmona, M.J., Ortega, N. & Garcia-Maroto F. (1998). Isolation and molecular characterization of a new vegetative MADS-box gene from *Solanum tuberosum* L. *Planta* 207: 181-188

Chaw, S.-M., Zharkikh, A., Sung, H.-M., Lau, T.-C. & Li, W.-H. (1997). Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14(1): 56-68

Chaw, S.-M., Parkinson, C.L., Cheng, Y., Vincent, T.M. & Palmer, J.D. (2000). Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of gnetales from conifers. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 97(8): 4086-4091

Chen, X., Riechmann, J.L., Jia, D. & Meyerowitz, E.M. (2000). Minimal regions in the *Arabidopsis PISTILLATA* promoter responsive to the *APETALA3/PISTILLATA* feedback control do not contain a CArG box. *Sex. Plant Reprod.* 13: 85-94

Cheng, P.C., Greyson, R.I. & Walden, B. (1983). Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Amer. J. Bot.* 70 (3): 450-462

Chuang, S.-E., Chen, A.-L. & Chao, C.-C. (1995). Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucl. Acids Res.* 23 (9): 1641.

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

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

Crane, P.R. (1985). Phylogenetic analysis of seed plants and the origin of angiosperms. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 72: 713-793

Crane, P.R. (1996). The fossil history of the Gnetales. *Intl. J. Plant Scie.* 157(6) Suppl.: S50-S57

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

Davies, B. & Schwarz-Sommer, Z. (1994). Control of floral organ identity by homeotic MADS-box transcription factors. In: Results and problems in cell differentiation 20 - Plant promotores and transcription factors, L. Nover (Hrs.) (Berlin und Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag), pp. 235-258

Davies, B., Egea-Cortines, M., Silva, E.D., Saedler, H. & Sommer, H. (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS Box proteins. *EMBO J.* 15(16): 4330-4343

Donoghue, M.J. (1994). Progress and prospects in reconstructing plant phylogeny. *Ann. Rev. Mo. Bot. Gard.* 8(3): 405-418

Donoghue, M.J. & Mathews, S. (1998). Duplicate genes and the root of angiosperms, with an example using phytochrome sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 9(3): 489-500

Donoghue, M.J. & Doyle, J.A. (2000). Seed plant phylogeny: demise of the anthophyte hypothesis? *Curr. Biol.* 10: R106-R109

Doyle, J.J. (1994). Evolution of a plant homeotic multigene family: towards connecting molecular systematics and molecular genetics. *Syst. Biol.* 43: 307-328

Doyle, J.A. (1994). Origin of the angiosperm flower. *Plant Syst. Evol.* 8, Suppl.: 7-29

Doyle, J.A. (1996). Seed plant phylogeny and the relationships of Gnetales. *Int. J. Plant Sci* 157, Suppl., S3-S39

Doyle, J.A. (1998a). Molecules, morpholgy, fossils and the relationship of angiosperms and Gnetales. *Mol. Phylogen. Evol.* 9: 448-462

Doyle, J.A. (1998b). Phylogeny of vascular plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 567-599

Doyle, J.A. & Donoghue, M.J. (1986). Seed plant phylogeny and the origin of angiosperms: an experimental cladistic approach. *Bot. Rev.* 52: 321-431

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

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

Endress, P. (1996). Structure and function of female and bisexual organ complexes in Gnetales. *Intl. J. Plant Scie.* 157(6) Suppl.: S113-S125

Fischer, A., Baum, N., Saedler, H. & Theißen, G. (1995). Chromosomal mapping of the MADS-box multigene family in *Zea mays* reveals dispersed distribution of allelic genes as well as transposed copies. *Nucl. Acids Res.* 23(11): 1901-1911

Fischer, H., Chen, L. & Wallisch, S. (1996). The evolution of angiosperm seed proteins: a methionine-rich legumin subfamily present in lower angiosperm clades. *J. Mol. Evol.* 43: 399-404

Freeling, M., Bertrand-Garcia, R. & Sinha, N. (1992). Maize mutants and variants altering developmental time and their heterochronic interactions. *BioEssays* 14(4): 227-236

Freeling, M. (1992). A conceptual framework for maize leaf development. *Dev. Biol.* 153: 44-58

Friedmann, W.E. (1996). Introduction to biology and evolution of the Gnetales. *Intl. J. Plant Scie.* 157(6) Suppl.: S1-S2

Friedmann, W.E. & Carmichael, J.S. (1996). Double fertilization in Gnetales: Implications for understanding reproductive diversification among seed plants. *Intl. J. Plant Scie.* 157(6) Suppl.: S77-S94

Frohlich, M.W. & Meyerowitz, E.M. (1997). The search for flower homeotic gene homologs in basal angiosperms and gnetales – a potential new source of data on the evolutionary origin of flowers. *Intl. J. Plant Scie.* 158(6 Suppl S):S131-S142

Frohlich, M.W. & Parker, D.S. (2000). The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils. *Syst. Bot.* 25(2): 155-170

Frohmann, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.

Garcia-Maroto, F., Ortega N., Lozano, R. & Carmona M.J. (2000). Charaterization of the potato MADS-box gene *STMADS16* and expression analysis in tobacco transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 499-513

Gehring, W.J. (1992). The homeobox in perspective. *Sci.* 1992 17: 277-280

Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A. & Martin, W. (1996). Noncoding sequences from the slowly evolving chloroplast inverted repeats in addition to *rbcL* data do not support gnetalean affinities of angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* 13(2): 383-396

Goremykin, V.V., Hansmann, S. & Martin, W.F. (1997). Evolutionary analysis of 58 proteins encoded in six completely sequenced chloroplast genomes: revised molecular estimates of two seed plant divergence times. *Pl. Syst. Evol.* 206: 337-351

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

Haeckel, E. (1866). Generelle Morphologie der Organismen: Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendez-Theorie. (Berlin, Deutschland: Georg Riener)

Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. & Huijser, P. (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 21 (4): 351-360

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

Hasebe, M. & Banks, J.A. (1997). Evolution of MADS gene family in plants. In: Iwatsuki, K. & Raven, P.H. (Hrs.), Evolution and diversification of land plants. (Tokyo, Japan: Springer-Verlag), pp179-197

Hasebe, M., Kofuji, R., Ito, M., Kato, M., Isatsuki, K. & Ueda, K. (1992). Phylogeny of gymnosperms inferred from *rbcL* gene sequences. *Bot. Mag. Tokyo* 105: 673-679

Haughn, G.W. & Somerville, C.R. (1988). Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev. Genet.* 9:73-89

Heard, J. & Dunn, K. (1995). Symbiotic induction of a MADS-box gene during development of alfalfa root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5273-5277

Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kehl, A.E., Kel, O.V. Ignatieva E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya O.A., Kolpov, F.A., Podkolodny N.L. & Kolchanov, N.A. (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26: 364-370

Hickey, L.J. & Taylor, D.W. (1996). In: Flowering plant origin, evolution & phylogeny. Taylor, D.W. & Hickey, L.J. (Hrs.) (New York, USA: Chapman und Hall) pp. 176-231

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

Hufford, L. (1996). The morphology and evolution of male reproductive structures of Gnetales. *Intl. J. Plant Scie.* 157(6) Suppl.: S95-S112

Jack, T., Brockmann, L.L. & Meyerowitz, E.M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68: 683-697

Jofuku, K.D., den Boer, B.G.W., Van Montagu, M. & Okamuro, J.K. (1994). Control of the *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 6: 1211-1225

Johnson, A.D. (1995). Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5: 552-558

Joshi, C.P. (1987a). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* 15: 6643-6653

Joshi, C.P. (1987b). Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res.* 15: 9627-9640

Kirby, C., Heard, J., Cattoll, S., Ganter, G., Lesher, J. & Dunn, K. (1998). The genomic sequence of *NMH7*, a MADS-Box gene which expression has been localized to the infected cells of alfalfa (*Medicago sativa*) root nodules (Accession No. AF042068). (PGR98-063). *Plant Physiol.* 116: 1604

Kramer, E.M. & Irish, V.F. (1998). Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-Box gene lineages. *Genetics* 149: 765-783

Kramer, E.M. & Irish, V.F. (2000). Evolution of the petal and stamen developmental programs: Evidence from comparative studies of the lower eudicots and basal angiosperms. *Int. J. Plant Sci.*, in press

Kubitzky, K. (1990). Gnetatae. In: The families and genera of vascular plants. Vol. 1. Pteridophytes and gymnosperms. Kramer, K.U. & Green, P.S. (Hrs.) (Berlin, Deutschland: Springer-Verlag), pp. 378-391

Liljegren, S.J., Ferrandiz, C., Alvarez-Byulla, E.R., Pelaz, S. & Yanofsky, M.F. (1998). *Arabidopsis* MADS-Box genes involved in fruit dehiscence. *Flowering Newsletters* 25: 9-19

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. & Hake, S. (1994). A *KNOTTED1*-like gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *The Plant Cell* 6: 1859-1976

Loconte, H. & Stevenson, D.W. (1990). Cladistics of the spermatophyta. *Brittonia* 42 (3): 197-211

Luehrsen, K.R., Taha, S. & Walbot, V. (1994). Nuclear pre-mRNA processing in higher plants. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 47: 149-193

Ma, H., Yanofsky, M.F. & Meyerowitz, E.M. (1991). *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* 5: 484-495

Malek, O., Lättig, K., Hiesel, R., Brennicke, A. & Knoop, V. (1996). RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J.* 15(6): 1403-1411

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

Mao, L., Begum, D., Chuang, H.-W., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E. & Wing, R.A. (2000). *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406: 910-913

McGinnis, W. & Kuziora, M. (1994). The molecular architects of body design. *Sci. Am.* 270(Februar): 36-42

Mena, M., Mandel, M.A., Lerner, D.R., Yanofsky, M.F. & Schmidt, R.J. (1995) A characterization of the MADS-box family in maize. *Plant J.* 8(6): 845-854

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

Mouradov, A., Glassick, T.V., Hamdorf, B.A., Murphy, L.C., Marla, S.S., Yang, Y. & Teasdale, R. (1998). Family of MADS-box genes expressed in early male and female reproductive structures of Monterey Pine. *Plant Physiol.* 177: 55-61

Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B. & Teasdale, R.D. (1999) Molecular control of early cone development in *Pinus radiata*. *Protoplasma* 208: 3-12

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

Neuffer, M.G., Coe, E.H. & Wessler, S.R. (1997). Mutants of maize (Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Ng, M. & Yanofsky, M.F. (2000). Three ways to learn the ABCs. *Curr. Op. in Plant Biol.* 3: 47-52

Okamuro, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M. & Jofuku, K.D. (1997). The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7076-7081

Olsen, E.N., Perry, M. & Schulz, R.A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the *MEF2* family of MADS-box transcription factors. *Dev. Biol.* 172: 2-14

Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. & Weigel, D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395: 561-56

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

Pellegrini, L., Tan, S. & Richmond, T.J. (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 376: 490-498

Perry, S.E., Lehti, M.D. & Fernandez, D.E. (1999). The MADS-Domain Protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissue with diverse origins. *Plant Phys.* 120: 121-129

Pnueli, L., Abu-Abeid, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z. & Lifschitz, E. (1991). The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserverd secondary structure and homolgy with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 1: 255-266

Price, R.A. (1996). Systematics of the Gnetales: a review of morphological and molecular evidence. *Intl. J. Plant Scie.* 157(6) Suppl.: S40-49

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

Qiu, Y.-L., Lee, J. Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.a., Chen, Z., Savolainen, V. & Chase, M. (2000). The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407

Raghaven, V. (2000). Developmental biology of flowering plants. (New York, USA: Springer-Verlag) pp. 216-227

Riechmann, J.L., Krizek B.A. & Meyerowitz E.M. (1996). Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 93: 4793-3798

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

Riechmann, J.L. Ito, T. & Meyerowitz, E.M. (1999). Non-AUG initiation of *AGAMOUS* mRNA translation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* 19(12): 8505-8512

- Rothwell, G.W. & Serbert, R.** (1994). Lignophyte phylogeny and the evolution of spermatophytes – a numerical/cladistic analysis. *Syst. Bot.* 19: 443-482
- Rounsley, S.D., Ditta, G. & Yanofsky, M.F.** (1995). Diverse roles for MADS-box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* 7: 1259-1269
- Rutledge, R., Regan, S., Nicolas, O., Fobert, P., Cote, C., Bosnich, W., Kauffeldt, C., Sunohara, G., Seguin, A. & Stewart, D.** (1998). Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. *Plant J.* 15(5): 625-634
- Sablowsky R.W.M. & 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
- Sanderson, M.J.** (1997). A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol. Biol. Evol.* 14(12): 1218-1231
- Sanderson, M.J., Wojciechowsky, M.F., Hu, J.-M., Khan, T.S. & Brady, S.G.** (2000). Error, bias, long-branch attraction in data for two chloroplast photosystem genes in seed plants. *Mol. Biol. Evol.* 17(5): 782-797
- Schmitz, J., Franzen, R., Ngyuen, T.H., Garcia-Maroto, F., Pozzi, C., Salamini, F. & Rhode, W.** (2000). Cloning, mapping and expression analysis of barley MADS-box genes. *Plant Mol. Biol.* 42: 899-913
- Schneider-Poetsch, H.W.A., Kolukisaoglu, Ü., Clapham, D.H., Hughes, J. & Lamarter, T.** (1998). Non-angiosperm phytochromes and the evolution of vascular plants. *Physiol. Plant.* 102: 612-622
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. & Sommer, H.** (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936

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

Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J. & Dennis, E.S. (2000). The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 97(6): 3753-3758

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

Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. & Huse, W.D. (1988). A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* 16(15): 7583-7600

Shutov, A.D., Braun, H., Chesnokov, Y.V., Horstmann, C., Kakhovskaya, I.A. & Bäumlein, H. (1998). Sequence peculiarity of gnetalean legumin-like seed storage proteins. *J. Mol. Evol.* 47: 486-492

Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. & Lukyanov, S.A. (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23 (6): 1087-1088

Slack, J.M.W., Holland, P.W.H. & Graham, C.F. (1993). The zootype and the phyletic stage. *Nature* 361: 490-492

Soltis, P.S., Soltis, D.E. & Chase, M. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* 402: 402-404

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

Stewart, W.N. & Rothwell, E.W. (1993). Paleobotany and the Evolution of Plants, 2. Ausgabe. (Cambridge, Großbritannien: Cambridge University Press)

Stefanovic, S., Jager, M., Deutsch, J., Broutin, J. & Masselot, M. (1998). Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *Am. J. Bot.* 85(5): 688-697

Summerton, J., Atkins, T. & Bestwick, R. (1983). A rapid method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 133: 79

Sundström, J., Carlsbecker, A., Svensson, M.E., Svensson, M., Johanson, U., Theißen, G. & Engström, P. (1999). MADS-box genes active in developing pollen cones of the norway spruce (*Picea abies*) are homologous to the B-class floral homeotic genes in angiosperms. *Dev. Gen.* 25: 253-266

Svensson, M.E., Johannesson, H. & Engström, P. (2000). The *LAMB1* gene from the clubmoss *Lycopodium annotinum* is a divergent MADS-box gene, expressed specifically in sporogenic structures. *Gene* 253: 31-43

Takaso, T. & Bouman, F. (1986). Ovule and seed ontogeny in *Gnetum gnemon* L. *Bot. Mag.* Tokyo: 241-266

Tandre, K., Albert, V.A., Sundas, A. & Engström, P. (1995). Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Pl. Mol. Biol.* 27: 69-78

Tandre, K., Svensson, M., Svensson, M.E. & Engström, P. (1998). Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J.* 15(5): 615-623

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

Theißen, G. & Saedler, H. (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law revisited. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 628-639

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

Theißen, G. & Saedler, H. (1999). The golden decade of molecular floral development (1990-1999): a cheerful obituary. Dev. Gen. 25: 181-193

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

Töpfer, R., Matzeit, V., Groneborn, B., Schell, J. & Steinbiss, H. H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucl. Acids Res. 15: 5890

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

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R.A. & Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature 252: 169-170

Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. & Hake, S. (1991). The developmental gene *KNOTTED-1* is a member of a maize homeobox gene family. Nature 350: 241-243

Wagner, D., Sablowsky, R.W.M. & Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of *APETALA1* by LEAFY. Science 285: 582-584

Weigel, D. & Meyerowitz, E.M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. Cell 78: 203-209

West, A.G. & Sharrocks, A.D. (1999). MADS-box transcription factors adopt alternative mechanisms for bending DNA. *J. Mol. Biol.* 286: 1311-1321

Wettstein, R. von (1914). Phylogenie der Pflanzen. In: Hertwig, R., Wettstein, R. von (Hrs.): Abstammungslehre, Systematik, Paläontologie, Biogeographie. (Leipzig, Deutschland: Teubner) pp. 439-452

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

Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. & Theißen, G. (1999). MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Scie.* 96(13): 7342-7347

Wittich, P.E., de Heer, R.F., Cheng, X.-F., Kieft, H., Colombo, L., Angenent, G.C. & van Lammeren, A.A.M. (1999). Immunolocalization of the petunia FLORAL BINDING PROTEINS7 and 1 during seed development in wild-type and expression mutants of *Petunia hybrida*. *Protoplasma*, 208: 224-229

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

Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Feldmann, K.A. & Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-39

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

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

Zhang, H. & Forde, B.G. (1998). An *Arabidopsis* MADS-box Gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 276:407-409

Zhang, H. & Forde, B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Experimental Bot.* 51(342) MP Special Issue: 51-59

Zhao, D., Yang, M., Solava, J. & Ma, H. (1999). The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev. Genet.* 25: 209-223

8. Abkürzungsverzeichnis

al.	alii
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine (Rinder-) Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMS	Dimethylsulfat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NBT	Nitrblau-Tetrazoliusalz
p.A.	zur Analyse
PVP	Polyvinylpropylen
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (funktionelle Einheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-P	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
z.B.	zum Beispiel

9. Nomenklatur

Gen: Großbuchstaben, kursiv, z.B. *GGM10*

Protein: Großbuchstaben, z.B. LEAFY

Mutanten: Kleinbuchstabe, kursiv, z.B. *svp*

10. Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung 1: Domänenstruktur der MIKC-Typ MADS-Box-Gene

Abbildung 2: ABC-Modell der Entwicklung der Angiospermen-Blüte

Abbildung 3: Antophyten- versus Anti-Anthophyten-Theorie

Abbildung 4: Schemazeichnung einer Ephedraceae

Abbildung 5: Schemazeichnung von *Welwitschia mirabilis*

Abbildung 6: Weibliche Reproduktionseinheiten von *Gnetum gnemon*

Abbildung 7: Männliche Reproduktionseinheiten von *Gnetum gnemon*

Ergebnisse

Abbildung 8: Phylogenierekonstruktion einiger pflanzlicher MADS-Box-Gene

Abbildung 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gene GGM1-GGM19

Abbildung 10: STMADS-Motiv

Abbildung 11: Vergleich der gesamten Aminosäuresequenzen der B- und B_{sister}-Gene

Abbildung 12: Vergleich der C-terminalen Enden einiger B- und B_{sister}-Gene

Abbildung 13: Autoradiographien der *Southern*-Hybridisierungen der Gene GGM10-GGM13

Abbildung 14: Autoradiographien der *Southern*-Hybridisierungen der Gene GGM14-GGM17

Abbildung 15: Autoradiographien der *Southern*-Hybridisierungen der Gene GGM18 und GGM19

Abbildung 16: Autoradiographien der nicht-stringenten *Southern*-Hybridisierungen des Gens GGM12

Abbildung 17: Autoradiographien der *Northern*-Hybridisierungen der Gene GGM11, GGM12, GGM14-GGM17 und GGM19

Abbildung 18: *In-situ*-Hybridisierungsexperimente der Gene GGM7 und GGM15

Abbildung 19: *In-situ*-Hybridisierungsexperimente der Gene *GGM9* und *GGM11*

Abbildung 20: Autoradiographien der *Northern*-Hybridisierungen der Gene *GGM13* und *ZMM17*

Abbildung 21: *In-situ*-Hybridisierungsexperimente des Gens *GGM13*

Abbildung 22: *In-situ*-Hybridisierungsexperimente des Gens *ZMM17* in weiblichen Infloreszenzen von *Zea mays*

Abbildung 23: *In-situ*-Hybridisierungsexperimente des Gens *ZMM17* in männlichen Infloreszenzen von *Zea mays*

Abbildung 24: Exon/Intron-Strukturen der Gene *ZMM17*, *GGM13*, *DEF* und *AG*

Diskussion

Abbildung 25: Schemazeichnung des Ursprungs der MADS-Box-Gene in der Evolution der Gefäßpflanzen

Abbildung 26: Wie die Landpflanzen das ABB_sC der Blütenentwicklung lernten

cDNA-Sequenz des Gens *GGM10*

```

1          60
<TCGACAAAGTGACGTTCTGCAAGCGCGTGGCGGTCTCATGAAGAAGGCTTACGAGCTTTC
< R   Q   V   T   F   C   K   R   R   G   G   L   M   K   K   A   Y   E   L   S
61          120
CGTTCTTGCGACGCCGAAGTGGCTCTCATATTCTCCAGCCGCGCAAACCTCTATGA
  V   L   C   D   A   E   V   A   L   I   I   F   S   S   R   G   K   L   Y   E
120         180
GCTCGCTACAAGCAACAAAAGTATGATGTCTACTCTTGAGAGATATCAAAGAAGCTCTGC
  L   A   T   S   N   K   S   M   M   S   T   L   E   R   Y   Q   R   S   S   A
181         240
AACTGGAAAACAACCTTAATCTTACCTGGAGCTCAAATGAGAAGCTGGATTTAGAAGT
  T   G   K   Q   L   N   L   Y   P   G   S   S   N   E   K   L   D   L   E   V
240         300
AAAATTCTCGTAATCAAGTTGAGCAATTAAAGCTACCAACAGGTATTTGATGGGAGA
  K   F   L   R   N   Q   V   E   Q   L   K   A   T   N   R   Y   L   M   G   E
301         360
AGAACTGGCAACCATGTCTTAGATGAACATAATGAATTAGAACACTTCAGAAAGG
  E   L   A   T   M   S   L   D   E   L   N   E   L   E   A   Q   L   Q   K   G
360         420
AATTAATCAAGTGAGAGCTAAGAAGACTGACTTGATGTTGGAGGAAATTAAAGCACTTCA
  I   N   Q   V   R   A   K   K   T   D   L   M   L   E   E   I   K   A   L   Q
421         480
GAATAAGGAGCATATTTAAGGATGAGCAATATCATGCTGCAAGGAAAGCTTGATGAGTG
  N   K   E   H   I   L   R   M   S   N   I   M   L   Q   G   K   L   D   E   C
481         540
TACAAATTGTAAAGATTCAAGGTTCATGGATTATAACAACTAGCTCTACTTCTCATGC
  T   N   C   K   D   S   R   F   H   G   F   I   T   T   S   S   T   S   H   A
541         600
TCCAGCATATACATGTGGATTCAACCTGAATAATCAATCGCTTAGTTCAACTATAGAAAT
  P   A   Y   T   C   G   F   N   L   N   N   Q   S   L   S   S   T   I   E   M
|→ 5' UTR
601         660
GTAAACCCATAACACTTACTCAATTAAATAATTCTGACTTGTAAATATGAAACT
  *
661         720
GTATACTATGTTGGAACCTTTGCTATGCTTCAAGACCATCGCATATGATTACTTAAA
721         756
CTCTACTGTAAAATTGTTTATGTATTAACTTGGAT

```

Legende für Anhang A – J: Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die von ihr abgeleitete Aminosäure-Sequenz angeben. Aminosäuren der MADS-Domäne sind dunkelblau markiert, die der K-Domäne rot und Aminosäuren der I-Domäne und der C-terminalen Domäne sind schwarz gedruckt. Start- und Stopcodon sind jeweils unterstrichen, Pfeile oberhalb der Sequenz weisen auf das Ende des 3'UTR bzw. den Anfang des 5'UTR hin. Ein „<“ am Anfang einer Sequenz deutet auf deren Unvollständigkeit hin.

cDNA-Sequenz des Gens *GGM11*

1 TCTCTGAAACGGAATTCCGAGGTTCTGAGCGAGGCGAAGAGAAATGACGGCCTGAAG 60
 61 AGGTTTCAGTCGGTCTGGTCAGGAGTAGTAGTAGTGCAAATTGCGAAGTTGAGAGAGA 120
 121 GAGAGAAAGGAGAGTCTGGCTTTGTTACTTCCAAGGAGAAAGGAGGGAGGC 180
 181 AGAGTCGAGCTGAAACGCATCGAGAATAAGATCAATCGTCAGGTTACGTTACGTTCAACGC 240
 R V E L K R I E N K I N R Q V T F S K R
 240 CGCAACGGCCTGCTGAAGAAGGCGTACGAGCTCTCCGTGCTATGCGATGCCGAAGTTGCT 300
 R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A
 301 CTCATCATTTCTCCAGCCGCGAAAGCTTACGAGTTGGAGCGCCGGACTTGAG 360
 L I I F S S R G K L Y E F G S A G T L K
 361 ACATTGGAGCGTTACCAAAATGTTCGTATGCCTTGCAAGAATCTAATAACTCAGATCGT 420
 T L E R Y Q K C S Y A L Q E S N N S D R
 421 GATGCCAGACTTGGCATCATGAAGTAAGCTAAAACAAAGGTGAAATTACAA 480
 D A Q T W H H E V S K L K T K V E I L Q
 481 CGTTCTCAAAGGCATCTTTAGGTGAAGATCTTGGACCATTAAAGCATAAGGGAACACAA 540
 R S Q R H L L G E D L G P L S I R E L Q
 541 ACCCTGAAAGACAAATTGAGGTAGCACTAACACAAGTTGAGCAAGAAAGACACAAGTA 600
 T L E R Q I E V A L T Q V R A R K T Q V
 601 ATGATGGACATGATGGATGATCTAAAGAAAAGGAGAGGCTTGCAAGAAGTTAATAAA 660
 M M D M M D D L K K K E R L L Q E V N K
 661 TCTCTGCGAAAAAGCTTGACAAACAGAAGGTCAAGTTACAGTAATGCACAGCTACAA 720
 S L R K K L D E T E G Q V Y S N A Q L Q
 721 GCTGCTCCTCCTGAATGGGATTCTAATGCAATAGCAAACCCGTATATGCTCTCCT 780
 A A P P P E W D S N A I A N P V Y A L P
 781 CCAACCCACAAATGCTGTTGACTGTGAGCCTACTTGCAAAATTGGGTATTATGCTCCTG 840
 P T P Q N A V D C E P T C K L G I M L L
 841 CTGAGCCAAGCATTCCCAGGCATGATCATCCTCAGAACAACTACATACAGGGTGGTGG 900
 L S Q A F P G M I I L R T T T Y R G G W
 901 TCTAATCTAATCCCTGATGCAAACAAATCAGTAGAAATCTATTATGGAATATGGTACCTG 960
 S N L I P D A N N Q *
 961 TAAAGTATGTGTTATATGGGATTTACTATTTAAAATTTCCATGTTAGTCTAAAGTT 1020
 1021 CATCAGTCAGAACATATTCCTAGCTAACGCTTGCAATGCAGTTGACGTGGTTTTATT 1080
 1081 TAACTGGGGATCGGAAGCTATATAAGCATGGACAGCTTTGTAATGTATTCTGGACAA 1140
 1141 ATTTACTTTATAAAAGTACTGGCATAGTATTATGATAAAAAAAAAAAAAAAA 1196

cDNA-Sequenz des Gens *GGM12*

1 CCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAG
 61 TGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTGGCACGAGGGGGCAGCCTCTGATTCAAACCCAGA
 121 TAGATATAAGTAGAGAGAAAATCTGGTAAGGTTCTCTGCCACACCCAGAACTGAAGCA
 181 <- | **5'UTR** 240
 AACTGCCATGGCGAGGGAGAAGATCGAAATAAAGAAGATTGCGAATGCAACCGCAAGGCA
 M A R E K I E I K K I A N A T A R Q
 241 300
 AGTCACATTTCAAGAGGGAGGAGGAGGATTATTCAAGAAGGCTCACGAGCTATCCATTCT
 V T F S K R R R G L F K K A H E L S I L
 301
 GTGCGATGCAGAGGTGCGCTCTCATCATCTTCATCCACCGGAAAGCTCTACGACTACTG
 C D A E V A L I I F S S T G K L Y D Y C
 361 420
 CAGCTCCAGCATGAAGGTGCTCCTAGAGAGGTACGAGAACGATTTCGTGAGAAAGGCAC
 S S S M K V L L E R Y E N D F R E K G T
 421 480
 GGCTAGAGATCAGGAGATAGACAATGGAGATGTTCTGAAAGCTCAACAGCAGGTGGCGGA
 A R D Q E I D N G D V L K A Q Q Q V A E
 481 540
 GCTGGAGCGCGCGCAGACAGATGTTAGGAGAAGATCTGGAAGGACTGTCGCTAAAACA
 L E R A R R Q M L G E D L E G L S L K Q
 541 600
 ACTGCAAATCCTGGAGGCACCTTGAGACTGCTCTGAATCGCGTAAGGAACCGCAAGGG
 L Q I L E A N L E T A L N R V R N R K G
 601 660
 AGTTCAGATTCTGAAGGATATCAACGATCTTCAGAGAAAGGGCAAGAGATACTAGAGGA
 V Q I L K D I N D L Q R K G Q E I L E E
 661 720
 GAACAAACAGGCTTCGCAACAACGTAGGGCAGAGGTACAACAACAGAGCACCTTGGAGAA
 N N R L R Q Q L R Q R Y N N R A P L E N
 721 780
 CTTCGAGGCAGAGGAGTCTTGCAATTGGGCAGCTGTTAGCCCATGAACCGCCTCAATC
 F E A E E S L P I G Q L L A H E P P Q S
 781 840
 ACAATCTTCAGATTCCATATCGACATCCTTCAGCCTCAAGCTCGGCAATGGAGTAGTCAT
 Q S S D S I S T S F S L K L G N G V V I
 841 **3'UTR** | ->900
 TCCTGACAATGAAGTCTCTGACACTTCCCTGCATCTAGGGCTCCCTCCACTCTTGAGA
 P D N E V S D T S L H L G L P S H S *
 901 960
 TGCTCTGAAAAACGGAAGCAGCATCTGCCTAACCTGAAATCCTGACAGCAATCAGTTGCTGC
 961 1020
 CAAGGTCTTCCAACAGAATTGGGAATGCTCTCTTTCTGTCGTTGACTTAACCT
 1021 1080
 GTTTATGCACCTAACAGACTGCAACTCTGGTTCTGAGAGAACACTTAAT
 1081 1140
 TATATCTTCAGACATCGAAGTCTAACAAATTCTACCGTAGAGCATTCTATCAATATAC
 1141 1200
 TTCTCCTAGCAGCCAAGGAATGCGTAGGGCATCTGCTGCTTAATCTGAACATTCTCT
 1201 1260
 GATAAAATATGTATCTCAAAAGCTATTAAAAGTGGATAACTATGGTATAAAAAAAA
 1264
 AAAA

cDNA-Sequenz des Gens *GGM13*

1 CGATTCATCAGAGCAGATACTGATTCTGGTTGGTGCTCTGCTGCTCTGGGTACA
 61 120
 GGGACGAAAAGGATAGAGAGAGAGAGAGACCAAGCAGTGGTAGTGCTGGTTCTG
 121 180
 180
 GGC GTTGTGGCCGGGTACGATTGGGAATAGCAGCGAAAATTTGTTGGTATTAC
 18 <-| 5'UTR 240
 AGTCAGGCATGGGTGAGGAAAGATTGAGATCAAAGGATCGAGAACACAACGAACAGGC
 M G R G K I E I K R I E N T T N R Q
 241 3030
 3030
 AGGTGACTTTCTCAAAAAGAAGAGGCGGTCTGCTTAAAAAGGCGCATGAGCTCTCCGTT
 V T F S K R R G G L L K K A H E L S V L
 301 360
 TGTGTGACGCAGAACTCGGCCTCATCATCTTCTCCAGCTCTGGCAAGCTTTGAGTACT
 C D A E L G L I I F S S S G K L F E Y S
 361 420
 CAAGCGCTCATCCAGCATGAAGAAGATCATAGAAAGGTACCAAAAGGTATCCGGAGCAA
 S A S S S M K K I I E R Y Q K V S G A R
 421 480
 GAATTACAGAGTATGATAACCAGCACCTACTGTGAGATGACAAGGATGAAGAACGAGA
 I T E Y D N Q H L Y C E M T R M K N E N
 481 540
 ATGAAAAGCTTCAAACGAACATCAGGAGAATGATGGGTGAAGATCTGACCTCCCTTACCA
 E K L Q T N I R R M M M G E D L T S L T M
 541 600
 600
 TGA CTGAACTGCATCATCTAGAACAGCAATTGGAATCTGCTTCCAGGCCGGTCAGAAGTA
 T E L H H L E Q Q L E S A S S R V R S R
 601 660
 660
 GAAAAAAATCAGTTGATGCTGCAACAGCTAGAGAATCTCCGTAGAAAGGAAAGAATCCTGG
 K N Q L M L Q Q L E N L R R K E R I L E
 661 720
 720
 AGGATCAGAACAGTCACCTTGAGATTACTTGCAGAGCAGCAAGCAGCAGTGGAGGAG
 D Q N S H L C R L L A E Q Q A A V E G V
 720 780
 780
 TTCAAGAGCCACTGCTAGAATTGGAGTATTCTGTCCTCCTCCAGATAATAAACAGCAG
 Q E P L L E F G V F C P P P D N K T A A
 781 840
 840
 CAGCAGCAAATGCAGGCCCTTGCACTTGGGTACATCATCTCCTGCATTAGGCTGCAAC
 A A N A G P L H L G H H L P A F R L Q P
 841 900
 900
 3'UTR | ->
 CCACTCAACCAAATCTCCAGGAATCCTCCATTGTTCAAATAGACCTGTTCTTCAGCTCT
 T Q P N L Q E S S I V P N R P V L Q L *
 901 960
 960
 GATGCTGTTGATTCACTGATTCCAACGGGGTGGATGAAGAACAGCCTGATGTGTACAATC
 961
 1021 1080
 1080
 TTCAGGGCGAGTAACATGTGGCTTGCTTCATGCCAGACGGAACCTCTGATCAATCCA
 1081 1140
 1140
 1141 1200
 1200
 AAGATGAAACATTGTTATTGAATCAGCTCTAGATGAAACTCTGTTCTATAGCAC
 1201 1260
 1260
 CGGCAGAAATATCGATAATGAATATGTAGTTAATGATATAAATTCCGGATCGCCTTCAT
 1261 1296
 1296
 TCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

cDNA-Sequenz des Gens *GGM14*

1 <AAAGCATACGAGCTTAATGTTCTGTGTGAAGCCGATGTTGCCGTGCTTATTTACTCCGAC
<K A Y E L N V L C E A D V A V L I Y S D
60 61 120
TCCGGAAAGTTCTACCAATTCTCCAGTCCAATGATGAATACAATATTGGCAAAATACAAA
S G K F Y Q F S S P M M N T I L A K Y K
121 180
TTTTGTTATCATTATGGATGGATGTTGATACAGAAAAGATTGGTGCAGATGACAAGGAC
F C Y H Y G M D V D T E K I G A D D K D
181 240
AAACGTGAAAATTACTTACGAGAATCAAGTTACTTGAACAAACACAAAAGAATATTATG
K R E N L L T R I K L L E Q T Q K N I M
241 300
GGGGAGGATCTGGATTCACTATGCCATGTCTTGGCGACTTGAAAAAAAGCTCAA
G E D L D S L S A M S L E R L E K K L Q
301 360
AGTACAAAACGAAGGGTTTGAATCGCAAGATCAAACGTGTTACGAGGAGATCCATGTA
S T K R R V L N R K I K L L Y E E I H V
361 420
TTGGAAGACCAGGTACGCAATAGAACCGTTGAAAACAAAACCTAAAAGCCCAACAAACA
L E D Q V R N R T V E N K T L K A Q Q T
421 | -> **3'UTR** 480
ATTGGCTGAACGAAACAATACTGGACCAATGCTTCAGCAAAAATGAAATCAGTGGAAA
I G * 540
ATCCAACGGTGAAGGAATATGCGAAGTATAACCCATATCGAATCATAATTATCCAAA
541 600
TGTTCTAAAAGAAGAAAATAATTGTAAGCTGGAACCAATCTGTAGAACTAATAACTCG
601 660
GAACATGTCATATTCAAAGTCTATGTAATATAAATTCTGTAGATCTCTGTTAGCTG
661 720
CTTCCTTACAGTTAGAAAATTGAGGCAAATCTTTAATAGAAGAAAATAAATAA
721 774
GTTAAATAATGATCGTATTAGTTGGAGAAAAAAAAAAAAAA

cDNA-Sequenz des Gens *GGM15*

1 TGGTTCCGTATTCGAAGTTCAAACCTAGAATATAGGCTGCTGGAAGTTGACCTGCA
 61 120
 AGCCTCCTCTTCGTTCTCATTCTACGTTGTTCTCATTGCAAGAAG
 121 5'UTR <- | 180
 CGTTACTACTGTAAAGGAAAGGTATGGGAAGGGCAACTGGAGATCAAGCGGATCGAAA
 M G R G K L E I K R I E N
 181 240
 ACCTGACGAACAGGCAAACGACCTTGCAAAGCGAAGAATGGCCTCATGAAGAAAGCAA
 L T N R Q T T F A K R K N G L M K K A K
 241 300
 AAGAACTATCTATTCTTGACGCGCAGGTTGCTCTCATCGTCTCTCCACCGAA
 E L S I L C D A Q V A L I V F S P T G K
 301 360
 AGCAGTTCATAGAGGCTCACGGTAATAATGCCGAATGCACCATAGAAAGCGTGAGGGATG
 Q F I E A H G N N A E C T I E S V R D V
 361 420
 TCATAGAGAGGTACAAGCAACAATCCAAGGAAAAGCTACTTGATTCAAGAGATGAGAATC
 I E R Y K Q Q S K E K L L D S E D E N L
 421 480
 TTGCTAACGAGTTGGAAAAGCAGAAGAAACAATCTGCAGATCTGCAAACCAAATTGGAGC
 A N E L E K Q K K Q S A D L Q T K L E H
 481 540
 ATCTGACTGGCCAGGATATTAACCTGCTGAGCCCAGATGCTCTCGGTGACTTGGAGCATA
 L T G Q D I N L L S P D A L G D L E H I
 541 600
 TTTTCAAGAGGCCTTACAGAGTGCCTCAGAAGAAGATCCAACGCTGGCTCAGTAAGA
 L Q E A L T R V R Q K K I Q R W L S K K
 601 660
 AGATTGAAATGGAGAGACGTGGCTAAGCTAAATGAATATAAGAATGCACGTGAATGGAG
 I E M E R R V A K L N E Y K N A L N G V
 661 720
 TGTATTGCAGGCACAGGGATATCAGCATTACAATCACGCTCATCATGGAATAATGGCAG
 Y S Q A Q G Y Q H Y N H A H H G I M A A
 721 780
 CATCGGTATCGGCTGCTTATCACCGCGTTCAACCTACCCAGGAAATCTGGACGATGTGT
 S V S A A Y H R V Q P Y P G N L D D V C
 781 | -> 3'UTR 840
 GCTACCAACCACAACCAATCTCAGCTAAGGTTTGATGACTTCAAAGCATGCC
 Y Q P Q P N L Q L R F L *
 841 900
 TTAGCACAAAGGCAGATGTATTGCAAACATTACAAGTCTATGAATGGTGCATGCCTT
 901 960
 GTTGAACATCACCGTGATGTGAAAAAATTAAAGAGAACCTGGATATTCACATGTT
 961 1020
 CTATTGAAGTATTTATATGAAATATACACATCTGGCAATGATGTTCTACAAAAA
 1021 1043
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

cDNA-Sequenz des Gens *GGM16*

1 GTTTTATTTTTCTCGCCTATCCTACTGTGTTGAGGTAGCCTAGGTTAGCTTAG
 61 **5'UTR** <- |
 GGTTTTGGCGAATGAGATGGCAGAGGCAAGATTGAGATCAAGAAAATCGAGAATCCC
 M G R G K I E I K K I E N P
 121 AGCAGCAGGCAGGTTACATTTCAGAAAGAAGAGGAGGTCTCATCAAGAAGGCGAGAGAA
 S S R Q V T F S K R R G G L I K K A R E
 181 CTTGCTGTTCTTGTGATGCAGAGATTGCCCTGATCATTTCATCCACTGGCAAGCTC
 L A V L C D A E I A L I I F S S T G K L
 241 ACTGACTGGTGTAGTCACAACATGAAGGATACGCTGAAGAAGTTGAAAGAATCGCAGGC
 T D W C S H N M K D T L K K F E R I A G
 301 AGTAGTTCTGCAGAATATGAACGACATCAATTGCATTGGATATTGAGACGAGGAAAAGA
 S S S A E Y E R H Q L R L D I E T R K R
 361 CAGAATGAAGAGCTTCAGAACTTGATAAACTACAAATTGGGTGTGGGAATAGATCATTG
 Q N E E L Q N L I N Y K L G V G I D H L
 421 AGTTGCGAAGAACTGGAGTGTCTAGAGGAAGACCTGGAAAACATTGTGAGGAATGTTAAG
 S C E E L E C L E E D L E N I V R N V K
 481 AGAACTAAGGACAAGCAAGAAGAGAGACTGACAGACAGGCTCCGAAGAAGGGTTGGCTTC
 R T K D K Q E E R L T D R L R R R V G F
 541 CAAACAGCAACACTTGAGAAGATTATGGGTGAGATCCGGTACCATGACACATACGTAGAG
 Q Q Q H L R R F M G E I R Y H D T Y V E
 601 AAGGAACCTTGGGAAGTTGCTGTCAACTAGCCCAGGAAAAGATCACTGCCAGAGAGGAA
 K E L W E V C C Q L A Q E K I T A R E E
 660 **3'UTR** | -> 720
 AAACATCATGGTGTACCATGACTGTGCTCTGCTTCATTCAGACATGAATAAGTTAGG
 K H H G D H H D C A L L H F R H E *
 721 780
 TTTAATGTACCATACCTAAACTTAGAAGTAAAGCAGCTTCAGCTATGCTTGGGTTGAG
 781 840
 TATAGTATGTTATGTAATTATTTAAGGTTAATATAGCTTAGTATACTTCAGGGTCA
 841 900
 CAAGCTCTCATTAGAGCTGGGTGCACTTACACTAAAGTAGGTTCTCATCCGGTGG
 901 960
 TCCATCTACGTAGACCCATTGGGAGGATGAGCGTTAACGATTGAATCTTTGGGTG
 960 1020
 ATGATCCCTCATCTTAAGAGATCTTCACAAGTTGCAATAGGTTGAGCATTTCCTA
 1021 1080
 AATTGACAATAGAGAAATCATTGAGTGCATTACATAATAATAATTGAGTAATGA
 1081 1107
 TACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

cDNA-Sequenz des Gens *GGM17*

1 GACTAAAAATGCAATTATCAAACAAAAATGCCACTCCAAACACAAATTAGTTGTGAT 60
 61 120
 121 AATTTAATTGGGAAAAAACCAGCAGTTCTCTCCTCAAAATGTGCATAATTCCACACGCTT 180
 181 ATTCAATGCAACGATGATGGTCACCATAACTCTCAAAATATAATTCAAACATTCTGAAT 240
 241 AAAAGAAATTCTAAAATACCCATTTCGTTGACTGGCACCCCTATTGGAAAAAGA 300
 301 TCATCCTGCTCAGATAACATCCGAAATCCAAACCGTAAATTCCAAACTGTAGGCAACCTA 360
 361 AATTTATCCGAAATCCAAATGATTAATTCCAAATCCGAAACCAACCAATTGACCA 420
 421 AACACCAGATTACCGCATTCTAAACTCTTAATCCCACGCACCTAAACTTATCCAAAAT 480
 481 CCATGACTATAAAATCACAAAGAAATTGTCATCGCTAGGACAAGCATTGAATTGCTGA 540
 541 ATTCAAGAAAGAAACCAAAAAAGAACAGCAAAAGAAAAGAAGAACAGATCATCAATCAC 600
 541 <- | **5'UTR**
 541 TCAAAAAAATGGGACGAGGAAAATCGAGATCAAGAGAACATCGAGAACTACAGGAGCCGGCA
 601 M G R G K I E I K R I E N Y T S R Q 660
 661 GCGCACATTCTCGAAACGCCGAGGGGGCTCTGAAGAAGGCTCGCGAACTCGCCGTTCT 720
 721 A T F S K R R G G L L K K A R E L A V L 780
 781 CTGCGATGCAGAGATCGCGCTCATAATATTTGAGCAGCGGCCGCTCTTCATTGCGC 840
 841 C D A E I A L I I F S S S G R L F Q F A 900
 901 721 CAGTTCTCCATGAACGCAACCTAGCTCGCTACTGCAGACGCTGCGAAGAAACCAAAA 960
 961 S S S M N A T L A R Y C R R C E E T K N 1020
 1021 781 CCCAGCAGCAACACCAGGCCCTCGAGAACGAAAGATAACAAAACCGGAAACGGGATCCGA 1080
 1081 P A A N H G L E N E D N K T G N A D P D 1140
 1141 GATGGGAGAGCAGATTGAGGATATGAGACTGGATGAGCTCGCGCAGCTGGAACGAGATGT 1200
 1201 1021 GGAGGCAGGCCATGCGCAGACTCCGGCCAGTAAAGAGAGTAAGATGATCGGCAGAATTGA 1260
 1261 E A A M R R L R A S K E S K M I G R I E 1320
 1321 AGAGGCCAGGGTTGAAAGCTGAAATTGAGAACAGTTGAGAGATCTGTAACCGCTTACA 1380
 1381 TGGGATCGGAGCTGCAGAGATCTGCTGTTACAGTTCTGGCGCGTTGTTCAACTCCG 1437
 1437 ACCTGTGTCTGTAGATTGATTGGATTGGAGAAATGTGAAATAA
 1437 TTTGATTGATCTGAAAAAAAAAAAAAA

cDNA-Sequenz von *GGM18*

1 >AAAATAATCGACAAGTGAGTTCTCCAAGCGTAGGAATGGCTGATGAAGAAGCGTAC
 >K I N R Q V S F S K R R N G L M K K A Y
 60 61
 120 GAGCTATCGGTTCTGTGCGATGCCAGCTCGCGCTTATCGTCTTCTCCAACCATGGCAAG
 E L S V L C D A Q L A L I V F S N H G K
 121
 180 CTCTTACAGTATTCCCTTACCAAGCATAAATAGCATTCTGGAAAGATACAAAAATGTTCT
 L Y Q Y S S T S I N S I L E R Y K K C S
 181
 240 GCTCTTCATTGAAAATGATAACGCAGGAAAGTCAACAAGTAAAGTTATCAAAACATCAT
 A L H F E N D T Q E S Q Q V K L S K H H
 241
 300 GCAAAAGTCATGATTTAGAAAAATCAATAAGGAATTAAAGAGGTGAAGATATACTGAT
 A K V M I L E K S I R N L R G E D I H D
 301
 360 CTTAATGTTAAGGAACCTCAATCATTAGAGCATACTAGAACAAACTTGAAGCAAGTA
 L N V K E L Q S L E H T L E Q T L K Q V
 361
 420 421 AGATCATATAAGGTTGATGCTATACGGGGTATCATACTAGAACACTGGAGAGAAAGGAACAA
 R S Y K V D A I R G I I H E L E R K E Q
 480
 481 GTCTGGAGGATGCCAATATGGCGCTGCGCATGAAGATTGCCTATGCCAATGCCAGGAGA
 V L E D A N M A L R M K I A Y A N A R R
 540
 AATTACCGGACACAATTACATTGATGGATCGCCTGGACCTTAACCCAGCAAATCACC
 N S R T Q L H F D G S P W T L T Q Q I T
 541
 541 | -> **3'UTR** 600
 TCTGCTCCTGCTGCTGTAATTCTGCTTGCACGCATTCTAAACAGAACTGTGAATGTCA
 S A P A A V N S A C T H F *
 601
 660 TGATGCCATAAAGACATGAATAACAAAAATTTCTAAATCATGTGTGTGAAAACAGCA
 661
 720 AAATGGCAAGCAAGGTTGAGTAGATGAAACGTTACCGTGATCTTCAAAGACGTAAATAC
 721
 780 GTCAATGTTGATACATTGGACGGTGGCTAACGGCAGCACCTAGAACCTCAATATCT
 781
 840 TAAAGATGTATTTTAATAACTCGTTACAAGTTAAAGATATGGTTATACATCATGTGT
 841
 900 TTTATATGTAGCATATGTTTTAAACATACCCTGGATGAACTCTCAATTCTCCATT
 901
 960 CATGTTCTGCAGTTAGCTCTTTAACAAAGGTACTCCATATGTTATGTAAGGATTTCAA
 961
 1020 CACAAACAGTAATTCTTATTAGCATTATGGAGTTCAACTGAAAAA
 1021
 A

cDNA-Sequenz des Gens *GGM19*

1 <AAGAAGGCCAACGAGCTCTCCGTCTCTGCGACGCCAGGTGGCCTCATCGTCTACAAAC
 <K K A N E L S V L C D A E V G L I V Y N
 60
 61 120
 ACGGCTGGAAAGCTTCGAATTCTCCAGCACCAGCATGAAGATGCTCGTCAACAAGTAC
 T A G K L F E F S S T S M K M L V N K Y
 121 180
 TTGCGCCATCAAGAACACTTCAGAGTCACACATTGCTGAGCTGCAAGGGCAGGAGGAT
 L R H Q E S L Q S H T F A E L Q G Q E D
 181 240
 AATGTTGAGATAGAAAAATTAAAAGAAGATATCAGTAACCTATGCCGCCTTGCAGAGGC
 N V E I E K L K E D I S N L C R L C R G
 241 300
 GATATTACAAAGGGTTCAGCTTAAAGTTGACGAGCTGGAAGAAACTCTGGAATG
 D I H K G F S L K M F D E L E E T L E M
 301 360
 GCACTAAAGTGCATTCAGAAGAACAAACGAGAAATATTTACCGACCAATGAATTTCCTC
 A L K C I Q K K Q R E I F T D Q M N F L
 361 720
 CAAGCACAGGAACATAGGGCGTTACGAGAAAGCACACAACTACAAAAGAGGCTTGAAGAT
 Q A Q E H R A L R E S T Q L Q K R L E D
 721 780
 TATTCAAAAGAAGCTATGTTCAACAATATAAGTATTTGATAACTATGGGCTTCCAGT
 Y S K E A M F Q Q Y K Y F D N Y G A S S
 781 840
 AATCGTACACACAAATTTCTAACATTACAAACAAAGATGATTCACCCCTATGAGACC
 N R T H K F S N I T N K D D F N P Y E T
 841 | -> **3'UTR** 900
 TCTCTAACGTTAACGGTTGTGAAAGCTATGTTATTGGCATGAGAGCTGAGAACTGATT
 S L S L R L * 960
 TTTAAGAAATAAGATGTAGGAGCATGTGGACTGTGTAAAAGAAGTTGCTTAACTTATAT
 960 1020
 TTCTAACGTTAACGGTTGTGAAAGCTATGTTATTGGCATGAGAGCTGAGAACTGATT
 1021 1080
 CTAATGATATACAAGTGAATACCTTAACTAGTTATGTATCATTAAAGGCATCTTAT
 1081 1140
 GTGTTAAAAGAATGTATGAACCTTTATGAGCATATGTTATAAATGCCTCTATTAAGCAA
 1141 1183
 TATATTAACTACTTTGAATATAAAAAAAAAAAAAAAA

Genomische Sequenz des Gens *ZMM17*

1	CTTGGATCGA	CCGACCGGCC	GGGGTGGTCG	CCATGGGACG	CGGGAAGATC	GAGATCAAGC	GGATCGAGAA	CTCGACGAAC	80
81	CGGCAGGTCA	CCTTCTCCAA	GCGCCGGGGC	GGGCTGCTCA	AGAAGGCCAA	M G R G K I	E I K R I E N S T N		
	R Q V T	F S K R R G	G L L K K A N	E L A V L C D	A R V	CGAGCTGC	GTGCTGTGCG	ACGCGCGGT	160
161	CGGCGTCGTC	ATCTTCTCCA	GCACCGCAA	GATGTGCGAG	TACTGCGAGC	CTGCCCTGCAG	GTTGGTTACG	CTAGCTAGGC	240
	G V V I F S S	T G K M F E	Y C S P A C S						
241	GCTAGCTTC	ACTGATGGCT	CATGATCTG	CTTCTGTTCG	ATCTGCTTC	TGCCCCGCA	GTCCCCATCG	ACCAGATCTT	320
321	ATATTATCG	TGTTGCTAGC	TCGCTCATGC	GTGCTAGATT	CTTGTACCTTG	ATCCCGATGA	AACTGCGGAT	CGATCCGTGT	400
401	CTTCTTGTC	CTTTGTTTC	CCGAGGCTTT	TCTTCTACCT	TGTTTTAGGG	CTTGTGAGAA	ACAATCAGTT	ACTGACCTTT	480
481	TGGATTTTT	CCCTGTTTT	TTCTGGCTCA	AGGGTTCACT	AGGGCTAGAT	TGGAAACTTA	AACCCCTTG	GGATCCCCG	560
561	AGATGGAGGA	GAAAACAAA	CTAATTTC	CCTTGATCCC	CGAAAATCCG	GAGGGATAT	ATGTTTCAA	AACTAGTGC	640
641	CAAATCATT	TTAGCATGGT	TTTCCCTCT	TTCTCTTGTAGT	GCTTAGTATG	TACAAAATAT	ATCCCCAAT	CTTCTTTGCT	720
721	GAGTTGAAA	GAATCCGTGG	CGAACATAGG	CACAGGTTA	GTATTAGAC	TGACGACG	GATGCATCAT	GCATCCCC	800
801	CTGTTGGT	TAGTTCTTG	AGAACATACCT	GTGCACTGT	TTTCCCCCT	CTAAGAATCG	TGGAGCTCTT	CTTTTAAGTT	880
881	TTAACCGAGA	ATAATTGGG	GATAAAAAC	AAAGATCTGC	ACCGATCATG	ATCCATGTC	TAGTTTATG	GAGTGAAGTA	960
961	CAGTGGTCTA	TCAACATTGT	ATTGCAAACA	TATACCGGA	CTGAGAAACT	CTAGTTCTT	GGCTTGTGAA	ATAATAAAGT	1040
1041	AGCCTATGGA	ATCCAACATC	TTTCTAAGCC	ATAAAACCT	GAAATCCCAG	ATTGCTCAAT	CACCAAATTC	ATCAATCGAG	1120
1121	TAATTTTCGA	TCCTCTGTAT	ATATCTAGA	GAGAGATTCA	TTAACCTTA	GAAGGCCAC	AGGTGCTTAG	CGATGATGAT	1200
1201	AAGAGTTGTA	CTAATTCTCT	GACGTGTATG	CATGGATGTG	TCTGTTATGA	TGTCTGGCAA	ATTAGCTCTG	AGGGAGCTTA	1280
						L R E L I			
1281	TTGAGCAGTA	TCAGCATGCT	ACCAACAGCC	ACTTCGAGGA	GATAAACCAT	GATCAGGTGC	ATGCAACACT	GGCTTGGCA	1360
	E Q Y Q H A	T N S H	F E E I N H	D Q					
1361	CAGATAAAATT	TAATTAAC	CGCTTATAT	ATATTATGT	ATTGTATATA	CGCATGCATA	ATAGTGTACG	CTCGCACACT	1440
1441	AAAGTGTCACT	CTCGCGGAG	TTTGTGAGC	AAATACTGCT	GGAGATGACA	AGGATGAAGA	ACGAGATGGA	GAAGCTGGAG	1520
	Q	I L L E M T	R M K N E M E	K L E					
1521	ACGGGCATCA	GGAGGTACAC	CGGCGACGAC	CTCTCCTCCC	TCACCCCTCGA	CGACGTCAGC	GACCTCGAGC	AGCAACTCGA	1600
	T G I R R Y T	G D D L S S L	T L D D V S	D L E Q Q L E					
1601	GTACTCCGTC	TCCAAAGTC	GTGCAAGGAA	GGTACATTGC	TGCTATTGTA	TATAGTCCTA	GTCCAAATCT	TGCACTTAC	1680
	Y S V S K V R	A R K							
1681	TGTATTGTC	TGCATTATCA	GGAGCTAATT	AGAACACAGC	AATGGCATCT	AATATTCTAA	TGTCGCTG	TTCCGTACT	1760
1761	ACTCTTGCTG	TCTTGCAGCA	TCAGCTCTG	AAACCAACAGC	TTGACAACCT	GCGTCGCAAG	GTATGCATGG	AACTGCTGAC	1840
	H Q L L N Q Q L	D N L R R K							
1841	AATCCAATGC	AATAGACGCG	TGCACGTTCG	TGTGGTTCTG	AACACAACTG	ACCAATGGCT	GACAGGAACA	AATCTGGAA	1920
	E Q I L E								
1921	GACCAGAAC	CCTTCCTGTA	CCGCATGGTA	ATACATACAT	ACATATACAT	ACATACTCAA	AAAAATGTTA	AATATTCAAG	2000
	D Q N T F L Y	R M							
2001	CTTGGCTGCT	GCTCTTCTCG	ATCTATACAA	GCATGGCTGA	TTCATGATCG	ACGTGTACCC	GGGGCCCTTA	CTGATTTCTT	2080
2081	CGTCATCAGA	TCAACGAGAA	CCAGCAGGCC	GGCTTGACCG	GCGAGGTGAA	GCTGGGGAG	ATGGCGCCG	TGGCGATGCT	2160
	I N E N Q Q A A L T G	E V K L G E M A P L A M L							
2161	GCAGGCCACCG	CCGGCGTTCG	CGCACTCCGC	CACCGCTAC	TACGGCGGGG	AGTCGTCGTC	GTGCGGACAG	GCGCTGCAGC	2240
	Q P P P A F A H S A	T A Y Y G G E	S S S S G T A L Q L						
2241	TGATGTCGGC	GGCGCCCGCAG	CTGCACGCCG	ACGACCTCGG	GTTCCGGCTA	CAGCCGACGC	AGGCCAACCT	GCAGGACCCG	2320
	M S A A P Q L H A D	D L G F R L	Q P T Q P N L Q D P						
2321	GCGGCGCCGT	GGGGCGGCCCT	CCATGGCCAC	GGCCCTGCGC	TGTGATTAAC	TGCGATCAAT	TGGGAGGACT	GTCACATGCT	2400
	A A P C G G L H G H	G L Q L *							
2401	GCATGGAAGA	GGGACTATTAA	TTGGAGCACG	CAGTTCAAG	GTGCAAAGC	TCGTCATGCA	TAATTCGAT	CATATGTTAG	2480
2481	TTTGTCTATCT	GAATAGTTTT	ATATATGCA	GCAATGCAAT	CAATTCTCTG	GATAATAATT	CAACTATTGT	TATGTATCTA	2560
2561	ATTAAGATAG	GTTCGTTAGAC	T 2581						

Legende Anhang K und L: Fett gedruckte Abschnitte der Nucleotid-Sequenz stellen Exons dar. Die abgeleitete Proteinsequenz ist unterhalb der codierenden Bereiche angegeben. Innerhalb des 3'- und 5'-UTR befinden sich keine Introns.

Genomische Sequenz des Gens *GGM13*

```

1      TTGTAATACG ACTCACTATA GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC CGCCGCCAT GGCGCGGGA TTGCCAGTGG 80
81     TAGTGCTGCT GGTTCTGGG CGTTGTGGCC GGGTACGATT GGGAAATAGCA GCGAAAATT TTGTTGGTGA TTACTTTGAG 160
161    TCAGGCATGG GTCGAGGAAA GATTGAGATC AAAAGGATCG AGAACACAAAC GAACAGGCAG GTGACTTTCT CAAAAAGAAG 240
          M G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F S K R R
241    AGGCAGGCTG CTTAAAAAGG CGCATGAGCT CTCGGTCTG TGTGACGCAG AACTCGGCCT CATCATCTTC TCCAGCTCG 320
          G G L L K K A H E L S V L C D A E L G L I I F S S S G

```

an dieser Position fehlt die Intron-Sequenz!

```

321  GCAAGCTC// TT TGAGTACTCA AGCGCCTCAT CCAGCATGAA GAAGATCATA GAAAGGTACC AAAAGGTATC CGGAGCAAGA 400
      K L F E Y S S A S S S M K K I I E R Y Q K V S G A R
401  ATTACAGAGT ATGATAACCA GGTTGTATC ATCTTAAACC AATTCAATTTC TACATGTATA TTTTTGAAG AATGTAACAG 480
      I T E Y D N Q
481  CAAGAATAAA CATCTTGCAA TATTCGTAG CACCTCTACTG TGAGATGACA AGGATGAAGA ACGAGAATGAA AAAGCTTCAA 560
          H L Y C E M T R M K N E N E K L Q
561  ACGAACATCA GGTTTATATA ACTCTAATAG CATGCCTGAA TGCAACCGCA ATTTAAATA ATGCAAGGTAA GTTACTAAAA 640
          T N I R
641  GATAAATAAT ATTCAGGAG AATGATGGGT GAAGATCTGA CCTCCCTTAC CATGACTGAA CTGCATCATC TAGAACAGCA 720
          R M M G E D L T S L T M T E L H H L E Q Q
721  ATTGGAATCT GCTTCCAGCC GGGTCAGAAG TAGAAAAGCA AGACCTCAA CTCTAAACTC TCTACCATTAA AGTTAAACGA 800
          L E S A S S R V R S R K
801  ATAAATTAGA ATTAGATAG TCTAGACGGA AGATAAAGAG CTTAGACCAC TTTTTGTACT GCAGAATCAG TTGATGCTGC 880
          N Q L M L Q
881  AACAGCTAGA GAATCTCCGT AGAAAGGTAA TTGAAGTATA ATGCTAACAA TTTTATAGTT GTTGATTCTGTT ATTTCATTCT 960
          Q L E N L R R K
961  GATGTGTTTG GTTCACTAA TGATGTAAAA AACTATTGCA GGAAAGAACATC CTGGAGGATC AGAACAGTC ACCTTTGTAGA 1040
          E R I L E D Q N S H L C R
1041 TTAGTAAGTA GGAGATTCTT GATTGACTTC CGAAAAGACA GGAAAGAAAG TTTCAAATAA GGTGTAGAT ATTGAATTATT 1120
          L
1121 TCTGGTGGTT TCAGCTTGCA GAGCAGCAAG CAGCAGTGGAA AGGAGTTCAA GAGCCACTGC TAGAATTG GAGTATTCTGT 1200
          L A E Q Q A A V E G V Q E P L L E F G V F C
1201 CCTCCTCCAG ATAATAAAAC AGCAGCAGCA GCAAATGCAG GCCCCTTGCA CTTGGGTCA CATCTTCCT GCATTCAGGCT 1280
          P P P D N K T A A A A N A G P L H L G H H L P A F R L
1281 GCAACCCACT CAACCAAATC TCCAGGAATC CTCCATTGTT CCAAATAGAC CTGTTCTTC GCTCTGATG CTGTTGATTCA 1360
          Q P T Q P N L Q E S S I V P N R P V L Q L *
1361 AGACGGAACCT CCTCTGATCA ATCCAAAATC TCATCACTTA AATTCTTAC CGTAACGTGCA TGCTTTAAA TGTTCAAGTAG 1440
1441 ACCAGGGTGC TGACCGTGAA TAGGGTATAC TATGTTAAC TACTCTAACT AGTAAAGTTG AAACAAAGA TGAAACATT 1520
1521 GTTATTGAA TCAGCTTCTC TAGATGAAACTCTGTTCTATAGCACCAGGAGA ATATTCGATA AATGAATAC GTAGTTAATGA 1600
1601 TATAAATTTC GGATCGCCTT CATTCTC 1627

```

Promotorsequenz des Gens *GGM13*

-1498 TACTATAGGGCACCGTGGTCGACGGCCGGCTGGTAATTATAATCGGATACTTGAAAATAGTCTGTCCTTCTGTTACCAAGCTTAGCAAGATGGCTT
-1398 TGAGCAAGGTTTCCTGAATTAACTACAATACCAAGTTCACATGCAGTTCTTACAATGATTACTCTGAGGGTACAACCATGAACCAGTATGAG
-1298 AGGTCTTGGCGCTTCTAAGATGGTATTAAAGCAAGGATCACATCGTAAACTCTCTTGTCTTATTGGCAGCATAAGCATTTTAACGGAGGTAAG
putative TATA-Box
-1198 **LEAFY-Bindemotiv von AG**
AAAAATTCAAGAGTTTCAGTTTACTGCCATGGCCAAACCAATACTGTGTCAGCCAACCCAACCCAACCGTGTGATCTGTCCATGGTACATTGGCA
-1098 AGTTTCAAGTGCATACTAAATAAGTAACAATCAGGGCGTGTACTTCACCCGGGCATAGCCAATCAGGTTATAGCCATAAGCAGCCAAGTCACAT
-998 TTTAACATAATGAAAGAAATCAATTTCCTGGCAAGTAGCCATGCATGCCACTGCTGGTTAGCCACTTGTCATTGAATTGGCATAGCAACCAGGC
-898 **putative TATA-Box**
AGAGCTGGTTATATTAAATGGCATTTGACATACTGTCAACTTTCTTCCACTTGCAAATTCCAATTACGGCAGTGGACAATGGACAGATAATTCCC
-798 CAAATTTCCTTGCGCACAAGAAATCTGCAAAGTGGCAAGGTTGCTTAGGCACTGTTCATGTTGGTAGTGAGGAATGAGGATGAGGAATGTTGACGT
-698 **putative TATA-Box**
CATTCAAGAAGATATTAGGGGAAGGTAGGACAGAATCCCTGAACAATTCAGATTTCAAGCTCAGGCACTTCCACATATGGTGGTGT
-598 TGATGGTCTGTTCAGCCATCATACTCCTAGCGACGGACTGTCTGTTCTCTTGAGCTTACCCCTAAAGCCCTGCTAGGGCTCAGCACCTCTGGC
-498 ATGCAAACCATTAACAGCAGTAACTCAGTAAATGGAAAAACAGTACTAGTGGAATCAGGTTCATCATGGTTCTTCTGCACAAAGCTAACCTGGTC
-398 AAACCATCTCACAAACCCATAACAGATGATGGCAAGTTGGTGTTTACAAAAAGGAGAATTCGAGTTGAGCCCTGATTGACCTAATCAACCAACC
-298 ACACATGGATGGCAGCATCCACCATACAATAAGAAGTTAACAAACACTGCACTGCAGGCACAAAGCCAAGGCCAGCTTGTGAGCATCAGGCACGT
-198 CGGTCTCCCTTGAAATTCTCTCCTTCTTCCCTTCCCTCCTCCTCCTCCTCACTCCTCTCCAAATCCAAAGTCCCTGCTTC
-98 CTTTCTTCCGGTTTCAACTCTGGGTTCTGTTCTGGGATTGGGATTTTAACACACTTGTTAGGAAATCTCCCTGCTTC
-1 CTTTCTTCCGGTTTCAACTCTGGGTTCTGTTCTGGGATTGGGATTTTAACACACTTGTTAGGAAATCTCCCTGCTTC
AAATCT

Legende: Putatives, ca. 1,5 kB langes Promotorfragment des Gens *GGM13*. Mögliche funktionelle Bereiche sind unterstrichen dargestellt. Die Kernsequenz des LEAFY-Bindemotivs bezieht sich auf die in Busch et al. (1999) beschriebene Sequenz im *AGAMOUS*-Promotor aus *Arabidopsis thaliana*, an die LEAFY direkt bindet, um *AG* zu aktivieren. –1 bezeichnet das erste Nucleotid aufwärts des putativen Transkriptionsstarts von *GGM13*.

Sequenzen der verwendeten Primer

3' RACE Primer

GGM10:	RQVT2	(5' -CGR CAR GTG ACS TTC TSC AAR CG-3')
GGM11:	RQVT2	(5' -CGR CAR GTG ACS TTC TSC AAR CG-3')
GGM12:	AB04	(5' -TGC TGA AGA AGG CNT ACG AGC T-3')
GGM13:	SP4(KKAYEL)	(5'-GAG CTC TCM GTG CTS TGT G-3')
GGM14:	RQVT2	(5' -CGR CAR GTG ACS TTC TSC AAR CG-3')
GGM15:	AB09	(5'-GAG ATC AAG CGA ATC GAG AAC-3')
GGM16:	AB09	(5'-GAG ATC AAG CGA ATC GAG AAC-3')
GGM17:	AB09	(5'-GAG ATC AAG CGA ATC GAG AAC-3')
GGM18:	AB09	(5'-GAG ATC AAG CGA ATC GAG AAC-3')
GGM19:	AB10	(5'-CAA ACG ACG CAA TGG TCT CAT C-3')
P019 (RACE-Anker-Primer)		(5' -GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT-3')
P018 (RACE-Adapter-Primer)		(5' -GAC TCG AGT CGA CAT CG-3')
AB05(RACE-Anker-Primer)		(5'-GAC TCG AGT CGA CAT CTG TTT TTT TTT TTT TTT TT-3')
AB07(RACE-Adapter-Primer)		(5'-GAC TG AGT CGA CAT CTG-3')

5' RACE Primer

GGM11:

SP1(GGM11)	(5' -CAT TCA GGA GGA GGA GCA G-3')
SP2(GGM11)	(5' -GAT TTA TTA ACT TCT TGC AAA AG-3')
SP3(GGM11)	(5' -CAT TAC TTG TGT CTT TCT TG-3')

GGM13:

SP1(GGM13)	(5' -CTG TTG CAG CAT CAA CTG-3')
SP2(GGM13)	(5' -CTA CAA AGG TGA CTG TTC-3')
SP3(GGM13)	(5' -CCA AAT TCT AGC AGT GGC TC-3')

GGM15:

SP1(GGM15)	(5‘-CCA GTC AGA TGC TTC AAT TTG-3‘)
SP2(GGM15)	(5‘-CTC GTT AGC AAG ATT CTC ATC-3‘)
SP3(GGM15)	(5‘-CTT GGA TTG TTG CTT GTA CC-3‘)

GGM16:

SP1(GGM16)	(5‘-GTC TTC CTC TAG ACA CTC C-3‘)
SP2(GGM16)	(5‘-CTC AAT ATC CAA TCG CAA TTG-3‘)
SP3(GGM16)	(5‘-CAC ACC CAA TTT GTA GTT TAT C-3‘)

GGM17:

SP1(GGM17)	(5‘-GTT ATC TTC GTT CTC GAG GC-3‘)
SP2(GGM17)	(5‘-GAA AGA GGC GGC CGC TG-3‘)
SP3(GGM17)	(5‘-CGA GAA TGT CGC CTG CCG-3‘)

RAGE-Primer

RAGE-Adapter-Primer (Langer Strang)	(5‘-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT-3‘)
RAGE-Adapter-Primer (Kurzer Strang)	(5‘-PO ₄ ⁻ ACC AGC CC – NH ₂ -3‘)
GS1(GGM13)	(5‘-ACC TGC CTG TTC GTT GTG TTC TCG ATC-3‘)
GS2(GGM13)	(5‘-AAT CTT TCC TCG ACC CAT GCC TGA CTC-3‘)

Primer zur Determinierung der Exon/Intron-Struktur der Gene *GGM13* und *ZMM17***GGM13:**

13exonIIuni	(5‘-GCA AGA ATT ACA GAG TAT GAT AAC C-3‘)
13exonVIrev	(5‘-CTG TTC TGA TCC TCC AGG ATT C-3‘)
13exonVIuni	(5‘-GAA TCC TGG AGG ATC AGA ACA G-3‘)
13exonVIIrev	(5‘-GCT GGA TCT CGT TGA TCA TGC G-3‘)

ZMM17:

17exonIuni	(5‘-GGA TCG ACC GAC CGG CCG G-3‘)
17exonIIrev	(5‘-CAC GCA GGG CTG CAG TAC TC-3‘)
17exonIIuni	(5‘-GAG TAC TGC AGC CCT GCC TG-3‘)
17exonVIrev	(5‘-GTG TTC TGG TCT TCC AAG ATT TG-3‘)
17exonVIuni	(5‘-CAA ATC TTG GAA GAC CAG AAC AC-3‘)
17exonVIIrev	(5‘-CTT CAC CTC GCC GGT CAA CG-3‘)

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 unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Heinz Saedler (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln, Abteilung Molekulare Pflanzengenetik) betreut worden.

Annette Becker

Teilpublikationen dieser Arbeit:

Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. & Theißen, G. (2000). MADS-box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Mol. Biol. Evol.*, in press

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

Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. & Theißen, G. (1999). MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Scie.* 96(13): 7342-7347

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Saedler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die vielen wertvollen Anregungen und für ein dauerhaftes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Schneider-Poetsch danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit als Koreferent zu bewerten.

Vor allem bedanke ich mich bei Privatdozent Dr. Theißen, der immer für Diskussionen zur Verfügung stand, hilfreiche Anregungen gab und in einer kompetenten und humorvollen Art Betreuungsarbeit leistete.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Projektkollegen und Laborbank-Nachbarn Kai-Uwe Winter für die vielen Stunden wertvoller Diskussionen und das besondere freundschaftliche Verhältnis, das unsere Arbeit begleitete.

Bei Britta Grosardt bedanke ich mich für die hervorragende technische Assistenz, ohne die große Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe Theißen für das Schaffen einer sehr guten Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft danken. Mein besonderer Dank gilt Thomas Münster für die technische Betreuung der ersten Monate und Luzie U. Wingen, die mir nicht nur einige *in-situ*-Sonden zur Verfügung stellte, sondern mich auch in vielen anderen Situationen mit Rat und Tat unterstützte.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern meiner Wohngemeinschaft, die mich durch das letzte Jahr dieser Arbeit begleitet haben und mir nach vielen Wanderjahren ein Zuhause schufen. Besonders danke ich Philipp, der mir in seiner ruhigen Art Kraft gab, die ich oft benötigte.

Ich danke dem DFG-Graduiertenkolleg „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“ der Universität zu Köln für die Bewilligung eines dreijährigen Stipendiums, für interessante Vorträge und Vorlesungen, für die Möglichkeit der Teilnahme an Konferenzen und wertvolle Kontakte zur Universität.

Ich danke auch meiner Familie und allen Freunden, die mich in den letzten Jahren begleiteten und mir Halt gaben.

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: Deutsch
- Alter: 29
- Geburtsort: Bad Hersfeld
- Vater: Reinhard Becker
- Mutter: Hildegard Becker, geb. Latsch

AUSBILDUNG

- 1991 Allgemeine Hochschulreife, Jacob-Grimm-Schule zu Rotenburg/F.
- 1991 – 1993 Grundstudium der Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- 1993 Vordiplom im Fach Biologie
- 1993 – 1994 Hauptstudium der Biologie, Georg-August-Universität, Göttingen
- 1994 – 1995 Auslandsaufenthalt als Erasmus-Studentin an der Universität Oulu, Finnland
- 1995 – 1996 Hauptstudium der Biologie, Georg-August-Universität, Göttingen
- 1996 – 1997 Anfertigen einer externen Diplomarbeit an der Florida State University, Tallahassee, Florida, USA mit dem Thema: „Vergleich zweier negativ selektierender Markergene auf ihre Verwendbarkeit zur Selektion von homologen Rekombinanten in *Nicotiana tabacum*.“
- 1997 Diplom im Fach Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
- 1997 – 2000 Promotion in Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“ der Universität zu Köln am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung „Molekulare Pflanzengenetik“