

**Charakterisierung von  
Orthologen floraler homöotischer B-Funktionsgene der  
Gymnospermen *Gnetum gnemon* L.**

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

vorgelegt von  
**Kai-Uwe Winter**  
aus Herford

Köln 2001

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Saedler  
Prof. Dr. Diethard Tautz  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2000

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1    Das „abscheuliche Geheimnis“ .....	1
1.2    Die systematische Stellung der Gnetales .....	3
1.3    Evolutionstheorien .....	8
1.4    Die Entwicklungsbiologie der Blüte .....	9
1.5    Gen-Familienangelegenheiten.....	12
1.6    Hypothesen zur Evolution der B- und der C-Funktion .....	14
1.7    Ziele dieser Arbeit.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	20
2.1    Chemikalien, Enzyme und Radioisotope .....	20
2.2    Medien, Puffer und Lösungen.....	20
2.3    Bakterienstämme und Plasmidvektoren .....	20
2.3.1    Bakterienstämme.....	20
2.3.2    Plasmidvektoren.....	21
2.4    Pflanzenmaterial.....	21
2.5    Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
2.6    Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	22
2.7 <i>In-planta</i> Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
2.8    Isolierung von Nukleinsäuren .....	22
2.8.1    Isolierung von Plasmid-DNA.....	22
2.8.2    Isolierung von genomischer DNA.....	23
2.8.2.1    Dieca-Verfahren .....	23
2.8.2.2    CTAB-Verfahren.....	23
2.8.3    Isolierung von Gesamt-RNA.....	24
2.9    Polymerase-Kettenreaktion-(PCR) gestützte Verfahren .....	24
2.9.1    Oligonukleotide.....	24
2.9.2    Standard-PCR.....	24
2.9.3    Isolierung von vollständigen cDNAs aus cDNA-Gemischen mittels 5'RACE.....	24
2.9.4    Erstellung von Transformationskonstrukten unter Einführung künstlicher Schnittstellen .....	25

---

2.9.5	Aufklärung der Exon/Intron-Struktur mittels genomischer PCR.....	27
2.9.6	Isolierung von putativen Promotorbereichen mittels RAGE .....	28
2.10	Markierungen von DNA- und RNA-Sonden .....	29
2.11	DNA- und RNA-Geltransfer-Analysen.....	30
2.12	<i>In-situ</i> -Hybridisierungen .....	30
2.13	Sequenzanalysen .....	31
2.14	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen .....	32
2.15	Computeranalysen.....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1	Isolierung von vollständigen cDNAs der Gene <i>GGM2</i> und <i>GGM3</i> .....	33
3.2	Analyse der genomischen Struktur von <i>GGM2</i> und <i>GGM15</i> .....	33
3.3	Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung von <i>GGM2</i> und <i>GGM15</i> ..	37
3.4	Expressionsmuster von <i>GGM2</i> und <i>GGM3</i> .....	43
3.5	Überexpression von <i>GGM2</i> im Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
3.5.1	Phänotypische Analyse .....	48
3.5.2	Molekulare Analyse .....	52
3.6	Überexpression von <i>GGM2</i> -Derivaten zur weiteren Analyse der <i>GGM2</i> -Funktion im heterologen System.....	56
3.7	Überexpression von <i>GGM2</i> in der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutante <i>pi-1</i> .....	57
3.7.1	Phänotypische Analyse .....	58
3.7.2	Molekulare Analyse .....	60
3.8	Überexpression von <i>GGM2</i> in der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutante <i>ap3-1</i> ....	62
3.8.1	Phänotypische Analyse .....	63
3.8.2	Molekulare Analyse .....	65
3.9	Überexpression von <i>GGM2</i> in der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutante <i>ap3-3</i> ....	67
3.9.1	Phänotypische Analyse .....	68
3.9.2	Molekulare Analyse .....	70
3.10	Komplementationsversuch der <i>Arabidopsis</i> Mutantan <i>ap3-3</i> und <i>pi-1</i> durch AP3:: <i>GGM2</i> .....	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1	Ein Modell zur Evolution der <i>DEF/GLO</i> -ähnlichen Gene.....	75
4.2	Das B/C-Modell der Gymnospermen.....	80

---

4.2.1	Die Expression von <i>GGM2</i> .....	81
4.2.2	Regulative Elemente der Promotoren von <i>GGM2</i> und <i>GGM15</i> .....	82
4.3	Modelle zur <i>GGM2</i> -Funktion im heterologen System <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	84
4.4	Ein Modell zur Evolution der Blüte .....	88
4.5	Ausblick auf weitere Experimente .....	91
<b>5. Zusammenfassung</b> .....		92
<b>6. Abstract</b> .....		93
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....		94
<b>8. Anhang</b> .....		105
8.1	Die genomischen Sequenzen von <i>GGM2</i> und <i>GGM15</i> .....	105
8.1.1	Die Sequenz von <i>GGM2</i> .....	105
8.1.2	Die Sequenz von <i>GGM15</i> .....	107
8.2	Oligonukleotide .....	110
8.2.1	Genspezifische <i>Primer</i> für 5'-RACE-Experimente .....	110
8.2.2	Spezifische <i>Primer</i> zur Amplifikation vollständiger cDNAs .....	110
8.2.3	<i>Primer</i> zur Einführung künstlicher Restriktions-Schnittstellen .....	110
8.2.4	<i>Primer</i> zur Amplifikation der Introns von <i>GGM2</i> und <i>GGM15</i> .....	111
8.2.5	<i>Primer</i> der RAGE-Experimente für <i>GGM2</i> und <i>GGM15</i> .....	111
8.3	Abkürzungsverzeichnis .....	112
8.4	Nomenklatur .....	112

## Eidesstattliche Erklärung

## Danksagung

## Lebenslauf

# 1. Einleitung

Ein „abscheuliches Geheimnis“ nannte Charles Darwin 1879 in einem Brief an seinen Freund Joseph Hooker das scheinbar plötzliche Auftreten und die rasche Diversifizierung der Blütenpflanzen (*Angiospermae*) (in Darwin und Seward [Hrsg.], 1903). Die frühesten eindeutigen Fossilien von Angiospermen stammen aus der unteren Kreide (Sun *et al.*, 1998) und sind somit ungefähr 140 Millionen Jahre alt. Da schon frühe fossile Funde eine enorme Diversität zeigen, wird angenommen, daß sich die grundlegende adaptive Radiation der Blütenpflanzen in der aus evolutionsbiologischer Sicht sehr kurzen Zeitspanne von vor 130 bis vor 90 Millionen Jahren vollzogen hat (Crane *et al.*, 1995; Friis *et al.*, 1997; Krassilov, 1991). Die scheinbar schlagartige Verbreitung der Angiospermen, die mit über 300.000 Arten heute beinahe alle bekannten Vegetationsformen der Erde dominieren (Crepet, 1998), wird auch als eine „ökologische Revolution“ bezeichnet und auf eine Koevolution von Blüten pollinierenden Insekten, Samen verbreitenden Vögeln und Säugern und den hochentwickelten Reproduktionsorganen der Blütenpflanzen zurückgeführt (Regal, 1977). Seit über hundert Jahren werden unterschiedlichste Theorien zur Evolution und Abstammung der Angiospermen diskutiert, deren vollständige Vorstellung ein bei weitem umfangreicheres Werk nötig machen würde. Eine befriedigende und allgemein akzeptierte Lösung dieses Problems konnte bisher jedoch nicht vorgestellt werden (Arber und Parkin, 1907; Crane *et al.*, 1995; Donoghue und Doyle, 2000; Doyle, 1994; Endress, 1997; Friis und Endress, 1996; Frohlich, 1999; Frohlich und Parker, 2000; Krassilov, 1991; Lotsy, 1911).

## 1.1 Das „abscheuliche Geheimnis“

Blütenpflanzen (*Angiospermae*) definieren sich, abgesehen von kurzen spezialisierten Achsen mit eng zusammengefaßten Sporophyllen, den Blüten, durch Stamina mit zwei Pollensack-Paaren und vor allem durch vollständigen Einschluß der Ovulen in Karpelle (Sun *et al.*, 1998; Warburg, 1913). Eine Rekonstruktion der stammesgeschichtlich ersten Angiospermen-Blüten erweist sich als schwierig, da frühe Fossilien nur selten Blütenstrukturen und kaum vollständige Blüten zeigen (Crane *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1998). Zudem galt auch die Identifizierung der basalsten rezenten Angiospermen lange als

umstritten (Chase *et al.*, 1993; Chaw *et al.*, 1997; Crane *et al.*, 1995; Doyle, 1994; Friis und Endress, 1996; Nixon *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 1999a; 1999b; Tayler und Hickey, 1996). In klassisch-morphologischen Studien wurden die *Magnoliaceae* (Arber und Parkin, 1907) in späteren Studien, die neuere fossile Funde einbezogen, eher die *Chloranthaceae* als besonders basal eingestuft (Nixon *et al.*, 1994; Taylor und Hickey, 1996). Erste molekulare Untersuchungen stellten zum einen *Ceratophyllum* (Chase *et al.*, 1993), zum anderen die *Nymphaeaceae* (Chaw *et al.*, 1997) als die ursprünglichsten Angiospermen vor. Die diskutierten Kandidaten zeigen teilweise extrem unterschiedliche Merkmale (Crane *et al.*, 1995; Friis und Endress, 1996). Fielen also die ersten Blütenpflanzen wie die *Magnoliaceae* durch eine Vielzahl von Blütenorganen und besonders große Petalen auf, oder zeigten sie, wie die Blüten der *Chloranthaceae*, teilweise nur ein einziges Karpell, einen Stamen und eine unscheinbare Braktee? Erst seit kürzester Zeit weisen molekulare Daten zunehmend verlässlich die *Amborellaceae* gefolgt von den Seerosengewächsen (*Nymphaeaceae*) und einer Klade aus *Schisandra*, *Illicium*, *Trimenia* und *Austrobaileya* (kurz: ANITA) als basalste Gruppen der heutigen Blütenpflanzen aus (Qiu *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 1999a; Soltis *et al.*, 1999b). Dennoch bleibt es diskussionswürdig, ob auch die ersten Angiospermen in der Stammesgeschichte der Pflanzen ein so ausgeprägtes Perianth wie die Pflanzen der ANITA-Gruppe hatten, da die meisten frühen Fossilien eher kleine unauffällige Blüten zeigen (Albert *et al.* 1998; Crane *et al.*, 1995; Friis *et al.*, 1997; Krassilov, 1991).

In den letzten Jahren konnten zusätzlich zu vielen morphologischen und physiologischen Daten auch zahlreiche molekulare Belege für eine Monophylie der Angiospermen erbracht werden (Barnabas *et al.*, 1995; Bower *et al.*, 2000; Chaw *et al.*, 1997; 2000; Goremykin *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1997; Samigullin *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1999a; 1999b). Zwar gilt es als sicher, daß der gemeinsame Vorfahre aller bedecktsamigen Blütenpflanzen innerhalb der Verwandtschaft der Nacktsamer (*Gymnospermeae*) zu suchen ist, der genaue evolutionäre Ursprung der Angiospermen konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden (Chaw *et al.*, 1997; Donoghue und Doyle, 2000; Doyle, 1994; Friis und Endress, 1996; Taylor und Hickey, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Anfang dieses Jahrhunderts entwickelten sich zwei grundsätzlich miteinander konkurrierende Theorien, die noch heute als „Euanthienszenario“ und „Pseudanthienszenario“ diskutiert werden und zudem als Basis für neue Hypothesen dienen. Nach der klassischen Auffassung der Euanthientheorie ist die Angiospermenblüte aus einer einzigen Sproßachse mit Mikro- und

Megasporophyllen hervorgegangen. Die Vorfahren der Blütenpflanzen sollen den Bennettiteen, die fossil mit ca. 1000 Arten aus dem Trias und dem Jura (Mesophytikum) bekannt sind, recht ähnlich gewesen sein und demnach zwittrige Reproduktionsorgane gehabt haben. Von diesen Reproduktionsorganen werden ziemlich geradlinig *Magnolia*-ähnliche Angiospermenblüten abgeleitet (Arber und Parkin, 1907; Lotsy, 1911). Das Pseudanthienszenario von Richard Wettstein (1907) hingegen basiert auf einem noch früheren Werk von A. Engler und nennt als Vorfahren der Angiospermen die rezenten Gnetales oder gnetalesähnliche Gymnospermen, deren eingeschlechtliche Reproduktionsorgane den jeweils männlichen (Stamina) bzw. weiblichen (Karpelle) Blütenorganen entsprechen. Nach dieser Theorie hat sich die Angiospermenblüte aus einer Assemblierung mehrerer Achsen entwickelt und wird demnach als „Pseudanthium“ angesehen. Beide dieser klassischen Theorien erfuhren Erweiterungen und Abwandlungen in neuerer Zeit (Doyle, 1994; Friis *et al.*, 1997; Nixon *et al.*, 1994; Taylor und Hickey, 1996).

## 1.2 Die systematische Stellung der Gnetales

In allen bisher hier erwähnten Hypothesen spielt die rezente Gymnospermenklasse *Gnetatae* und ihre systematische Stellung innerhalb der *Spermatophyta* (Samenpflanzen) eine Schlüsselrolle. Zusammen mit einigen ausgestorbenen Samenpflanzen des Mesophytikums, wie den Bennettiteen, werden die Gnetales mit den Angiospermen nach diesen Lehren in der systematischen Klade „Anthophyten“ zusammengefaßt (Abb. 3A). Damit wären die Gnetales unter den heute lebenden Samenpflanzen die engsten Verwandten der Angiospermen (Arber und Parkin, 1907; Chase, *et al.*, 1993; Crane *et al.*, 1995; Doyle, 1994; 1996; Doyle und Donoghue, 1992; Doyle *et al.*, 1994; Krassilov, 1991; Lotsy, 1911; Nixon *et al.*, 1994; Taylor und Hickey, 1996; Wettstein, 1907).

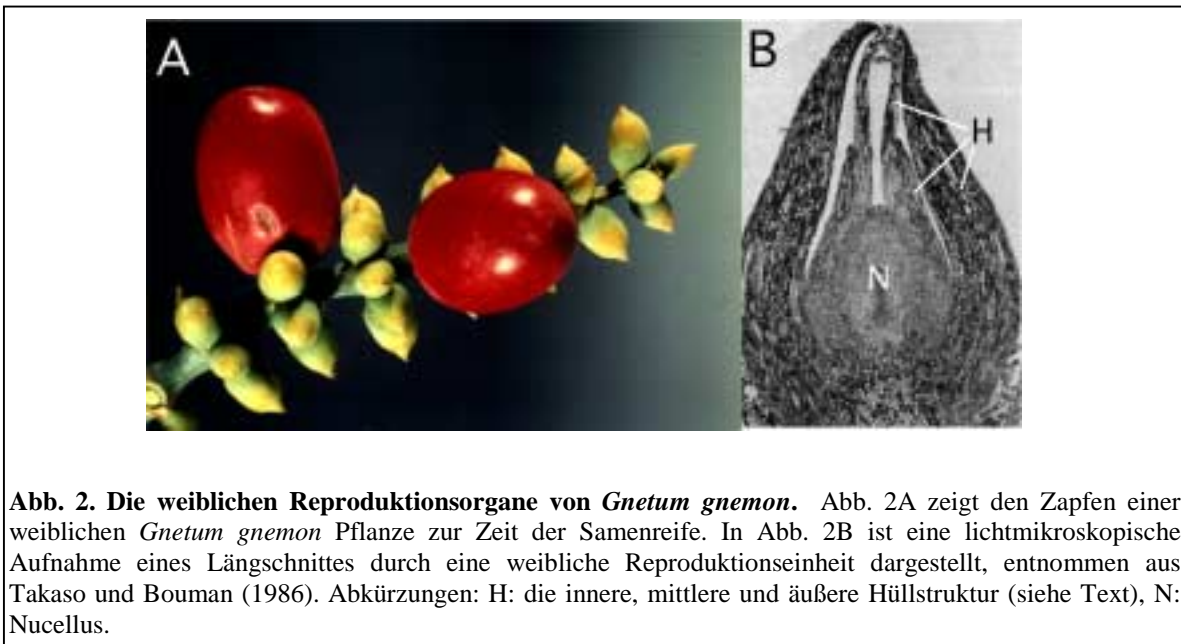
Die Klasse der *Gnetatae* umfaßt nur drei taxonomisch isolierte Gattungen: den Rutenstrauch *Ephedra*, der mit ca. 45 Arten in Südeuropa, Asien und auf den amerikanischen Kontinenten vorkommt, die recht bizarre südwestafrikanische Wüstenpflanze *Welwitschia* mit der einzigen rezenten Art *Welwitschia mirabilis*, und *Gnetum* mit ca. 30 Arten, von denen nur wenige in den tropischen Regionen Amerikas und Afrikas, und der Großteil in Asien zwischen Bombay und den Fiji-Inseln vorkommen (Kubitzki [Hrsg.], 1991). Ein weiterer Brief an Joseph Hooker, der, geschrieben von



Friedrich Welwitsch, eine erste wissenschaftliche Beschreibung von *Welwitschia mirabilis* enthielt, ließ Hooker 1863 erstmals einen Zusammenhang dieser Spezies mit den zuvor beschriebenen Gattungen *Ephedra* und *Gnetum* postulieren (Lotsy, 1911). Seitdem wird die Monophylie der Gnetales ähnlich kontrovers diskutiert, wie deren Verwandtschaft mit den Angiospermen (Friedman, 1996; Price, 1996).



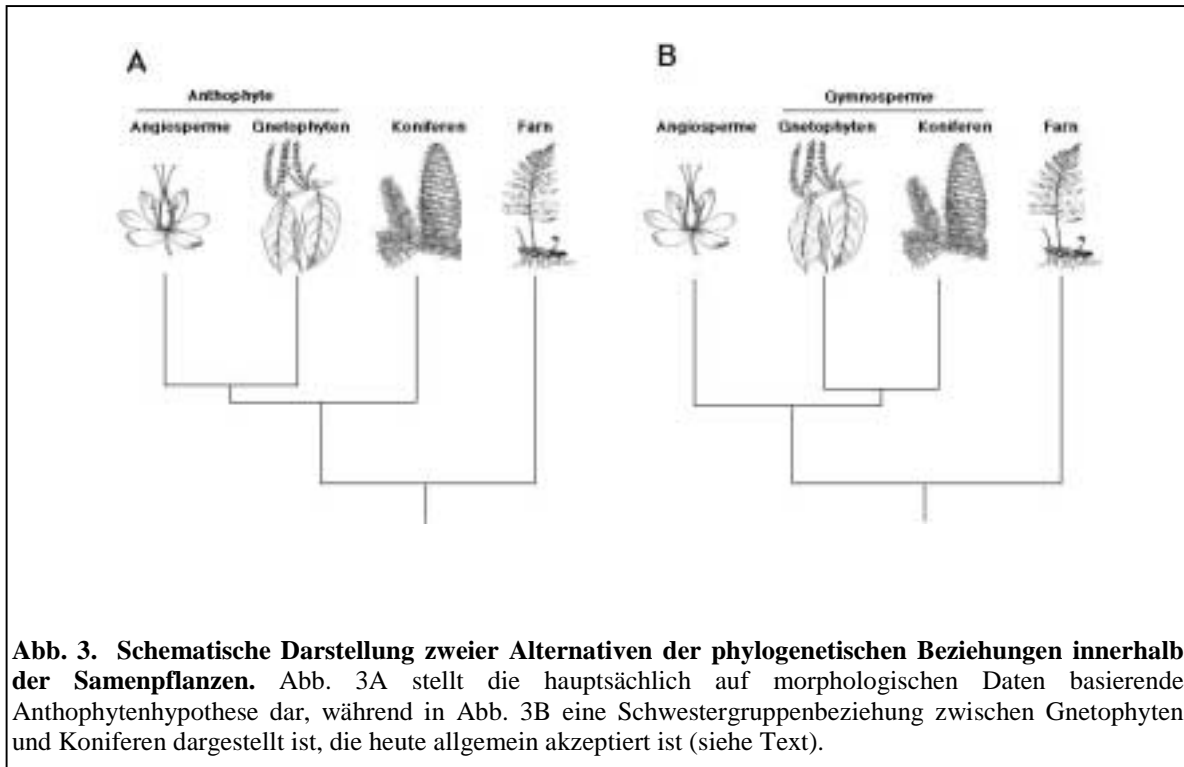
**Abb. 1. Die männlichen Reproduktionsorgane von *Gnetum gnemon*.** Abb. 1A zeigt einen Ausschnitt des Habitus einer männlichen Pflanze mit drei Zapfen. Abb. 1B zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Längsschnittes durch eine männliche reproduktive Einheit, deren Anordnung im Strobilus aus Abb. 1C hervorgeht, in der ein Längsschnitt durch einen Strobilus eines männlichen Zapfens von *Gnetum gnemon* dargestellt ist. Abb. 1B und 1C sind aus Hufford (1996) entnommen. Abb. 1D zeigt einen Zapfen einer männlichen *Gnetum gnemon* Pflanze mit mehreren Strobili. Abkürzungen: a: Antherophore, ab: *anterior bract* (Hüllstruktur), mf: *male flower* (männliche Reproduktionseinheit), o: *ovule* (sterile weibliche Einheit), pb: *posterior bract* (Hüllstruktur).



**Abb. 2. Die weiblichen Reproduktionsorgane von *Gnetum gnemon*.** Abb. 2A zeigt den Zapfen einer weiblichen *Gnetum gnemon* Pflanze zur Zeit der Samenreife. In Abb. 2B ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Längsschnittes durch eine weibliche Reproduktionseinheit dargestellt, entnommen aus Takaso und Bouman (1986). Abkürzungen: H: die innere, mittlere und äußere Hüllstruktur (siehe Text), N: Nucellus.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde *Gnetum gnemon*, als Repräsentant der Gnetales herangezogen. Hierbei handelt es sich um einen tropischen, diözischen Baum mit flächigen, fiedernervigen und bifacialen Laubblättern (Abb. 1A). Den drei Gattungen gemeinsam ist die Anordnung der reproduktiven Organe in zusammengefaßte Komplexe (Zapfen), die in der Literatur oft als „Blütenstände“ bezeichnet wurden. Die Organisation dieser Zapfen ist in den drei Gattungen jedoch jeweils völlig unterschiedlich (Kubitzki [Hrsg.], 1991). *Gnetum gnemon* weist pro Zapfen ca. fünf bis zehn distinkte Gruppen von Reproduktionsorganen (Strobili) auf (Abb. 1D und 2A). Diese Strobili werden von einer um der Zapfenachse verlaufenden Blattstruktur getragen. An den Zapfen weiblicher Pflanzen bestimmt nur ein einzelner Ring aus weiblichen Reproduktionseinheiten einen solchen Strobilus, während männliche Strobili mehrere übereinanderliegende Ringe von männlichen Reproduktionseinheiten und einen oberen abschließenden Ring aus sterilen weiblichen Einheiten aufweisen (Abb. 1C). Bei allen drei Gattungen der Gnetales finden sich in den Reproduktionseinheiten, im Gegensatz zu anderen Gymnospermen, mehrere Hüllstrukturen um die Nucelli und Antherophoren. Im besonderen weist *Gnetum gnemon* drei Hüllschichten in weiblichen Reproduktionseinheiten (Abb. 2B) und eine Hüllstruktur um die männlichen Antherophoren auf (Abb. 1B) (Takaso und Bouman, 1986; Endress, 1996; Hufford, 1996). Diese Strukturen wurden von verschiedenen Autoren entweder als „Integument“ oder „Perianth“ bezeichnet (Doyle, 1994; Lotsy, 1911), was aber nicht gesicherte

Homologisierungen zu Organstrukturen der Blütenpflanzen impliziert und deswegen in dieser Arbeit vermieden werden soll. In der vorliegenden Arbeit werden diese Strukturen neutral als „Hüllstrukturen“ bezeichnet. Im Xylem der Leitbündel aller Gnetophyten befinden sich Tracheen, die denen der Angiospermen so stark ähneln, daß auch für dieses Merkmal ein gemeinsamer Ursprung postuliert wurde (Muhammad und Sattler, 1982). Neuere Untersuchungen zur Holzanatomie der Gnetales unterstützen hingegen eine unabhängige Tracheenevolution von Blütenpflanzen und Gnetophyten (Carlquist, 1996). 1990 wurde zum ersten Mal bei einer Gymnosperme, nämlich *Ephedra*, eine Art „doppelte Befruchtung“ nachgewiesen, was zuvor für eine Autapomorphie der Angiospermen gehalten wurde (Friedman, 1990). Dieses Phänomen ist heute auch für *Gnetum* bekannt und wird für *Welwitschia* angenommen (Friedman und Carmichael, 1996). Zum Zeitpunkt der Befruchtung stellt der weibliche Gametophyt von *Gnetum gnemon* ein vielkerniges Syncytium dar, in dessen Zytoplasma die Spermazelle, die bei allen Samenpflanzen zweikernig ist, zwei Zellkerne entläßt. Beide männlichen Kerne fusionieren mit je einem der etwa 1000 weiblichen Nuclei und bilden somit zwei Embryonen, von denen einer heranreift, während der andere abortiert. Die unbefruchteten übrigen Zellkerne bilden ein polyploides Nährgewebe. Trotz deutlicher funktioneller Unterschiede zur doppelten Befruchtung der Blütenpflanzen wurde dieser Mechanismus von Friedman als evolutionärer Ursprung des triploiden Endosperms der Angiospermen gedeutet, was zudem als weiterer Hinweis auf die stammesgeschichtliche Verwandtschaft von Gnetophyten und Blütenpflanzen gewertet wurde (Friedman, 1995, 1998). Obwohl eine Vielzahl fossiler Gnetales-Pollen den Schluß nahelegen, daß diese Pflanzengruppe im späten Trias und frühen Jura eine deutlich größere Verbreitung hatte, sind große aussagekräftige Fossilien von Reproduktionseinheiten ausgestorbener Gnetales-Spezies sehr selten und lassen weder eine eindeutige systematische Einordnung der Gnetales noch eine sichere Homologisierung ihrer Reproduktionseinheiten mit den Blütenorganen der Angiospermen zu (Crane, 1996). Auch die Analyse konventioneller molekularer Marker erbrachte keine eindeutigen Aussagen. Obwohl Vergleiche von Sequenzen des plastidären *rbcL*-Gens und nicht-codierender Bereiche der invertierten Sequenzwiederholung des Chloroplastengenoms (Goremykin *et al.*, 1996), ebenso wie Sequenzvergleiche ribosomaler RNA (Chaw *et al.*, 1997) Argumente lieferten, die Gnetales nicht als engste Verwandten der Angiospermen sondern als Schwestergruppe der Koniferen zu betrachten (Abb. 3B), stützten andere Phylogenierekonstruktionen molekularer Daten die Anthophytenhypothese (Chase *et al.*, 1993) oder ließen keine eindeutigen Interpretationen zu (Barnabas *et al.*, 1995).



**Abb. 3. Schematische Darstellung zweier Alternativen der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Samenpflanzen.** Abb. 3A stellt die hauptsächlich auf morphologischen Daten basierende Anthophytenhypothese dar, während in Abb. 3B eine Schwestergruppenbeziehung zwischen Gnetophyten und Koniferen dargestellt ist, die heute allgemein akzeptiert ist (siehe Text).

Eigene dieser Arbeit vorausgegangene Untersuchungen stützten sich nicht auf klassische molekulare Marker wie das *rbcL*-Gen oder rRNA-Sequenzen, sondern basierten auf homöotischen Genen, die Mitglieder von Subgenkladen innerhalb einer großen Genfamilie sind (Winter *et al.*, 1999). Solche Subgenkladen beinhalten orthologe Gene verschiedener Spezies, während sie selbst einst aus paralogen Genduplikationen hervorgegangen sind. Damit wurzeln sich die jeweiligen Subkladen innerhalb der Gesamtgenfamilie selbständig. Phylogenierekonstruktionen mit klassischen Markern sind oft auf eine definierte Außengruppe angewiesen, um den berechneten Dendogrammen eine Wurzel zu geben, was häufig zu systembedingten Problemen führt (Frohlich, 1999). Besonders die Wurzel der Samenpflanzen ist jedoch von essentieller Bedeutung, will man die systematischen Zusammenhänge der Blütenpflanzen, Gnetales und anderen Gymnospermen analysieren. Diese Untersuchungen zeigten für fünf Gnetales-Gene eine nähere Verwandtschaft mit den orthologen Genen von Koniferen als mit denen von Angiospermen. Drei dieser Genpaare wurden durch besonders hohe „Bootstrapwerte“ (einem Verfahren zur statistischen Absicherung der Aufspaltung von Ästen in Phylogenierekonstruktionen, siehe 2.15) abgesichert. Somit waren besonders starke molekulare Evidenzen erbracht, die Anthophytenhypothese nicht länger aufrecht zu erhalten (Winter *et al.*, 1999). Auch weitere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten in jüngster Zeit deutlich zeigen, daß die Gnetales näher mit Koniferen als mit Blütenpflanzen verwandt sind (Hansen *et al.*,

1999; Qiu *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1999a). Eine recht bedeutende Anzahl von Arbeiten weist sogar darauf hin, daß die rezenten Gymnospermen ein Monophylum bilden (Bowe *et al.*, 2000; Chaw *et al.*, 2000; Goremykin *et al.*, 1996; Samigullin *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1999b). Somit wäre keine Gruppe der heute lebenden Gymnospermen näher mit den Angiospermen verwandt als jede andere. Heute ist allgemein akzeptiert, daß die Anthophytenhypothese nicht mehr haltbar ist (Donoghue und Doyle, 2000), womit auch alle auf dieser Theorie basierenden Modelle, die oben erwähnt wurden, nicht mehr anwendbar sind. Die Frage nach den Ahnen der Blütenpflanzen ist somit offener denn je.

### 1.3 Evolutionstheorien

In dem zu Anfang erwähnten Brief an Joseph Hooker sah Charles Darwin vor allem in dem plötzlichen Auftreten des neuen Grundbauplans der Blütenpflanzen einen ernsten Konflikt zum theoretisch gradualistisch ablaufenden Prozeß der Evolution (in Darwin und Seward [Hrsg.], 1903). Dieses Problem, die Erklärung der Mechanismen zur Entstehung neuer Baupläne des Lebens, wuchs im Verlauf des 20. Jahrhunderts zu einer elementaren Kontroverse der Evolutionstheoretiker, in der Gradualisten gegen Saltationisten standen. Daß alle Prozesse der Makroevolution aus langsam und kontinuierlich ablaufenden mikroevolutionären Vorgängen erklärbar seien, schien nicht nur im Fall der Blütenpflanzen im Gegensatz zu den Erfahrungen aus fossilen Funden zu stehen (dargestellt in Wuketits, 1988). Die dramatischen Veränderungen, die zu neuen Arten und gar zu neuen Bauplänen führen, sind nur schwer als Folge langsamer und stetiger Abwandlungen vorstellbar.

Es mag trivial sein, daß eine Aneinanderreihung von adulten Phänotypen nur eine unzureichende Darstellung der Stammesgeschichte ist, da Innovationen an allen Lebewesen unumgänglich auch Veränderungen ihrer ontogenetischen Entwicklung fordern. Im Gegensatz zu Ernst Haeckels 1891 formuliertem „Biogenetischen Grundgesetz“, welches einen funktionellen Einfluß der Phylogenese auf die Keimbahn (Ontogenese) postuliert, ist es nach moderner Auffassung eher die Ontogenese der Lebewesen, die der Phylogenese funktionelle Zwänge auferlegt (Riedl, 1975). Die hoch komplexen Entwicklungsprozesse höherer Vielzeller erlauben Neuerungen nur sehr restriktiv und kanalisieren demnach strikt die mögliche Richtung der Evolutionsprozesse. Gerade Veränderungen in den Genen, die ontogenetische Entwicklungen steuern, haben

deshalb ein besonderes Potential zur Bildung neuer Grundbaupläne. Molekulare entwicklungsbiologische Ansätze sollten sich demnach als besonders nützlich zum Verständnis makroevolutionsbiologischer Fragestellungen, wie die Entstehung der Blütenpflanzen, erweisen (Theißen und Saedler, 1995; Theißen, 1999).

#### 1.4 Die Entwicklungsbiologie der Blüte

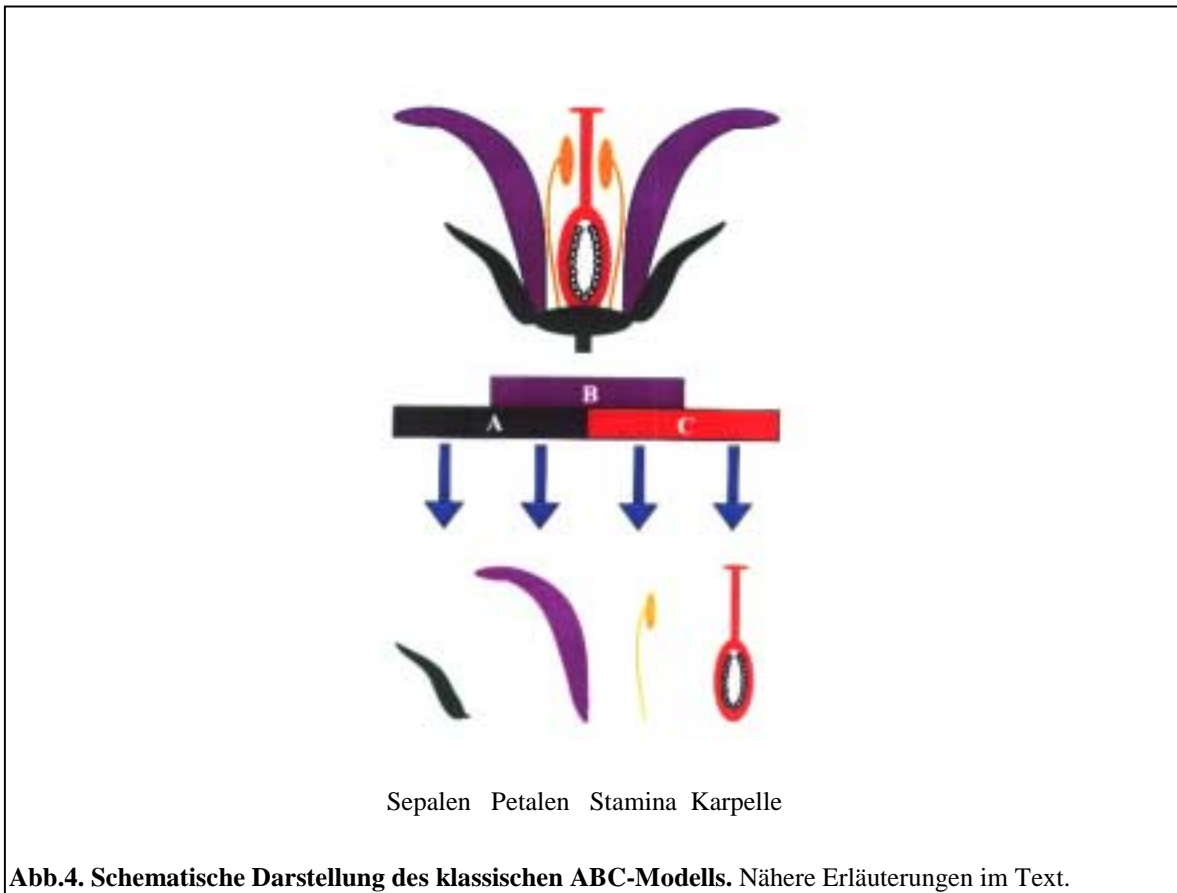
Während bis in jüngster Zeit vor allem Fragestellungen bezüglich tierischer Organismen mit dem Ansatz der molekularen evolutionären Entwicklungsbiologie untersucht wurden (St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992; McGuinnis und Krummlauf, 1992; Kenyon, 1994), wird nun zunehmend auch die Evolution der Pflanzen auf diese Weise analysiert (Albert *et al.*, 1998; Baum, 1988; Baum und Whitlock, 1999; Becker *et al.*, im Druck; Hasebe, 1999; Kramer *et al.*, 1998; Kramer und Irish, 1999; Lawton-Rauh *et al.*, 2000; Ma und dePamphilis, 2000; Mouradov *et al.*, 1996; 1998a; 1999; Münster *et al.*, 1997; Purugganan, 1998; Purugganan *et al.*, 1995; Purugganan und Suddith, 1998; Rutledge *et al.*, 1998; Sundström *et al.*, 1999; Tandre *et al.*, 1995; 1998; Theißen und Saedler, 1995; Theißen *et al.*, 1996; 2000; Winter *et al.*, 1999). Ähnlich wie bei Tieren wird auch die Entwicklung von Pflanzen durch komplexe hierarchisch organisierte Gennetzwerke gesteuert, bei denen Gene höherer Ebenen für Transkriptionsfaktoren kodieren, die ihrerseits Gene niedrigerer Ebenen regulieren (Theißen und Saedler, 1995). An dieser Stelle werden nur einige ausgewählte grundsätzliche Zusammenhänge dieses Systems erläutert, da eine vollständige Darstellung aller bisher analysierten Wechselwirkungen innerhalb dieses Netzwerkes nicht Thema dieser Arbeit sein soll. Außerdem soll auf einige bereits erschienene Zusammenfassungen verwiesen werden, die eine ausführlichere Einführung in diese Thematik ermöglichen (Haughn *et al.*, 1995; Irish, 1999; Ma, 1994; Theißen und Saedler, 1998; Theißen und Saedler, 1999; und Zitate darin).

Sogenannte Blühzeitpunktgene (*Flowering time genes*) kodieren für Rezeptoren, die sowohl Umweltsignale, als auch endogene Signale perzipieren und weiterleiten können. Gibberellinsynthese, Kältestimuli (Vernalisation) und die Tageslänge (Photoperiode) induzieren unterschiedliche Signalketten, die schließlich florale Meristemidentitätsgene (*Meristem identity genes*) positiv regulieren (Devlin und Kay, 2000; Samach *et al.*, 2000). Diese Gene, deren bekanntester Vertreter *LEAFY* (*LFY*) aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) ist, etablieren durch bislang nur unzureichend

verstandene Prozesse Positionsinformationen, die durch Katastergene (*Cadastral genes*) und intermediäre Gene (*Intermediate genes*) manifestiert werden. Die durch die Produkte dieser Gene regulierte nächst niedrigere Ebene wird durch Organidentitätsgene (*Organ identity genes*) repräsentiert. Drei miteinander interagierende Genfunktionen, die A-, B- und die C-Funktion bestimmen nach dem klassischen ABC-Modell die Identität der vier Blütenorgane (Abb. 4). Die A-Funktion allein führt zur Bildung von Sepalen im ersten Wirtel der Blüte, während A- und B-Funktion zusammen die Identität der Petalen im zweiten Wirtel bestimmen. B- und C-Funktion determinieren die Stamina im dritten Wirtel und die C-Funktion allein spezifiziert die Karpelle im vierten, innersten Wirtel (Abb. 4). Die A- und die C-Funktion sind nach diesem Modell antagonistisch. Dem ABC-Modell zur Folge entwickeln sich also bei einem Ausfall der A-Funktion, da dann die C-Funktion auch die äußeren Wirtel ausfüllt, im ersten Wirtel Karpelle statt Sepalen und im zweiten Wirtel Stamina statt Petalen. Entsprechend findet man bei einem Ausfall der C-Funktion eine Erweiterung der A-Funktion auf die inneren Wirtel, was zu Petalen und Sepalen im dritten und vierten Wirtel führt. Ein Ausfall der B-Funktion führt nach dem klassischen ABC-Modell zu Sepalen in den äußeren beiden und zu Karpellen in den inneren beiden Wirteln einer Blüte. (Bowman *et al.*, 1991; Coen, 1997; Coen und Meyerowitz, 1991).

Mittels homöotischer Blütenmutanten wurden aus *Arabidopsis thaliana* *APETALA1* (*AP1*) und *APETALA2* (*AP2*) als Gene, die die A-Funktion ausüben, isoliert; als B-Funktionsgene konnten *APETALA3* (*AP3*) und *PISTILLATA* (*PI*) (*Arabidopsis*) sowie *DEFICIENS* (*DEF*) und *GLOBOSA* (*GLO*) aus *Antirrhinum majus* kloniert werden, während die C-Funktion in *Arabidopsis* von *AGAMOUS* (*AG*) und in *Antirrhinum* von *PLENA* (*PLE*) ausgeübt wird. Die Expressionsmuster dieser Gene koinzidieren nach dem klassischen ABC-Modell mit den Blütenkreisen, deren Organe sie spezifizieren. Gene, die die A-Funktion ausüben, werden demnach in den äußeren beiden Wirteln, B-Funktionsgene in Wirtel zwei und drei und C-Funktionsgene in den inneren Wirteln drei und vier exprimiert (Zusammenfassungen in Haughn *et al.*, 1995; Ma, 1994; Riechmann und Meyerowitz, 1997; Theißen *et al.*, 2000). Die genaue Regulation dieser Expressionsmuster ist für alle ABC-Gene, im besonderen aber für die B-Funktionsgene, für die innerhalb des ABC-Modells keine Antagonisten zur Verfügung stehen, nicht vollständig verstanden. In *Arabidopsis* scheint das Meristemidentitätsgen *LFY* bei diesen Regulationsprozessen eine Hauptrolle zu spielen (Zusammenfassungen in Ng und Yanofsky, 2000; Theißen, 2000). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß das LFY-Protein direkt an den Promotor des A-Funktionsgens *AP1* und das erste Intron des C-Funktionsgens *AG* bindet und diese positiv

reguliert (Busch *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 1998). Ebenso bindet LFY an die Promotoren der B-Funktionsgene *AP3* (V.Irish, pers. Mitt.) und *PI* (Honma und Goto, 2000).



Obwohl das ABC-Modell auf homöotischen Mutanten von nur zwei Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Antirrhinum majus* basierte, wurde recht bald eine grundsätzliche Gültigkeit dieses Modells für die meisten wenn nicht gar für alle Blütenpflanzen angenommen (Ma und dePamphilis, 2000), was durch die Aufdeckung ähnlicher Mechanismen in der Monokotylen *Zea mays* (Mais) unterstützt werden konnte (Ambrose *et al.*, 2000). Trotzdem konnten in den letzten Jahren einige Arbeiten deutliche Unterschiede der Blütenentwicklung schon in eudikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis*, *Antirrhinum* und *Petunia* aufdecken (Davies *et al.*, 1999; Weigel und Meyerowitz, 1994). Zudem wurde das ABC-Modell selbst für *Arabidopsis thaliana* durch neue Studien erweitert und verfeinert (Chen *et al.*, 1999; Ferrandiz *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2000). Funktionelle Analysen von homöotischen Genen in Petunie resultierten sogar in der Bestimmung einer weiteren Funktion zur Spezifikation von Ovulen, der D-Funktion, die dem klassischen ABC-Modell hinzugefügt wurde (Colombo *et al.*, 1995). Somit sollte das



ABC-Modell eher als konzeptionelles Grundprinzip denn als ein allgemeingültiges System für Blütenentwicklung gesehen werden.

## 1.5 Gen-Familienangelegenheiten

Eine Vielzahl der an den pflanzlichen regulatorischen Netzwerken der Blütenentwicklung beteiligten Gene zeichnen sich durch ein sehr konserviertes Strukturmotiv, die sogenannte MADS-Box, aus und kodieren für putative Transkriptionsfaktoren. Der Name „MADS“ ist ein Akronym für die ersten vier isolierten Gene mit einem solchen Sequenzmotiv, *MCM1* (*minichromosome maintenance factor*) aus *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS* aus *Arabidopsis*, *DEFICIENS* und *Antirrhinum* und *SRF* (*serum response factor*) aus *Homo sapiens* (Shore und Sharrocks, 1995). Obwohl die MADS-Box über die Reiche der Tiere, Pilze und Pflanzen konserviert ist, stellen sich pflanzliche MADS-Box-Gene durch den Besitz weiterer charakteristischer Struktur motive, wie der I-Region (intermediäre Region), der K-Box und der C-terminalen Region unterschiedlich zu denen der Tiere und Pilze dar. Fast alle bisher aus Pflanzen isolierten MADS-Box-Gene zeichnen sich durch diesen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau aus und werden deshalb als MIKC-Typ- (MADS-Box, I-Region, K-Box und C-terminale Region) Gene bezeichnet (Münster *et al.*, 1997; Theißen *et al.*, 2000). Die MADS-Domäne ist der am stärksten konservierte Teil dieser Transkriptionsfaktoren und liegt meistens am N-terminalen Ende der Proteinsequenz. Sie ist ca. 60 Aminosäuren lang und bildet zwei antiparallele umeinander gewundene  $\alpha$ -Helices (*coiled coil*), die die hauptsächliche Bindung an DNA vermitteln (Pellegrini *et al.*, 1995). Für diese Interaktion konnte in vielen Promotoren von Genen, die von MADS-Transkriptionsfaktoren reguliert werden, das konservierte Sequenzmotiv CC(A/T)<sub>6</sub>GG, die sogenannte CArG-Box (CC-AT-reich-GG), identifiziert werden (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Shore und Sharrocks, 1995). Die I-Region trennt die MADS- von der K-Domäne. Obwohl die I-Region verglichen mit der MADS- und der K-Domäne deutlich weniger stark konserviert ist, werden ihr wesentliche selektive Funktionen bei der Dimerisierung von MADS-Domäne-Proteinen zugesprochen (Riechman und Meyerowitz, 1997). Strukturell werden solche Interaktionen zweier MADS-Transkriptionsfaktoren durch die K-Domäne ermöglicht. Wie das Strukturprotein Keratin bildet dieser Teil des Proteins, durch hydrophobe Aminosäuren im regelmäßigen Abstand von ca. sieben Aminosäuren angeordnet, ein sich um eine  $\alpha$ -Helix windendes, apolares „Band“. Diese Anordnung

ermöglicht die Assemblierung mehrerer solcher  $\alpha$ -Helices zu einer *coiled coil*-Struktur und somit die Interaktion zweier MADS-Domäne-Proteine (Riechman und Meyerowitz, 1997; Shore und Sharrocks, 1995). Die Funktion der am wenigsten konservierten Region, des C-Terminus, scheint vor allem in der Vermittlung der Ausbildung sogenannter ternärer Komplexe aus mehr als nur zwei MADS-Transkriptionsfaktoren zu liegen (Egea-Cortines *et al.*, 1999).

Auch die MADS-Box-Gene, die bisher aus Gymnospermen und Farnpflanzen isoliert wurden, zeigen diese Abfolge von Sequenzmotiven (Becker *et al.*, im Druck; Münster *et al.*, 1997; Tandre *et al.*, 1995), und seit jüngster Zeit sind sogar MIKC-Typ Gene aus dem Laubmoos *Physcometrella patens* (K. Henschel und T. Münster, pers. Mitt.) und aus Charophyceen, den Armleuchteralgen, (M. Hasebe, pers. Mitt.) bekannt. Damit wäre die Entstehung der MIKC-Typ MADS-Box-Gene möglicherweise älter als die Besiedlung des Landes durch die Pflanzen, die nach allgemeiner Auffassung im mittleren Ordoviz vor ca. 450 Millionen Jahren stattgefunden haben soll (Graham *et al.*, 2000).

Da MADS-Box-Gene des MIKC-Typs im gesamten Pflanzenreich konserviert sind und eine so herausragende Rolle in der Blütenentwicklung spielen, sollte die Analyse der Evolution dieser Gene ein Schlüssel zum Verständnis der Entstehung der Reproduktionsorgane und damit der Blüten der Angiospermen sein (Baum, 1998; Hasebe, 1999; Lawton-Rauh *et al.*, 2000; Purugganan, 1998; Theißen und Saedler, 1995; Theißen *et al.*, 1996; Theißen *et al.*, 2000).

In phylogenetischen Studien und Sequenzvergleichen zeigen MADS-Box-Gene eine Subordnung von definierten Gruppen mit jeweils monophyletischem Ursprung (Genkladen) innerhalb der Gesamtgenfamilie, was auf eine Entstehung dieser Kladen durch Genduplikationen hindeutet (Purugganan *et al.*, 1995; Theißen *et al.*, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Mitglieder dieser Genkladen sind orthologe Gene häufig mit ähnlichen Funktionen und Expressionsmustern. So finden sich MADS-Box-Gene, die die A-Funktion ausüben in der Klade der *SQUAMOSA*-ähnlichen Gene, B-Funktionsgene in den Kladen der *DEFICIENS*- und der *GLOBOSA*-ähnlichen Gene, und alle bisher isolierten C- und D-Funktionsgene innerhalb der *AGAMOUS*-ähnlichen Gene (Theißen *et al.*, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Die Entstehung dieser Genkladen dürfte demnach ein entscheidender Schritt in der Evolution der floralen homöotischen Funktionen und damit auch der Blütenorgane selbst gewesen sein. Analysen der MADS-Box-Gene in phylogenetisch informativen Pflanzengruppen erbringen zunehmend neue wertvolle Informationen über die Evolution

der Reproduktionsorgane von Pflanzen (Becker *et al.*, im Druck; Münster *et al.*, 1997; Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.* 1995; 1998; Winter *et al.*, 1999). Die MADS-Box-Gene, die aus den Farnen *Ceratopteris* und *Ophioglossum* isoliert werden konnten, weisen zwar die oben beschriebene MIKC-Struktur auf, fallen in Phylogenierekonstruktionen jedoch nicht in die Genkladen, die aus Angiospermen bekannt sind, sondern gründen eigene distinkte Genkladen (Münster *et al.*, 1997). Die Farnene sind demnach wohl Homologe, nicht aber Orthologe der floralen homöotischen Gene von Blütenpflanzen. Gymnospermen hingegen besitzen MADS-Box-Gene, die durch phylogenetische Analysen eindeutig als Mitglieder der aus Angiospermen bekannten Genkladen identifiziert werden konnten. Bisher sind sieben Genkladen bekannt, die sowohl MADS-Box-Gene aus Angiospermen als auch aus Gymnospermen beinhalten, die *AG*-, die *AGL2*-, die *AGL6*-, die *DEF/GLO*-, die *GGM13*-, die *STMADS11*- und die *TM3*-ähnlichen Gene (Becker *et al.*, im Druck). Diese sieben Genkladen existierten demzufolge bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren aller rezenten Samenpflanzen und sind insofern mindestens 300 Millionen Jahre alt. Neben diesen Genen sind aus Gymnospermen jedoch auch MADS-Box-Gene isoliert worden, die nicht in eine bereits aus Blütenpflanzen bekannte Genklade einzuordnen sind (Becker *et al.*, im Druck; Hasebe, 1999; Rudledge *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999). Ob diese Genfamilien spezifisch für Gymnospermen sind oder ob Orthologe aus Angiospermen bisher nur noch nicht gefunden werden konnten, wird sicher durch die Sequenzierung vollständiger Blütenpflanzengenome aufgeklärt werden.

## 1.6 Hypothesen zur Evolution der B- und der C-Funktion

Da Gymnospermen bereits *AG*- und *DEF/GLO*-ähnliche Gene besitzen, muß man folgern, daß Vorläufer der floralen homöotischen Gene bereits im gemeinsamen Vorfahren der rezenten Samenpflanzen vorhanden waren (Abb. 5). Inwiefern die Funktion dieser Gymnospermengene der Funktion der jeweils orthologen Angiospermengene entspricht, ist eine der zentralen Fragen bei der Analyse der Evolution der Blütenentwicklung.

Expressionsanalysen und heterologe Transformationsexperimente der *AG*-ähnlichen Gene *DAL2* aus der Konifere *Picea abies* und *SAG1* aus *Picea mariana* deuten bereits eine recht starke Konservierung von Funktionselementen der C-Funktionsgene an (Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998). Koniferen zeichnen sich durch Reproduktionseinheiten aus, die in eingeschlechtlichen Zapfen angeordnet sind. Männliche Einheiten weisen zahlreiche

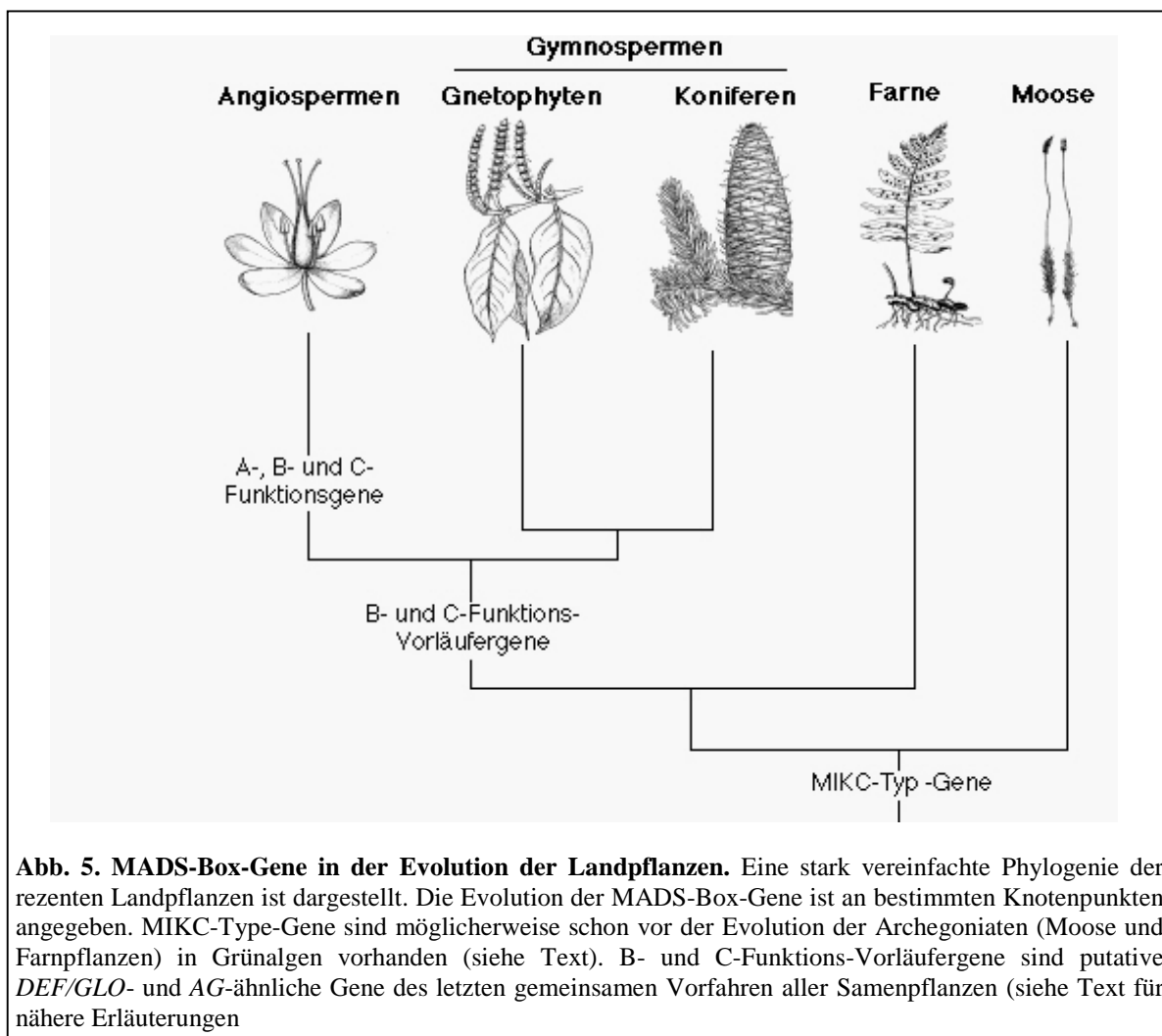
Reproduktionsorgane auf, während eine weibliche Einheit nur aus einer sterilen Deckschuppe und der die Samenanlage tragenden Fruchtschuppe besteht. Das Expressionsmuster von *DAL2* beschränkt sich, wie von *AG*-ähnlichen Genen in Angiospermen bekannt, auf die Reproduktionseinheiten. In weiblichen Zapfen sind die Transkripte nicht in den Deckschuppen, wohl aber in den Samenschuppen nachweisbar. Innerhalb der Ovulen wird *DAL2* nicht exprimiert (Tandre *et al.*, 1995; 1998). Die ektopische Expression dieses Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (*CaMV*) in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zeigte, neben möglicherweise unspezifischen vegetativen Phänotypen, auch homöotische Veränderungen der Blüten. So konnten an den Sepalen stigmatesches Gewebe und Strukturen, die deutliche Ähnlichkeiten zu Ovulen zeigten, festgestellt werden, und die Petalen wiesen Charakteristika von Filamenten auf (Tandre *et al.*, 1998). Ähnliche Experimente mit dem *AG*-Orthologen *SAG1* aus *Picea mariana* resultierten in vergleichbaren Ergebnissen (Rutledge *et al.*, 1998). Obwohl weder Untersuchungen zur Expression des endogenen C-Funktionsgens *AG* noch der A-Funktionsgene *API* oder *AP2* gezeigt wurden, schlossen Tandre *et al.* auf eine Substitution der *AG*-Funktion durch ektopisch exprimiertes *DAL2* (1998). Abgesehen von dieser Interpretation wäre es ebenfalls denkbar, daß das Koniferengen an regulative Elemente der endogenen A- oder C-Funktionsgene von *Arabidopsis* bindet und deren Expression in den Perianthorganen vermindert bzw. ausweitet, was ebenfalls in ähnlichen Phänotypen resultieren sollte. Versuche eine C-Funktionsmutante durch *DAL2* zu komplementieren, wären sicherlich eindeutiger zu interpretieren. Trotzdem bleibt es bemerkenswert, daß das Koniferengen zumindest in der Lage ist, mit regulativen Elementen der C-Funktion einer dikotylen Angiosperme zu interagieren. Diese Interaktionen sind demnach 300 Millionen Jahre konserviert. Aus diesen Daten und Expressionsanalysen des *AG*-ähnlichen *Gnetum*-Gens *GGM3* wurde eine ancestrale C-Funktion der Samenpflanzen, die reproduktive Organe von vegetativen Organen differenziert, postuliert (Theißen *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 1999).

B-Funktionsgene differenzieren in eudikotylen Pflanzen nach dem klassischen ABC-Modell in den vegetativen Blütenkreisen Petalen von Sepalen und in den generativen Blütenkreisen Stamina von Karpellen. Aufgrund dieser Funktionen in Perianthorganen sowie in generativen Geweben der Blüte, wird diesen Genen ein besonders ausgeprägtes Potential in der morphologischen und funktionellen Diversifikation der Blüten zuerkannt (Albert *et al.*, 1998; Baum und Whitlock, 1999; Kramer *et al.*, 1998; Kramer und Irish, 1999; Theißen *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* zeigen Mutationen im B-Funktionsgen *AP3*

(*ap3-3*) eine Transformation der Petalen in Sepalen und der Stamina in Karpelle (Jack *et al.*, 1992), während die vollständige Funktionsverlustmutante *pi-1* hingegen keinen dritten Wirtel bildet, aber einen vergrößerten vierten Blütenkreis aufweist (Bowman *et al.*, 1989). Auch in *Antirrhinum* und *Petunia* wurden in B-Funktionsmutanten leichte Abweichungen von den Vorhersagen durch das ABC-Modell beobachtet (Angenent *et al.*, 1993; Samach *et al.*, 1997; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1993). Dennoch sind B-Funktionsgene in allen bisher untersuchten eudikotylen Pflanzen an der Spezifikation der Stamina beteiligt. Alle bisher analysierten B-Funktionsgene gehören den MADS-Box-Genkladen der *DEF*- oder der *GLO*-ähnlichen Gene an. In allen Angiospermen fanden sich bisher jeweils Mitglieder beider Genkladen (Kramer und Irish, 1999; Ma und dePamphilis, 2000). Die Expressionsmuster der jeweiligen *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene einer Spezies überlappen allgemein im zweiten und dritten Wirtel der Blüten. Sowohl für *AP3* und *PI* als auch für *DEF* und *GLO* konnte nachgewiesen werden, daß ihre jeweiligen Proteine als Heterodimerkomplex (*AP3/PI* bzw. *DEF/GLO*) an DNA binden (Davies *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1998; Riechmann *et al.*, 1996; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tilly *et al.*, 1998). Dieses Prinzip scheint nicht nur für die Modellpflanzen *Arabidopsis* und *Antirrhinum* sondern auch bedingt für basale Eudikotyle (Kramer und Irish, 1999) und sogar für monokotyle Pflanzen wie Reis (Chung *et al.*, 1995; Moon *et al.*, 1999), Mais (Ambrose *et al.*, 2000) und Lilie (A. Kanno und G.Theißen, pers. Mitt.) gültig zu sein.

Trotz dieser allgemeinen Gesetzmäßigkeiten gibt es innerhalb der Angiospermen in verschiedenen Spezies deutliche Unterschiede in der Realisierung der B-Funktion. Während in *Arabidopsis* und *Antirrhinum* die B-Funktion durch je ein Mitglied beider Genkladen ausgeführt wird, existieren in Petunie schon zwei *GLO*-ähnliche Gene. Zudem führt ein Ausschalten des einzigen *AP3*-ähnlichen Gens in Petunie nur zu einer Transformation von Petalen zu Sepalen, die Stamina aber bleiben unverändert (van der Krol *et al.*, 1993). Auch die Monokotylen Reis, Mais und Lilie besitzen mehr als ein *GLO*-ähnliches Gen (Chung *et al.*, 1995; A.Kanno, pers. Mitt.; G.Theißen, pers. Mitt.). Die basalen Angiospermen und die Eudikotylen zeigen außer solchen Duplikationen der *GLO*-Linie auch unabhängige Gen-Duplikationen in den *AP3*-ähnlichen Genen (Kramer *et al.*, 1998; Kramer und Irish, 1999). Ebenso unterscheiden sich die Expressionsmuster der *AP3*- und *GLO*-ähnlichen Gene basaler eudikotyler Angiospermen von denen der Modellpflanzen *Arabidopsis* und *Antirrhinum*. Expression der putativen B-Funktionsgene ist in Stamina während des gesamten Entwicklungszyklus nachweisbar, in Petalen allerdings konnten nur zu Beginn der Entwicklung die Transkripte und ebenso die Proteine

nachgewiesen werden (Kramer und Irish, 1999). Für die vollständige Entwicklung der Petalen scheinen innerhalb der basalen Eudikotylen andere Faktoren verantwortlich zu sein. Diese Variationen in der Spezifikation der Petalen wird als Unterstützung der schon aus morphologischen Daten gewonnenen Hypothese einer mehrfach unabhängigen Evolution der Perianthorgane der Blüten interpretiert (Albert *et al.*, 1998; Baum und Whitlock, 1999; Kramer und Irish, 1999). Die Expression der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene während der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane, der Stamina, scheint hingegen innerhalb der gesamten Angiospermen konserviert zu sein. Eine Art Basisfunktion eines putativen Vorgängergens der floralen B-Funktionsgene dürfte demnach die Spezifikation von männlichen Reproduktionsorganen gewesen sein (Albert *et al.*, 1998; Baum, 1998; Kramer und Irish, 1999; Theißen *et al.*, 2000; Winter, 1997; Winter *et al.*, 1999).



**Abb. 5. MADS-Box-Gene in der Evolution der Landpflanzen.** Eine stark vereinfachte Phylogenie der rezenten Landpflanzen ist dargestellt. Die Evolution der MADS-Box-Gene ist an bestimmten Knotenpunkten angegeben. MIKC-Type-Gene sind möglicherweise schon vor der Evolution der Archegoniaten (Moose und Farnpflanzen) in Grünalgen vorhanden (siehe Text). B- und C-Funktions-Vorläufergene sind putative *DEF/GLO*- und *AG*-ähnliche Gene des letzten gemeinsamen Vorfahren aller Samenpflanzen (siehe Text für nähere Erläuterungen)

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Aus phylogenetischen Studien läßt sich ableiten, daß die Linien der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene aus einer Genduplikation hervorgegangen sind. Beide Genkladen bilden eine gut unterstützte Großklade, die *DEF/GLO*-ähnlichen Gene (Theißen *et al.*, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Orthologe dieser Gene wurden, wie bereits erwähnt, auch aus den Gymnospermen *Gnetum gnemon* (Winter *et al.*, 1999), *Picea abies* (Sundström *et al.*, 1999) und *Pinus radiata* (Mouradov *et al.*, 1999) isoliert. Essentiell für die Beurteilung der Frage, ob es sich bei den aus Gymnospermen isolierten *DEF/GLO*-ähnlichen Genen um die oben postulierten Vorfahren beider B-Funktionsgen-Linien handelt, ist die phylogenetische Stellung dieser Gene. Bisher war es nicht möglich, diese Gene eindeutig der *DEF*- oder der *GLO*-Klade, oder einer basalen Position zu beiden Genkladen zuzuordnen. In dieser Arbeit sollen weitere Versuche unternommen werden, die phylogenetische Stellung der *DEF/GLO*-ähnlichen *Gnetum*-Gene *GGM2* und *GGM15* zu ermitteln.

Ob ein putativer B-Funktionsvorläufer bereits in Gymnospermen existent war, soll außerdem durch hochauflösende Expressionsstudien und funktionelle Analysen des *Gnetum*-Gens *GGM2* im heterologen System der eudikotylen Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Durch die ektopische Expression von *GGM2* unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors kann untersucht werden, ob eventuell auftretende Veränderungen der Entwicklungsprogramme im ersten und im vierten Wirtel der transgenen Blüten eher den Phänotypen gleichen, die durch gemeinsame Überexpression der endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* hervorgerufen werden, oder eher den Veränderungen ähnlich sind, die von alleiniger Überexpression von *AP3* oder *PI* bekannt sind. Eine vollständige homöotische Transformation des ersten und des vierten Wirtels zu Petalen bzw. Stamina wird in *Arabidopsis* nur erreicht, wenn beide B-Funktionsgene *AP3* und *PI* gemeinsam überexprimiert werden (Krizek und Meyerowitz, 1996). Ektopische Expression von *PI* allein resultiert in petaloiden Organen im ersten Wirtel, zeigt aber keine Veränderungen im vierten Wirtel (Krizek und Meyerowitz, 1996), während die Überexpression von *AP3* allein zu staminoiden Organen im vierten Wirtel führt, den ersten Wirtel aber unverändert läßt (Jack *et al.*, 1994). In wildtypischen *Arabidopsis*-Blüten beobachtet man eine Expression von *AP3* außer im zweiten und dritten Wirtel auch im ersten Wirtel, während *PI* in frühen Stadien im zweiten, dritten und vierten Wirtel transkribiert wird. Die durch Überexpression der einzelnen B-Funktionsgene

hervorgerufenen Phänotypen wurden demnach auf die unterschiedlichen wildtypischen Expressionsmuster des jeweiligen Partner-B-Funktionsgens, die somit wieder Heterodimerisierung in den jeweiligen Wirteln erlauben, zurückgeführt (Krizek und Meyerowitz, 1996). Wie stark der Beitrag der endogenen B-Funktionsproteine an den putativen *GGM2*-Überexpressionsphänotypen ist, kann durch Versuche die B-Funktionsmutanten von *Arabidopsis* durch *GGM2* zu komplementieren, beurteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll mit den vollständigen Funktionsverlustmutanten *ap3-3* und *pi-1* sowie mit der temperatursensitiven Mutante *ap3-1*, die bei niedrigen Temperaturen wildtypischen Habitus zeigt, bei hohen Temperaturen aber mutant ist, gearbeitet werden. Daß eventuelle Effekte dieser Experimente nicht einfach auf ektopischer Expression der endogenen B-Funktionsgene, möglicherweise hervorgerufen durch Bindung des *GGM2*-Proteins an regulatorische Elemente der B-Funktionsgenpromotoren, beruhen, wird durch Analyse der Expression sowohl von *GGM2* als auch von *AP3* und *PI in-situ* kontrolliert werden. Überexpressionsversuche von *AP3* können zwar die Modifikationen der *ap3-3* Mutante im dritten Wirtel nicht aber die im zweiten Wirtel komplementieren (Jack *et al.*, 1994). Eine vollständige Komplementation ist hingegen nur möglich, wenn *AP3* durch den eigenen Promotor gesteuert wird (Irish und Yamamoto, 1995; Okamoto *et al.*, 1994). Aus diesem Grund soll ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die *ap3-3* und die *pi-1* Mutante mit einem Konstrukt zu komplementieren, in dem der *GGM2*-cDNA der Promotor von *AP3* (Hill *et al.*, 1998) vorangestellt ist.

Ob *GGM2*-Protein mit einem der beiden endogenen B-Funktionsproteine interagieren kann, ob es als Homodimer Funktionen des endogenen Heterodimers (*AP3/PI*) ausführen kann, oder ob *GGM2* keine Komponente der B-Funktion in *Arabidopsis* substituieren kann, da zum Beispiel der evolutionäre Zeitraum, der die beiden Systeme trennt, einfach zu groß ist, soll Ergebnis dieser Arbeit werden. Kann in *GGM2* ein Modell eines der schon postulierten Vorläufer der homöotischen B-Funktionsgene der Angiospermen gesehen werden?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad (USA), Biozym (Hess. Oldendorf), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Faust (Köln), Gibco-BRL (Neu-Isenburg), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Saekem (USA), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Alle Chemikalien lagen in der Regel im Reinheitsgrad p.A. vor.

Es wurden Enzyme der Firmen New England Biolabs (Schwalmbach), Stratagene (Heidelberg), Gibco BRL (Neu-Isenburg) und Roche (Mannheim) verwendet. Die enzymatischen Reaktionen wurden, wenn nachfolgend nicht anders beschrieben, nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

Radioisotope wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) geliefert. Die spezifische Aktivität des [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP betrug 3000 Ci/mmol.

### 2.2 Medien, Puffer und Lösungen

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

### 2.3 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

#### 2.3.1 Bakterienstämme

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Referenz</b>
<i>E. coli</i> DH10B	Plasmidtransformation	Lorow und Jesse, 1990
<i>E. coli</i> JM109	Plasmidtransformation	Yanisch-Perran <i>et al.</i> , 1985
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	<i>Arabidopsis</i> -Transformation	Van Larabeke <i>et al.</i> , 1974

### 2.3.2 Plasmidvektoren

Name	Beschreibung	Referenz
pBAR-A	Expressionsvektor zur Pflanzentransformation durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , Markergene: BASTA-Resistenzgen, Kanamycin-Resistenzgen	G. Cardon, pers.Mitt.
pGEM-T	Klonierungsvektor für PCR-Produkte Markergen: Ampicillin-Resistenzgen	Summerton <i>et al.</i> , 1983
pRT 100	Expressionsvektor, enthält den CaMV-35S-Promotor Markergen: Ampicillin-Resistenzgen	Töpfer <i>et al.</i> , 1993

## 2.4 Pflanzenmaterial

Vegetatives (Blätter) sowie generatives Pflanzenmaterial (Reproduktionseinheiten) von weiblichen und männlichen Pflanzen der Art *Gnetum gnemon* L. wurden vom Botanischen Garten der Ruhr-Universität Bochum durch Prof. Dr. Stützel zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurden Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* L. benutzt. Insbesondere wurden wildtypische Pflanzen des Ökotyps *Columbia* und die *ap3-1*-, die *ap3-3*- sowie die *pi-1*-Mutante des Ökotyps *Landsberg erecta* verwendet. Die Samen aller hier aufgeführten *Arabidopsis* Pflanzen wurden über das *Arabidopsis Stock Center* (USA) bezogen.

*ap3-1*: CS3085/N3085

*ap3-3*: CS3086/N3086

*pi-1*: CS77/NW77

## 2.5 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die oben genannten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in Klimakammern (Heraeus Vötsch, Balingen) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% angezogen. Pflanzen mit der *ap3-1*-Mutation wurden bei 16°C oder 26°C alle anderen *Arabidopsis*-Pflanzen bei 20°C gehalten. Die Beleuchtung erfolgte in einem Tag/Nachtwechsel von 16h Licht/8h Dunkel (Langtag) bzw. 8h Licht/16h Dunkel (Kurztage).

## 2.6 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente *Escherichia coli* Zellen des Stammes JM109 wurden über die Firma Promega (Heidelberg) bezogen und nach Angaben des Herstellers durch einen 42°C Hitzeschock mit den jeweiligen Vektoren transformiert. Elektrokompente DH10B *E. coli* und GV3108 *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurden nach Chuang *et al.* (1995) hergestellt. Dafür erfolgte die Anzucht bei 18°C (DH10B) bzw. 28°C (GV3108). Die Transformation elektrokompenter Zellen erfolgte durch Elektroporation mit Hilfe des „*E. coli*-Pulser“ der Firma Bio-Rad (USA) nach Protokoll des Herstellers.

## 2.7 *In planta* Transformation von *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis*-Samen wurden in Töpfen mit 12 cm Durchmesser ausgesät und sechs bis acht Wochen bei Kurztag gehalten. Nach weiteren ein bis zwei Wochen bei Langtag Bedingungen wurden junge Hauptinfloreszenzen abgeschnitten, um eine stärkere Infloreszenzverzweigung hervorzurufen. Nach zusätzlichen zwei Wochen unter Langtag-Bedingungen konnten die jungen Infloreszenzen transformiert werden. Dazu wurden nach Bechtold *et al.* (1993) die Anzuchttöpfe kopfüber in Plastikbecher mit *Agrobacterium* Suspension in Infiltrationsmedium getaucht und ein fünfminütiges Vakuum angelegt. Die Pflanzen wurden für eine Nacht mit Plastiktüten bedeckt. Transgene T<sub>1</sub>-Keimlinge wurden ca. eine Woche nach Auskeimen mit 0,1% BASTA selektioniert.

## 2.8 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (Minipräparation) erfolgte über alkalische Lyse nach einem Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989). Für größere Mengen Plasmid-DNA wurde der „*Qiagen Plasmid Maxi Kit*“ nach Angaben des Herstellers Qiagen (Hilden) verwendet.

## 2.8.2 Isolierung von genomischer DNA

### 2.8.2.1 Dieca-Verfahren

Dieca-Puffer:	0,1 M NaCl
	50 mM EDTA
	50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial der Art *Gnetum gnemon* wurden 30 ml Dieca-Puffer mit 0,68 g Natriumdiethyldithiocarbaminat (Dieca), 850 µl 35 % (v/v) Laurylsäure und 16 µl β-Mercaptoethanol versetzt und darin 2 bis 5 g in flüssigem Stickstoff gemörsertes Blattmaterial suspendiert. Die Suspension wurde 90 min bei 4°C inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform aufgereinigt. Die genomische DNA wurde mit 2 Vol. Ethanol gefällt, in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und mit 20 µg/ml RNase A (Roche, Mannheim) und 250µg/ml Proteinase K (Roche, Mannheim) jeweils 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die präparierte DNA mit 1 Vol. Phenol/Chloroform nochmals aufgereinigt und mit Ethanol gefällt.

### 2.8.2.2 CTAB-Verfahren

2 x CTAB-Puffer:	2 % CTAB (w/v)
	100 mM Tris HCl (pH 8,0)
	20 mM EDTA (pH 8,0)
	1,4 M NaCl

Die Methode zur Präparation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial der Art *Arabidopsis thaliana* für DNA-Geltransfer-Analysen („Southern“-Analysen) basierte auf dem Protokoll von Rogers und Bendich (1988). Gemörsertes Pflanzenmaterial wurde in 15 ml/g Frischgewicht 2 x CTAB-Puffer aufgenommen und 20 min bei 65°C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurde mit 1 Vol. Chloroform aufgereinigt, mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen. Nach einer vierzigminütigen Inkubation mit 50 µg/ml RNase A bei 37°C folgte eine weitere Aufreinigung mit 1 Vol. Chloroform und eine Präzipitation der DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,7 Vol. Isopropanol.

Genomische *Arabidopsis*-DNA zur Verwendung in PCR-Analysen wurde nach dem Protokoll von Edwards *et al.* (1991) isoliert.

### 2.8.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial von *Gnetum gnemon* wurde nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Für Verwendung in RNA-Geltransfer-Analysen („Northern“-Analysen) wurde die RNA in Formamid aufgenommen, sonst in mit 0,1 % DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O.

## **2.9 Polymerase-Kettenreaktion- (PCR) gestützte Verfahren**

### 2.9.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit beschriebenen genspezifischen Oligonukleotide (*Primer*) wurden von den Firmen Gibco-BRL (Großbritannien), Metabion (Martinsried) oder MWG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen sämtlicher hier genannten Primer sind im Anhang aufgeführt.

### 2.9.2 Standard-PCR

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente wurden in Thermoblöcken mit beheizbarem Deckel der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. Allgemein wurde *Taq*-DNA-Polymerase und der dazugehörige 10 x Puffer der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die Standardreaktionsbedingungen waren wie folgt: Nach 2 min 94°C (Denaturierung der komplementären DNA-Stränge) folgten 35 Zyklen des PCR-Programms. Ein Zyklus bestand aus 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek *Primer*-Anlagerung bei in Abhängigkeit zu deren Länge und Basenzusammensetzung 50 – 65°C und abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments 30 –120 sek DNA-Synthese bei 72°C. Abschließend folgte ein weiterer 72°C-Schritt von 10 min, um angefangene Synthesen zu beenden.

### 2.9.3 Isolierung von vollständigen cDNAs aus cDNA-Gemischen mittels 5'-RACE

Aus der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit (Winter, 1997) standen cDNA-Fragmente von MADS-Box-Genen, die mittels der 3'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) Technologie isoliert worden waren, zur Verfügung. Da zur weiteren Verwendung in

funktionellen Studien die Sequenzinformation über das gesamte offene Leseraster der jeweiligen Gene benötigt wurde, mußte hier das solchen 3'-RACE-cDNA-Fragmenten fehlende 5'-Ende isoliert werden. Dies erfolgte nach dem Prinzip des 5'-RACE (Frohmann *et al.*, 1988) unter Verwendung des *5'/3'-RACE Kit* der Firma Roche (Mannheim) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Für die Erststrangsynthese mittels eines genspezifischen Primers wurde 1 µg Gesamt-RNA (siehe 2.5.3) aus männlichen Reproduktionsorganen von *Gnetum gnemon* als Vorlage eingesetzt. Der reversen Transkription folgt in diesem Protokoll die Erstellung eines künstlichen polyA-Endes am 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA-Fragmente. In einer anschließenden PCR bindet ein *Oligo-dT-Anker-Primer* die künstlichen Poly-A-Enden und ein genspezifischer *Primer* im bekannten Bereich der cDNA stromaufwärts des ersten genspezifischen *Primers*. Eine weitere PCR (*nested PCR*) führt unter Verwendung eines *Ankerprimers* und eines dritten weiter stromaufwärts bindenden genspezifischen *Primers* zur weiteren Amplifikation der 5'-cDNA-Fragmente. In den hier beschriebenen PCR-Schritten wurde die Polymerase und der Puffer 1 des *Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System* der Firma Roche (Mannheim) verwendet.

Die PCR-Fragmente wurden in pGEM-T Vektoren (Promega, Heidelberg) kloniert und sequenziert. Mit dieser Sequenzinformation wurden *Primer* aus dem 5'-Bereich der entsprechenden Gene abgeleitet und genutzt, um aus schon vorhandenen cDNA-Gemischen (Winter, 1997) die kompletten cDNAs der jeweiligen Gene zu amplifizieren. Komplette cDNAs wurden im Verlauf dieser Arbeit für die Gene *GGM2* und *GGM3* isoliert. Die vollständige cDNA von *GGM15* wurde von Frau Britta Grosardt und Annette Becker zur Verfügung gestellt.

#### 2.9.4 Erstellung von Transformationskonstrukten unter Einführung künstlicher Schnittstellen

Um ein DNA-Fragment, welches das vollständige offene Leseraster eines Gens enthält, unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors *in vivo* zu exprimieren, sollte die Start-ATG-Sequenz des Promotors mit der Start-ATG-Sequenz der zu exprimierenden cDNA übereinstimmen. Exakt passende Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind in solchen Schnittstellen nur sehr selten zu finden, und daher müssen im Normalfall künstliche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingeführt werden. Hierfür wurden *Primer* entworfen, die spezifisch an die das Leseraster flankierende Bereiche der

cDNA binden. Allerdings weisen diese *Primer* an den Stellen, an denen passende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen benötigt wurden, eine Abweichung zur cDNA-Sequenz entsprechend der Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes auf. Da die *Primer*-Sequenzen bei einer Amplifikation der DNA-Fragmente während einer PCR kovalent mit den neu synthetisierten Strängen verbunden bleiben und so später mitgelesen werden, entstehen cDNA-Amplifikate mit den *Primern*-Sequenzen entsprechend veränderten Flanken. Diese können dann mit den jeweils passenden Restriktionsenzymen geschnitten werden und anschließend in einen Vektor ligiert werden.

Nach diesem Prinzip wurde stromabwärts des Stopkodons des *GGM2*-Gens eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt, während um das Startkodon herum eine natürlich vorhandene *Nco*I-Schnittstelle genutzt werden konnte. Für zwei weitere Konstrukte wurden stromaufwärts des natürlichen Stopkodons zwischen der K- und C-Region (siehe Einleitung) nach dem 489. Basenpaar vom Translationsstartpunkt und innerhalb der C-Region nach dem 562. Basenpaar vom Translationsstartpunkt des *GGM2*-Gens künstliche Stopkodons und stromabwärts zu diesen Stopkodons ebenfalls je eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt.

Außerdem wurde ein *GGM2*-Konstrukt hergestellt, in dessen MADS-Box sich ein Translationsstopkodon, bei sonst fortlaufender Sequenz bis zum natürlichen Stopkodon des Gens, befindet. Dieses Konstrukt sollte ein komplettes Transkript, aber kein funktionsfähiges Protein herstellen können. Dazu wurde eine *Dra*I-Schnittstelle so in die MADS-Box des *GGM2*-Gens eingeführt (nach dem 88 Basenpaar vom Translationsstart), daß die TAA-Sequenz innerhalb dieser Schnittstelle (TTTAAA) ein Translationsstopkodon im Leseraster des Gens darstellt. Mittels PCR wurde ein Fragment vom Translationsstart (*Nco*I-Schnittstelle, siehe oben) bis zu dieser *Dra*I Schnittstelle und ein weiteres Fragment von der *Dra*I Schnittstelle ausgehend bis zum natürlichen Stopkodon (*Bam*HI Schnittstelle, siehe oben) generiert, beide Fragmente mit *Dra*I geschnitten und mit T4 Ligase (Stratagene, Heidelberg) zusammen ligiert.

Um das offene Leseraster des *AP3* Gens ebenso für die Klonierung vorzubereiten, wurde eine *Xho*I Schnittstelle fünf Basenpaare vor dem natürlichen Startkodon des Gens eingeführt. Außerdem mußte das natürliche Stopkodon wieder hergestellt werden, da als Vorlage für die Amplifikationen nur ein Konstrukt für ein Fusionsprotein mit verändertem Stopkodon vorlag (C. Perbal, pers. Mitt). Somit wurde ein *Primer* entworfen, der nach dem 697 Basenpaar vom Startkodon das natürliche Stopkodon wiederherstellt, und stromabwärts dieses Stopkodons eine *Xba*I-Schnittstelle einführt.

Alle bisher beschriebenen Fragmente konnten nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in den bereits über den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (*CaMV*) verfügenden pRT100-Vektor im Leseraster des 35S-Promotors kloniert werden.

Um das *GGM2*-Gen spezifisch nur im zweiten und dritten Wirtel der *Arabidopsis* Blüte zu exprimieren (siehe Einleitung), wurde ein Konstrukt erstellt, in dem *GGM2* an Stelle des CaMV-35S-Promotors durch den endogenen *Arabidopsis*-*AP3*-Promotor kontrolliert wird. Dazu wurde ein 1,7 kBp Fragment des *AP3*-Promotors (pV51-MAD entspricht pAP3 in Hill *et al.*, 1998) mit *Primern* amplifiziert, die eine künstliche *HincII*-Schnittstelle am 5'Ende und eine *NcoI*-Schnittstelle am Start ATG des Promotorfragments generieren. Der CaMV-35S-Promotor wurde über *HincII* und *NcoI* aus dem pRT100-Vektor herausgeschnitten und das *AP3*-Promotorfragment dafür hinein kloniert. In den so vorbereiteten Vektor wurde dann über *NcoI* und *BamHI* das PCR-Fragment des *GGM2*-Gens (siehe oben) ligiert.

Um *Arabidopsis thaliana* mittels der *Agrobacterium*-Infiltrationsmethode mit den erstellten Konstrukten transformieren zu können, mußten die generierten Promotor-Gen-Kassetten aus dem pRT100-Vektor in den pBAR-A-Vektor kloniert werden. Dafür wurden die kompletten Kassetten mit *Primern* amplifiziert, die an den Flanken *EcoRI*-Schnittstellen generieren. Über diese Schnittstellen konnten die Konstruktkassetten in den pBAR-A-Vektor kloniert werden. Zur Überprüfung der Korrektheit wurden alle Konstrukte sequenziert.

#### 2.9.5 Aufklärung der Exon/Intron Struktur mittels genomischer PCR

Die Exon/Intron Struktur ist bei MADS-Box-Genen höherer Pflanzen relativ stark konserviert. Das gibt die Möglichkeit aus einem Computersequenzvergleich (*Alignment*) von MADS-Box-Gen-cDNAs mit bekannter Exon/Intron-Struktur die noch nicht bekannten Exon/Intron-Grenzen der cDNAs nahe verwandter Gene abzuleiten. Stromauf- und abwärts solcher putativen Exon/Intron-Grenzen wurden *Primer* entworfen, mittels derer in einer PCR mit genomischer DNA als Vorlage die kompletten Introns und flankierende Bereiche der Exons amplifiziert werden sollten. Für eine solche PCR wurde ca. 1 µg genomische DNA (siehe 2.5.2) aus Blattmaterial von *Gnetum gnemon* eingesetzt. Es wurde ein Standard-PCR-Programm (siehe 2.6.1) allerdings unter Verwendung der Polymerase und des Puffers 2 aus dem *Expand<sup>TM</sup> Long Template Kit* der Firma Roche



(Mannheim) benutzt. Die so erhaltenen PCR-Fragmente konnten nach Aufreinigung mit dem *PCR-Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) direkt sequenziert werden.

Die Exon/Intron Struktur wurde für die Gene *GGM2* und *GGM15* analysiert. Die Sequenzen dieser Untersuchung befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

#### 2.9.6 Isolierung von putativen Promotorbereichen mittels RAGE

Die RAGE- (*rapid amplification of genomic ends*) Technologie basiert auf der sogenannten *Linker PCR* mit genomischer DNA als Vorlage. Sie ermöglicht die Amplifikation von genomischen Sequenzbereichen, die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes eines bestimmten Gens liegen und somit im Normalfall Teile des jeweiligen Promotors des Gens darstellen. Als Vorlage für die eigentliche PCR wurden sogenannte genomische Bibliotheken angelegt. Dazu wurden je 2,5 µg genomische DNA von *Gnetum gnemon* (siehe 2.5.2) mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten. Für die hier beschriebene Analyse wurden fünf Bibliotheken erstellt, deren DNA jeweils mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hinc*II und *Xho*I nach Angaben der Hersteller verdaut wurden. Nach Aufreinigung dieser Ansätze mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) wurden die durch die Restriktionsschnitte verursachten Einzelstrangüberhänge mit Klenow-Enzym (Roche, Mannheim) nach vom Anbieter empfohlenen Protokoll zu stumpfen Enden aufgefüllt. An diese Enden wurde mittels T4-Ligase (Stratagene, Heidelberg) bei RT über Nacht ein Adapter (*Linker*) ligiert, der gemäß der Beschreibung des *Genome Walker<sup>TM</sup> Kit* der Firma Clontech (Heidelberg) synthetisiert wurde. Die Adaptermoleküle bestehen aus einem kurzen Strang, der am 5'-Ende eine Phosphatgruppe und am 3'-Ende eine Aminogruppe trägt, und einem langen Strang. Der lange Strang besitzt ein überhängendes 5'-Ende, während dessen 3'-Ende stumpf mit dem 5'-Ende des kurzen Stranges abschließt und somit an die Enden der oben beschriebenen genomischen DNA-Fragmente paßt. Die Sequenz des Adapters befindet sich im Anhang dieser Arbeit. In einer nun folgenden PCR, deren Programm sich ebenfalls nach den Protokollen des *Genome Walker<sup>TM</sup> Kit* (Clontech, Heidelberg) richtete, wurden ein stromaufwärts gerichteter genspezifischer *Primer* und ein *Adapterprimer*, der einem Teil des Adapter-5'-Überhangs entspricht eingesetzt. So erhaltene Amplifikate wurden 1:50 verdünnt und in einer zweiten PCR weiter amplifiziert. In beiden Reaktionen wurde die Polymerase und der Puffer 2 des *Expand Long Template Kit* der Firma Roche (Mannheim) eingesetzt. Die Produkte der zweiten PCR konnten mittels Gelelektrophorese und dem *Gel-*

*Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt und schließlich in pGEM-T-Vektoren (Promega, Heidelberg) kloniert und sequenziert werden.

Putative Promotorbereiche wurden in dieser Arbeit für die Gene *GGM2* und *GGM15* isoliert.

## 2.10 Markierungen von DNA- und RNA-Sonden

Mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP markierte DNA-Sonden für DNA- und RNA-Geltransfer-Analysen wurden mittels linearer PCR nach Fischer *et al.* (1995) hergestellt. Die markierten linearen PCR-Produkte wurden unter Verwendung des *PCR-Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Einbaurate von markierten Nukleotiden während der Synthesereaktion wurde an einem Aliquot von 1  $\mu\text{l}$  durch einen Scintillationszähler bestimmt.

Mit Digoxigenin markierte RNA-Sonden für *in-situ*-Hybridisierungen wurden mit dem *DIG-RNA Labeling Mix* der Firma Roche (Mannheim) nach Anleitung des Herstellers synthetisiert. Als Vorlage dienten ca. 150-200 Bp lange PCR-Fragmente der jeweilig zu untersuchenden Gene, die mittels *Primer* amplifiziert wurden, durch die eine künstliche T7-Bacteriophagen-Promotorsequenz an eine Flanke der Amplifikate generiert wurde. Für Gegensinnstrangsonden wurde die Promotersequenz an das stromabwärts gerichtete Ende der PCR-Fragmente synthetisiert und für Kontrollsinstrangsonden dementsprechend an das stromaufwärts gerichtete Ende. An diese Promotor-Sequenzen konnte die T7-RNA-Polymerase (Roche, Mannheim) binden und *in-vitro* RNA-Transkripte der PCR-Fragmente erstellen. Bei dieser Synthese-Reaktion wurde mit Digoxigenin markiertes UTP in die RNA-Transkripte eingebaut. Die so synthetisierten RNA-Sonden wurden ohne anschließende Hydrolyse mit Ethanol gefällt und in Formamid aufgenommen. Die Einbaurate von markiertem UTP bei dieser Synthesereaktion wurde mittels Vergleich zu Kontroll-RNA (Roche, Mannheim) in einem *Dot-Blot*-Experiment nach Empfehlungen des Herstellers untersucht.

## 2.11 DNA- und RNA-Geltransfer-Analysen

Der Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen erfolgte per Kapillarblot nach Sambrook *et al.* (1989). Für DNA-Geltransfer-Analysen („*Southern*“) wurden jeweils 10 µg genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf *Hybond N+* Nylonmembranen (Amersham Buchler, Braunschweig) transferiert. Die DNA wurde durch fünfminütige UV-Licht-Behandlung (*Crosslinking*) auf der Membran fixiert. RNA (10 µg) wurde für RNA-Geltransfer-Analysen (*Northern*) im denaturierenden Formaldehyd-haltigen Agarosegel (Sambrook *et al.*, 1989) aufgetrennt und auf *Biodyne B Transfermembran* der Firma Pall (Großbritannien) transferiert und durch zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert.

Die Hybridisierung mit den radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe 2.10) fand in 5 x SSPE, 5 x Denhardts-Lösung und 0,5% SDS bei 68°C über Nacht statt. Anschließend wurden die Membranen zweimal 10 min in 2 x SSPE und 0,1 % SDS, einmal 15 min in 1 x SSPE und 0,1 % SDS und schließlich zweimal 10 min in 0,1 x SSPE und 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen.

## 2.12 *In-situ*-Hybridisierungen

Pflanzenmaterial von *Gnetum gnemon* wurde in 2 % (v/v) Formaldehyd, 5 % (v/v) Essigsäure und 60 % (v/v) Ethanol über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 4°C fixiert. Das Gewebe wurde dann zweimal für 5 min mit 70 % Ethanol gewaschen und über Nacht bei 4°C gelagert. Junge Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* wurden in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1 x PBS für ca. eine Stunde bei RT und dann über Nacht bei 4°C fixiert. Das Gewebe wurde dreimal 15 min in PBS gewaschen und schließlich über eine Ethanolreihe von 30 %, 50 % und 70 % entwässert. In 70 % Ethanol wurde das Gewebe ebenfalls über Nacht bei 4°C gelagert. Für beide Gewebearten wurde die Entwässerung mit 85 %, 95 % und 100 % Ethanol für jeweils 60–90 min fortgesetzt. In 100 % Ethanol fand eine erneute Lagerung über Nacht bei 4°C statt. Zur Einbettung wurden die Gewebe über eine Ethanol/Histoclear-Reihe (2:1 – 1:1 – 1:2) je 30 bis 60 min in 100 % Histoclear überführt. Darin wurde das Gewebe ca. vier Stunden bei RT inkubiert, dann mit festem Paraffin (*Paraplast Plus*, Sherwood Medical, USA) überschichtet und über Nacht bei 60°C inkubiert. Das verflüssigte Paraffin wurde zweimal am Tag über 5 Tage ausgetauscht, die

Gewebe im Paraffin in einer Petrischale ausgerichtet und auf Eis verfestigt. Schließlich wurden Gewebeschnitte von 8  $\mu\text{m}$  Schnittdicke angefertigt.

Die Vorbehandlung, Hybridisierung und Nachbehandlung des geschnittenen Gewebes wurde weitestgehend nach Jackson (1991) durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte mit Histoclear deparaffiniert und mittels einer Ethanolreihe rehydriert. Dann wurden die Schnitte für 20 min in 0,2 M HCl und schließlich für 20 min in 2 x SSPE bei 70°C inkubiert. Der Proteinase-K-Verdau wurde für eine Dauer von 30 min mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K in 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 37°C durchgeführt.

Die Hybridisierung der Schnitte mit den DIG-markierten RNA-Sonden (siehe 2.10) fand über Nacht in einer Feuchtigkeitskammer (in 1:1 Formamid/4 x SSPE getränktes *3MM-Papier*, Whatmann, Großbritannien) bei 50°C statt.

Während der Nachbehandlung wurden die Schnitte in 40  $\mu\text{g/ml}$  RNase A (Roche, Mannheim) in NTE (1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) für 30 min bei 37°C inkubiert und abschließend 30 min mit 1,5 x SSPE und zweimal 30 min mit 0,3 x SSPE bei 55 °C gewaschen.

Die immunologische Detektion erfolgte prinzipiell nach De Block und Debrouwer (1993) unter Verwendung der „*Anti-DIG Fab-Fragmente*“ der Firma Roche (Mannheim). Die Färbung fand für ca. 12 Stunden in 10 % (w/v) PVA in 100 mM TrisHCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$  mit 2  $\mu\text{l/ml}$  NBT (75 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumsals in 70 % Dimethylformamid) und 1,5  $\mu\text{l/ml}$  X-P (50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid) statt.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, an der Luft getrocknet und mit „*Entellan*“ (Merck, Darmstadt) und Deckgläsern versiegelt.

### 2.13 Sequenzanalysen

Die für diese Arbeit notwendigen Sequenzierarbeiten sind ausschließlich von der ADIS (*Automatic DNA Isolation and Sequencing*) Einheit des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln durchgeführt worden.

## 2.14 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Transgene Blüten von *Arabidopsis thaliana* wurden unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskopes *DSM940* der Firma Zeiss (Oberkochen) bezüglich der Zellstruktur von Blütenorganoberflächen analysiert. Dafür wurde Blütenmaterial mit flüssigem Stickstoff tief gefroren und in einem *Cryotrans System CT1500* (Oxford Instruments, Großbritannien) unter Argonatmosphäre mit Gold bedampft.

## 2.15 Computeranalysen

Die in dieser Arbeit ausgeführten Sequenzanalysen wurden unter Verwendung der Programme *AssemblyLIGN<sup>TM</sup> 1.0.9* und *MacVector<sup>TM</sup> 6.5* auf verschiedenen *Power Macintosh* Computern, die mit einer *MacOS 8.6* Oberfläche ausgestattet waren, durchgeführt. Für die Phylogenierekonstruktionen wurden die Programme *Wisconsin package V.10.0 UNIX* der *Genetics Computergroup GCG* (USA) und *PHYLIP Phylogeny Interference Package V.3.5* (Department of Genetics, The University of Washington) auf einem Alpha Server *ES40* mit *Compaq UNIX Tru64 V4.0F* Oberfläche verwendet. Die zugrundeliegenden Sequenzvergleiche (*Alignments*) basierten auf der „170ger Domäne“ (nach Münster *et al.*, 1997) und wurden mit dem Programm *Pileup* des *GCG*-Programmpakets unter Verwendung der Grundeinstellungen (*default parameter*) erstellt. Die daraus resultierenden multiplen Sequenzdateien wurden nach Konvertierung in ein von *PHYLIP* lesbares Dateiformat zur Erstellung einer Distanzmatrix durch das Programm *Protist* des *PHYLIP*-Programmpakets verwendet. Diese Distanzmatrix diente als Grundlage zur Berechnung der phylogenetischen Bäume mittels *Neighbor Joining* Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) durch das Programm *Neighbor* des *PHYLIP*-Programmpakets. Um die Topologie einer Phylogenierekonstruktion statistisch abzusichern, wurden jeweils 100 *Bootstrap*-Proben mittels des *PHYLIP*-Programms *Seqboot* erstellt und die darauf basierenden Phylogenierekonstruktionen miteinander verglichen. Der in Abb. 8 dargestellte Gen-Stammbaum wurde nachträglich unter Verwendung des *PHYLIP*-Programms *Retree* gewurzelt. Die Information über die wahrscheinliche Wurzel des Stammbaums wurde aus Phylogenierekonstruktionen mit für diese Fragestellung aussagekräftigen Datensätzen gewonnen (Becker *et al.*, im Druck; Theißen *et al.*, 2000).

### 3. Ergebnisse

Wie zuvor beschrieben (Einleitung, 1.7), war es Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Beitrag zur Beantwortung der Frage zu leisten, ob das *DEF/GLO*-ähnliche Gen *GGM2* aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* als Modell des postulierten Vorläufers der floralen homöotischen B-Funktionsgene der Blütenpflanzen angesehen werden kann.

Dazu sollte die phylogenetische Stellung der *Gnetum*-Gene *GGM2* und *GGM15* genauer untersucht werden. Außerdem sollten räumlich und zeitlich hoch auflösende Expressionsstudien *in-situ* und funktionelle Analysen *in-planta* Hinweise geben, in welcher Form *GGM2* die homöotische B-Funktion in der eudikotylen Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana* substituieren kann.

#### 3.1 Isolierung von vollständigen cDNAs der Gene *GGM2* und *GGM3*.

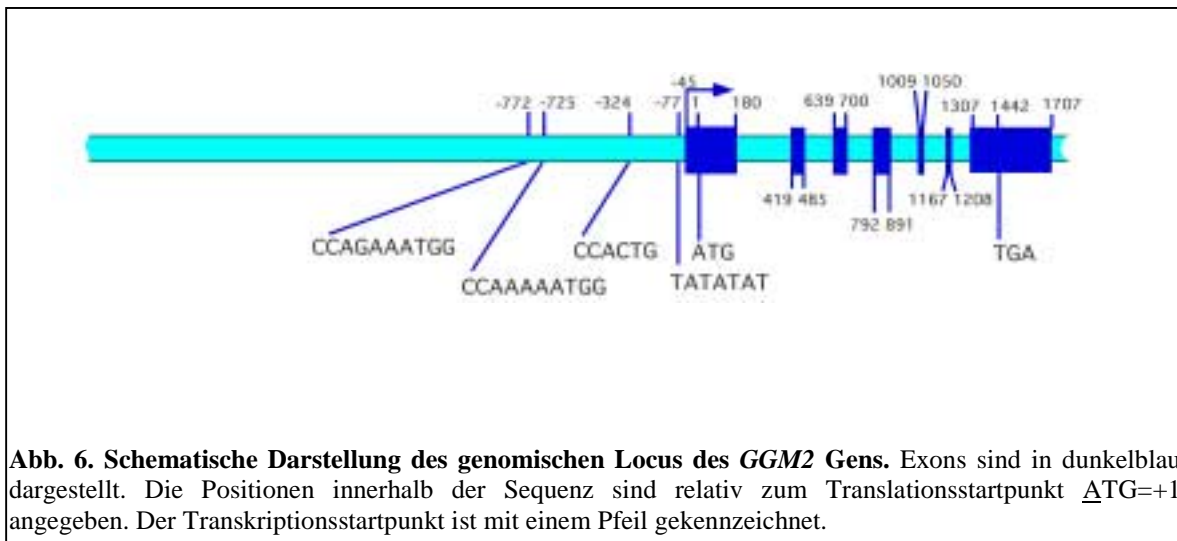
Von den schon vorhandenen 3'-RACE-Fragmenten von *GGM2* und *GGM3* (Winter, 1997) konnten *Primer* abgeleitet werden mit deren Hilfe 5'-RACE-Experimente durchgeführt wurden (2.9.3). Die daraus hervorgegangenen PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Anhand der gewonnenen Sequenzinformation über die stromaufwärts gelegenen Bereiche der Gene wurden sodann *Primer* entwickelt, mit denen die vollständigen cDNAs der betreffenden Gene aus einem cDNA-Gemisch (Winter, 1997) mittels einer Standard-PCR (2.9.1) amplifiziert werden konnten. Nach diesem Prinzip wurde ebenfalls die cDNA von *GGM15* durch Frau Britta Grosardt und Annette Becker isoliert. Eine Darstellung der putativen Aminosäuresequenzen der von den Genen *GGM2*, *GGM3* und *GGM15* kodierten Proteine findet sich in Abb. 9. Die Sequenzen sind außerdem unter den *Accession*-Nummern AJ132208, AJ132209 und AJ251555 über die EMBL, GenBank und DDBJ Datenbanken zu erhalten.

#### 3.2 Analyse der genomischen Struktur von *GGM2* und *GGM15*

Mit Hilfe von genomischer PCR (2.9.5) und der RAGE-Technologie (2.9.6) wurde die genomische Sequenz der *Gnetum* Gene *GGM2* und *GGM15* untersucht. Abb. 6 zeigt die

Verteilung der Exons und Introns sowie einige putativ regulatorische Sequenzeinheiten des *GGM2*-Promotors. Die Verteilungsmuster der Exons und der Introns von *GGM2* entspricht den aus MADS-Box-Genen dikotyler und monokotyler Pflanzen bekannten Schemata (Goto und Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992; Theißen *et al.*, 1995) und zeigt sich demnach sehr konserviert. Das erste Exon von *GGM2* kodiert die komplette MADS-Domäne und den untranslatierten Bereich des 5'-Endes. Insgesamt ist dieses erste Exon 225 Basenpaare lang. Die folgenden in ihrer Länge konservierten Exons sind deutlich kürzer (67 und 62 und 100 Basenpaare) und kodieren die I-Region und die erste Hälfte der K-Domäne (siehe auch Einleitung). Die restliche K-Domäne und der Anfang des C-Terminus liegen auf zwei folgenden ebenso in ihrer Länge konservierten Exons von zweimal 42 Basenpaaren Länge (siehe auch 3.3). Das letzte Exon trägt den restlichen C-terminalen Bereich und das 3'-untranslatierte Ende. Der Transkriptionsstart wurde anhand der 5'-Enden von unabhängigen cDNA-Fragmenten eines 5'-RACE-Experimentes ermittelt. Er liegt 45 Basenpaare stromaufwärts des Startkodons ATG, womit der 5'-untranslatierte Bereich in der für Pflanzengene üblichen Länge von 40 bis 80 Nukleotiden liegt (Joshi, 1987). Das Transkript von *GGM2* beginnt demnach mit einem Guanin-Nukleotid. Diesem Startpunkt konnte auch eine putative TATA-Box zugeordnet werden, die 32 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstart beginnt und damit in dem für Pflanzenpromotoren üblichen Abstand von 32 oder 39 Nukleotiden liegt (Joshi *et al.*, 1987). Außerdem konnte in einem Abstand von 324 Nukleotiden stromaufwärts der Translationsstartsequenz ATG die Konsensussequenz (CCANTG) einer putativen Bindestelle eines Transkriptionsfaktors des FLORICAULA/LEAFY-Typs gefunden werden (Busch *et al.*, 1999). Die genomische Sequenz (Frohlich und Meyerowitz 1997) sowie die cDNA (eigene, in dieser Arbeit nicht beschriebene Daten) eines wahrscheinlich zu diesen Transkriptionsfaktoren orthologen Gens *GNELFY* konnte auch aus *Gnetum gnemon* bereits isoliert werden. Weitere putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, hier für MADS-Domäne-Proteine selbst, konnten 725 und 772 Nukleotide stromaufwärts des Start-ATGs identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um sogenannte „CArG-Boxen“ (CC,AT-rich,GG) mit der allgemeinen Konsensussequenz CC(A/T)<sub>6</sub>GG (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Shore und Sharrocks, 1995; Tilly *et al.*, 1998). Während das weiter stromabwärts gelegene Sequenzmotiv des *GGM2*-Promotors mit CCAAAAATGG exakt der oben erwähnten Konsensussequenz entspricht, weicht die bei -772 gefundene Sequenz mit CCAGAAATGG um ein Nukleotid vom Konsensus ab. Eine ähnlich abweichende CArG-Box wurde auch im *AP3*-Promotor als „CArG-2-Box“ identifiziert. Eine Bindung

des Heterodimer Proteinkomplexes AP3/PI an dieses Sequenzmotiv konnte allerdings nicht gezeigt werden (Tilly *et al.*, 1998).

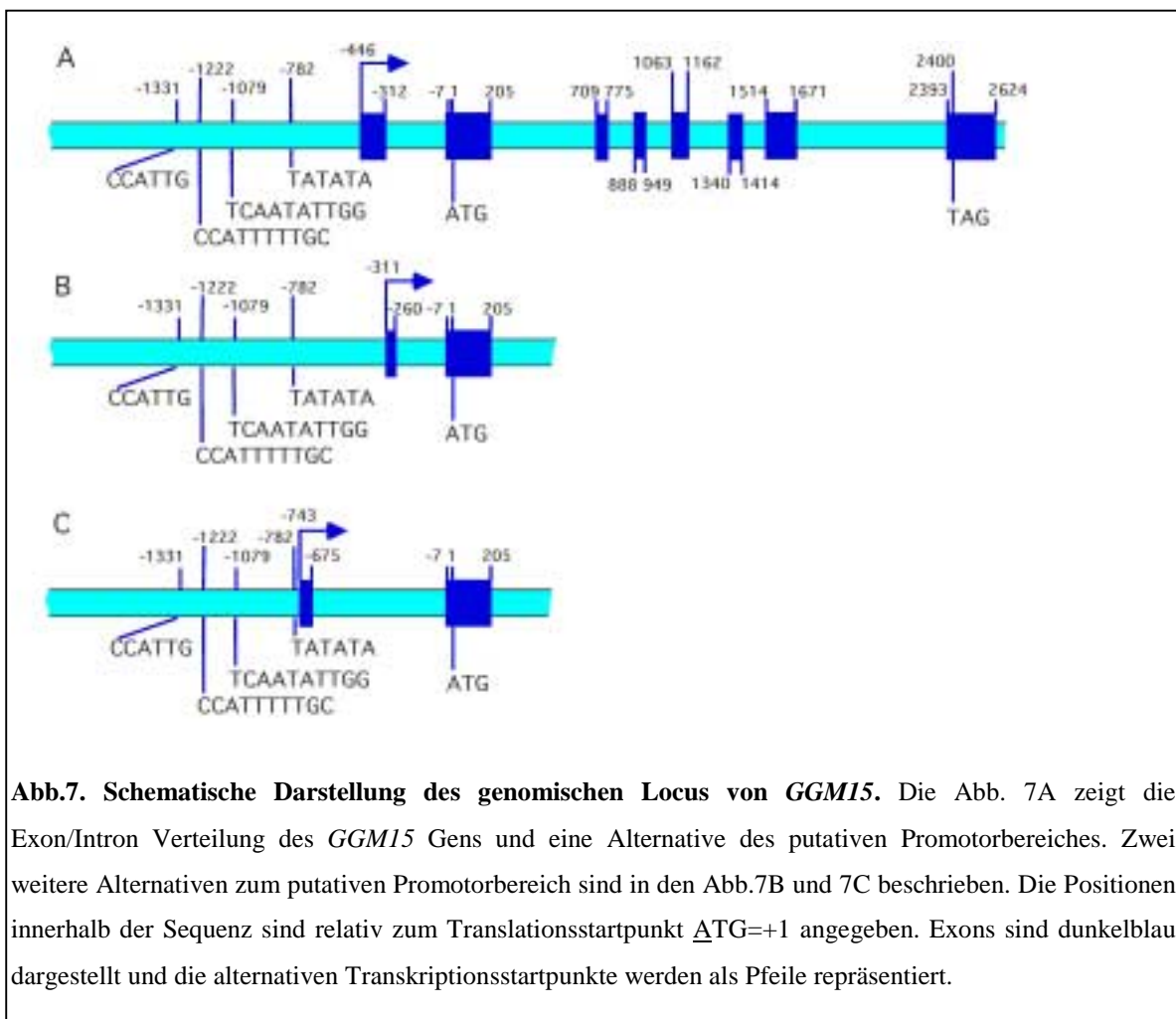


**Abb. 6. Schematische Darstellung des genomischen Locus des *GGM2* Gens.** Exons sind in dunkelblau dargestellt. Die Positionen innerhalb der Sequenz sind relativ zum Translationsstartpunkt ATG=+1 angegeben. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die Exon/Intron-Struktur von *GGM15* (Abb. 7A) weicht in einigen Bereichen von der für *GGM2* beschriebenen Struktur ab. So findet sich, wie aus dem *AG*-Gen von *Arabidopsis thaliana* bekannt (Yanofsky *et al.*, 1990) ein zusätzliches Intron im Bereich der 5'-untranslatierten Region. Das folgende Exon, das die MADS-Domäne und das 3'-Ende des 5'-untranslatierten Bereiches kodiert, ist etwas kürzer als in *GGM2*, nämlich 212 Basenpaare. Auch hier folgen drei Exons von konservierter Länge (67, 62 und 100 Bp), die für die I-Region und die erste Hälfte der K-Domäne kodieren. Während die Mehrzahl aller pflanzlichen MADS-Box-Gene darauf folgend zwei Exons mit je 42 Nukleotiden Länge aufweist, besitzt *GGM15* hier nur ein Exon von 75 Nukleotiden Länge (siehe dazu 3.3 und 4.1). Ein weiteres Intron verteilt den restlichen C-Terminus auf zwei letzte Exons. Die Länge des ersten Introns im 5'-untranslatierten Bereich ist nicht genau zu bestimmen, da RAGE-PCR-Experimente hier drei alternative *Splice*-Stellen und 5'-RACE-cDNAs drei dazu passende Transkriptionsstartpunkte zeigen (Abb. 7A-C). Für die in Abb. 7A gezeigte Alternative müßte allerdings ein relativ langer 5'-untranslatierter Bereich von 141 Nukleotiden angenommen werden. Die gewöhnliche Länge bei pflanzlichen Genen beträgt, wie oben beschrieben, 40-80 Nukleotide (Joshi, 1987), womit die Alternativen in Abb. 7B (58 Nukleotide) und in Abb. 7C (75 Nukleotide) deutlich besser übereinstimmen. Eine putative TATA-Box in für Pflanzenpromotoren gewöhnlichem Abstand von 39 Nukleotiden (Joshi, 1987) konnte jedoch nur für den am weitesten stromaufwärts lokalisierten Transkriptionsstart (Abb. 7C) gefunden werden. Eine CA<sub>n</sub>G-Box, die exakt



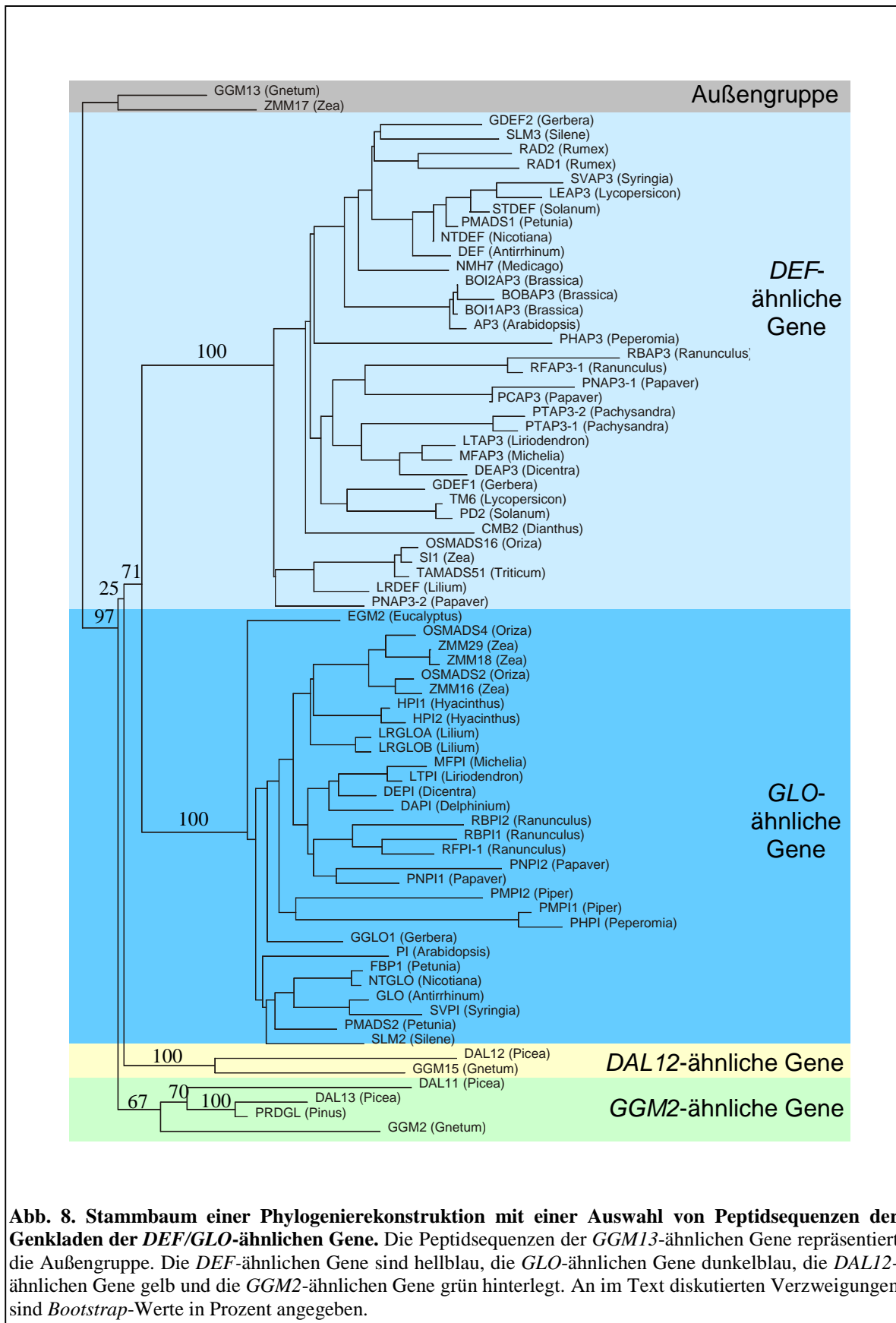
der Konsensussequenz der SRE-Box (siehe oben und Shore und Sharrocks, 1995) entspricht, konnte im putativen *GGM15* Promotor nicht lokalisiert werden. Allerdings finden sich mit TCAATATTGG und CCATTTTTGC nur um ein Nukleotid abweichende Sequenzen 1079 bzw. 1222 Basenpaare stromaufwärts vom Start-ATG entfernt. Eine ähnliche Abweichung zur Konsensussequenz der SRE-Box zeigt auch die im Promotor von *AP3* lokalisierte „CarG-1-Box“, an die *in-vitro* der AP3/PI-Heterodimer Proteinkomplex bindet (Tilly *et al.*, 1998). Bei -1331 relativ zum Start-ATG findet sich eine zum Konsensus der FLORICAULA/LEAFY Bindestellen passende Sequenz (siehe oben). Die kompletten Sequenzen der genomischen Loci von *GGM2* und *GGM15* befinden sich im Anhang dieser Arbeit.



**Abb.7. Schematische Darstellung des genomischen Locus von *GGM15*.** Die Abb. 7A zeigt die Exon/Intron Verteilung des *GGM15* Gens und eine Alternative des putativen Promotorbereiches. Zwei weitere Alternativen zum putativen Promotorbereich sind in den Abb.7B und 7C beschrieben. Die Positionen innerhalb der Sequenz sind relativ zum Translationsstartpunkt  $\text{ATG} = +1$  angegeben. Exons sind dunkelblau dargestellt und die alternativen Transkriptionsstartpunkte werden als Pfeile repräsentiert.

### 3.3 Untersuchungen zur phylogenetischen Stellung von *GGM2* und *GGM15*

Für die Entwicklung neuer Diskussionsansätze bezüglich der Stammesgeschichte der Blütenpflanzen, wird vor allem den B-Funktionsgenen und deren putativen Orthologen aus basalen Blütenpflanzen und Gymnospermen eine außerordentlich wichtige Bedeutung zuerkannt (Albert *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998; Kramer und Irish, 1999; Mouradov *et al.*, 1999; Sundström *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 1999; Theißen *et al.*, 2000). Alle bisher untersuchten B-Funktionsgene sind, wie schon beschrieben (siehe 1.5), Mitglieder der MADS-Box-Genkladen der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene. Die enge Verwandtschaft von *GGM2* und *GGM15* zu den Genen dieser Genkladen konnte schon in dieser Arbeit vorausgegangenen Phylogenierekonstruktionen gezeigt werden (Becker *et al.*, im Druck; Theißen *et al.*, 2000; Winter, 1997; Winter *et al.*, 1999). Außerdem konnte aus diesen Daten auf eine wahrscheinlich monophyletische Gruppe von Genkladen, welche die *DEF*-ähnlichen und die *GLO*-ähnlichen Gene und sowohl *GGM2* als auch *GGM15* und deren Orthologe aus Koniferen umfaßt, geschlossen werden. Diese übergeordnete Genklade soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene bezeichnet werden. Phylogenierekonstruktionen mit Mitgliedern unterschiedlicher Genkladen der MADS-Box-Genfamilie zeigen einerseits deutlich die Zugehörigkeiten der Gene zu den einzelnen Genkladen (Becker *et al.*, im Druck; Münster *et al.*, 1997; Theißen *et al.*, 1996; 2000), die phylogenetische Stellung der Gene innerhalb der jeweiligen Genkladen lassen sich andererseits nur sehr schlecht auflösen. Die Stellung von *GGM2* und *GGM15* innerhalb dieser Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene blieb bisher somit ungeklärt (Becker, *et al.*, im Druck; Theißen *et al.*, 2000; Winter, 1997). Um die Verwandtschaftsbeziehungen der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene besser auflösen zu können, müssen Phylogenierekonstruktionen nur mit Mitgliedern dieser Gruppe von Genkladen durchgeführt werden. Da diese Gene besonders eng miteinander verwandt sind, wird ein präziseres, der Phylogenierekonstruktion zugrunde liegendes, *Alignment* (siehe 2.15) ermöglicht, was eine bessere Auflösung der phylogenetischen Beziehungen der einzelnen Gene zur Folge hat. Da in solchen Stammbäumen keine Mitglieder anderer Genkladen vorhanden sind, ist jedoch die Bestimmung der Wurzel der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene in diesen Bäumen unmöglich. Die Wurzel dieser übergeordneten Genklade ist aber essentiell für die Frage, welche Gene innerhalb der *DEF/GLO*-Klade eine basale Stellung einnehmen.



**Abb. 8. Stammbaum einer Phylogenierekonstruktion mit einer Auswahl von Peptidsequenzen der Genkladen der DEF/GLO-ähnlichen Gene.** Die Peptidsequenzen der GGM13-ähnlichen Gene repräsentiert die Außengruppe. Die DEF-ähnlichen Gene sind hellblau, die GLO-ähnlichen Gene dunkelblau, die DAL12-ähnlichen Gene gelb und die GGM2-ähnlichen Gene grün hinterlegt. An im Text diskutierten Verzweigungen sind *Bootstrap*-Werte in Prozent angegeben.

Aus Phylogenierekonstruktionen mit Vertretern weiterer MADS-Box-Genkladen wurde deutlich, daß die *GGM13*-ähnlichen Gene basal vor der Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene abzweigen, aber dennoch sehr nah mit diesen Genen verwandt sind (Becker et al., im Druck; Theißen *et al.*, 2000). Diese Daten dienen als Grundlage die *GGM13*-ähnlichen Gene als Außengruppe zu den *DEF/GLO*-ähnlichen Genen zu definieren und damit die Wurzel des Stammbaums der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene festzulegen. Die Abb. 8 zeigt eine Phylogenierekonstruktion mit einer Auswahl von Aminosäuresequenzen der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene und der nahe verwandten Genklade der *GGM13*-ähnlichen Gene. Die Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene ist mit einem hohen *Bootstrap*-Wert von 97 % von den *GGM13*-ähnlichen Genen separiert. Innerhalb der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene zeigen sich deutlich die Genkladen der *DEF*-ähnlichen Gene, sowie der *GLO*-ähnlichen Gene, die jeweils mit 100 % *Bootstrap*-Unterstützung abgesichert sind. Ebenso ist die Genklade der *DAL12*-ähnlichen Gene, die nur aus *DAL12* (Sundström *et al.*, 1999) und dem dazu putativ orthologen *GGM15* (Becker *et al.*, im Druck) besteht, mit einem *Bootstrap*-Wert von 100 % unterstützt. Eine weitere Genklade innerhalb der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene bilden die *GGM2*-ähnlichen Gene (*Bootstrap*-Wert von 67 %), in der das Fichtengen *DAL13* (Sundström *et al.*, 1999) und *PRDGL* aus *Pinus radiata* (Mouradov *et al.*, 1999) die engste Verwandtschaft (*Bootstrap*-Wert von 100 %) zeigen. Am nächsten verwandt zu diesem Genpaar ist das Fichtengen *DAL11* (Sundström *et al.*, 1999), womit die Koniferengene mit einer *Bootstrap*-Unterstützung von 70 % innerhalb der *GGM2*-ähnlichen Gene von dem *Gnetum*-Gen *GGM2* separiert sind.

Innerhalb der Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene sind bisher alle *DEF*-ähnlichen und alle *GLO*-ähnlichen Gene aus Angiospermen isoliert worden, während die *GGM2*-ähnlichen und die *DAL12*-ähnlichen Gene ausschließlich aus Gymnospermen isoliert wurden. Die als Außengruppe verwendete Genklade der *GGM13*-ähnlichen Gene weist hingegen sowohl Gene aus Angiospermen als auch aus Gymnospermen auf (Becker *et al.*, im Druck; Theißen *et al.*, 2000). In Abb. 8 zweigen die *GGM2*-ähnlichen Gene basal vor der Genduplikation ab, die zu den *DEF*- und *GLO*-ähnlichen Genen führte und mit einer *Bootstrap*-Unterstützung von 71 % abgesichert ist. Die *DAL12*-ähnlichen Gene nehmen ebenfalls eine basale Stellung zu den Linien der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene ein. Welche dieser beiden Genkladen näher mit den *DEF*- und den *GLO*-ähnlichen Genen verwandt ist, läßt sich dem in Abb. 8 gezeigten Stammbaum nicht entnehmen. Eine sehr schwache *Bootstrap*-Unterstützung von nur 25 % weist auf eine mangelhafte Auflösung dieser Verzweigung hin. Zusammenfassend scheinen aber sowohl *GGM2*-ähnliche Gene

als auch *DAL12*-ähnliche Gene eine basale Position zu einer wahrscheinlich monophyletischen Gruppe aus *DEF*- und *GLO*-ähnlichen Genen einzunehmen.

Neben den Phylogenierekonstruktionen konnte auch innerhalb der Aminosäuresequenzen der putativen GGM2- und GGM15-Proteine weitere Hinweise gefunden werden, welche die Verwandtschaft der entsprechenden Gene mit den *DEF*- und den *GLO*-ähnlichen Genen untermauern. In *Alignments* der putativen Proteinsequenzen von MADS-Box-Genen zeigen GGM2 und GGM15 innerhalb der sogenannten I-Region (nach Münster *et al.*, 1997) eine Deletion, die vorwiegend bei Sequenzen vorkommt, deren Gene ebenfalls der *DEF/GLO*-Klade zugeordnet werden (Abb. 9). Das mit den *DEF/GLO*-ähnlichen Genen nah verwandte *GGM13* zeigt ebenfalls eine solche Deletion. Für *GGM15* und *PRDGL* konnte zudem eine ebenfalls in der I-Region gelegene Insertion nachgewiesen werden (Abb. 9).

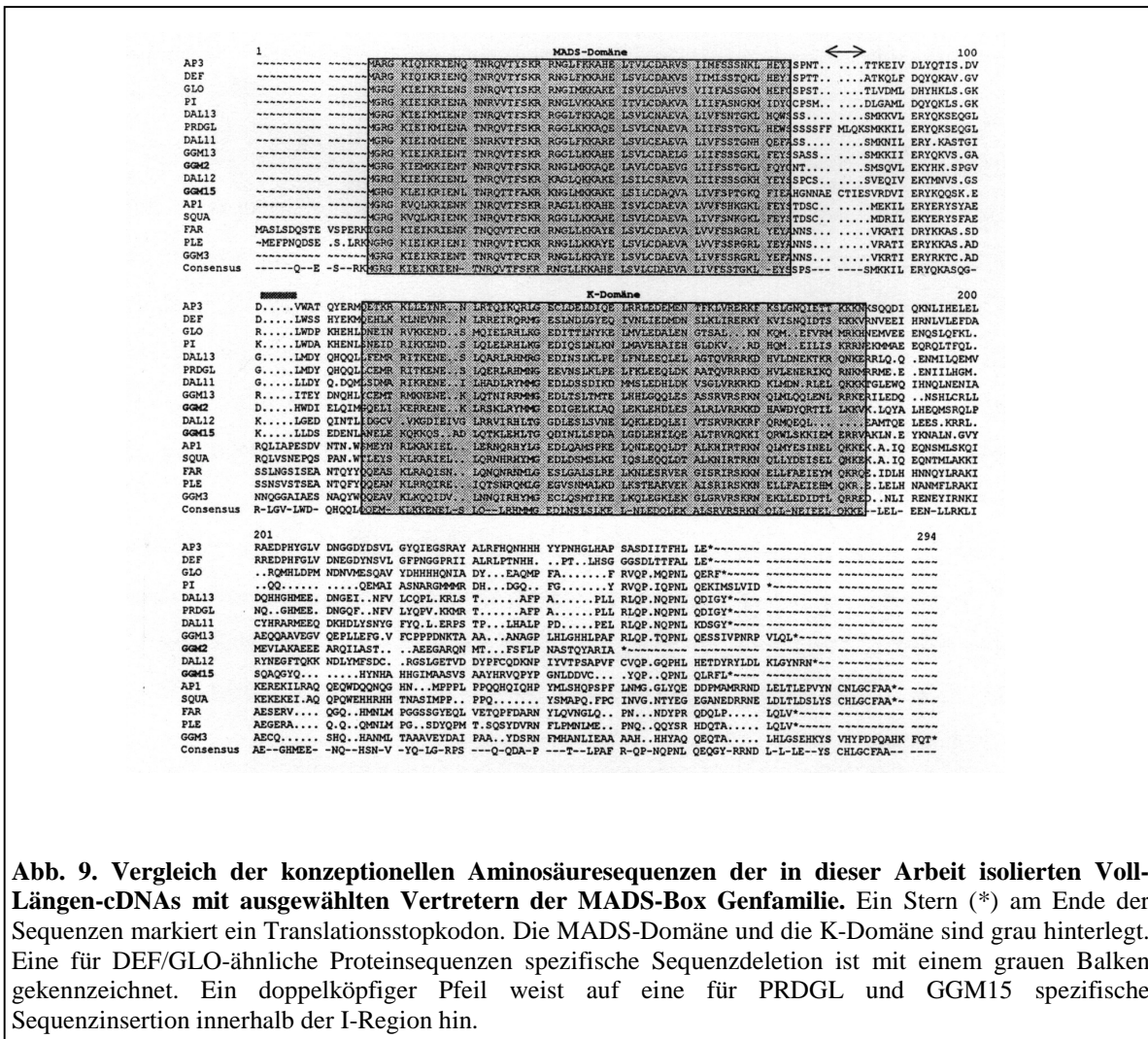
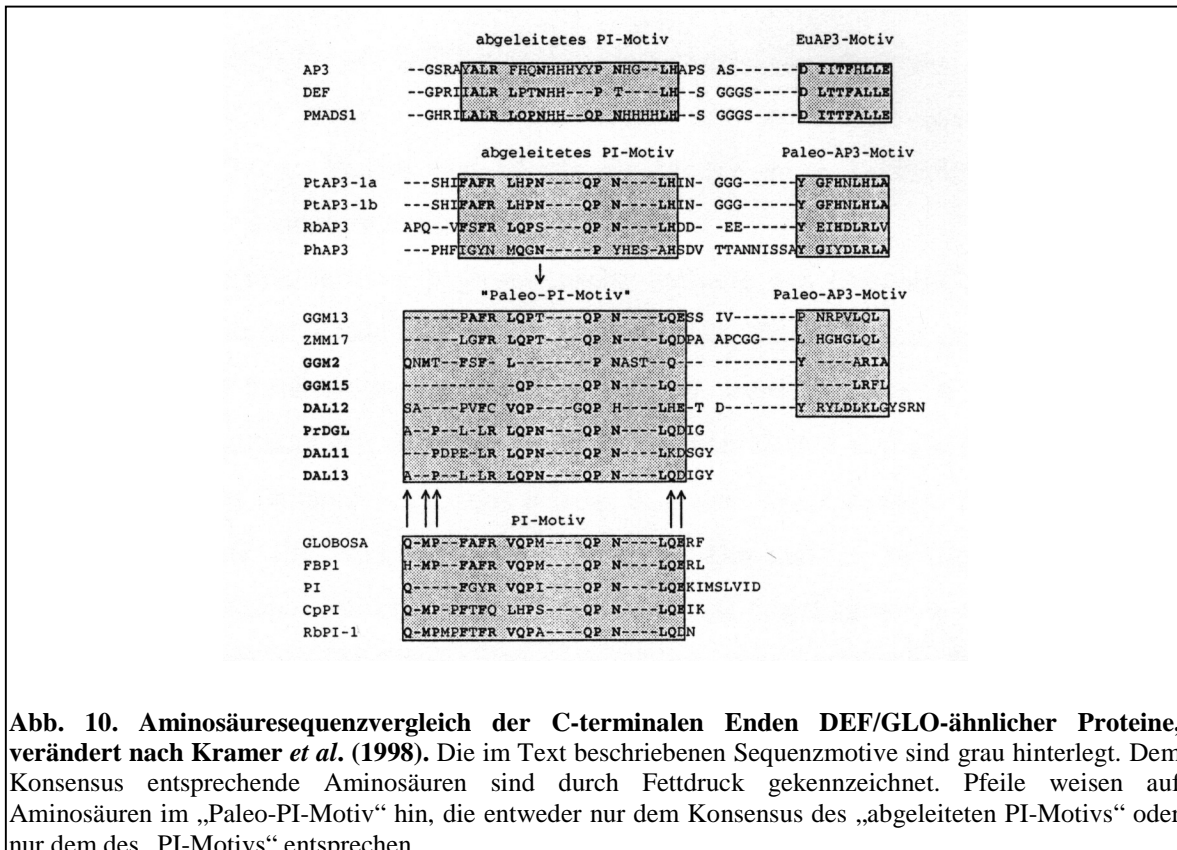


Abb. 9. Vergleich der konzeptionellen Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit isolierten Voll-Längen-cDNAs mit ausgewählten Vertretern der MADS-Box Genfamilie. Ein Stern (\*) am Ende der Sequenzen markiert ein Translationsstopkodon. Die MADS-Domäne und die K-Domäne sind grau hinterlegt. Eine für DEF/GLO-ähnliche Proteinsequenzen spezifische Sequenzdeletion ist mit einem grauen Balken gekennzeichnet. Ein doppelköpfiger Pfeil weist auf eine für PRDGL und GGM15 spezifische Sequenzinsertion innerhalb der I-Region hin.



**Abb. 10. Aminosäuresequenzvergleich der C-terminalen Enden DEF/GLO-ähnlicher Proteine, verändert nach Kramer *et al.* (1998).** Die im Text beschriebenen Sequenzmotive sind grau hinterlegt. Dem Konsensus entsprechende Aminosäuren sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Pfeile weisen auf Aminosäuren im „Paleo-PI-Motiv“ hin, die entweder nur dem Konsensus des „abgeleiteten PI-Motivs“ oder nur dem des „PI-Motivs“ entsprechen.

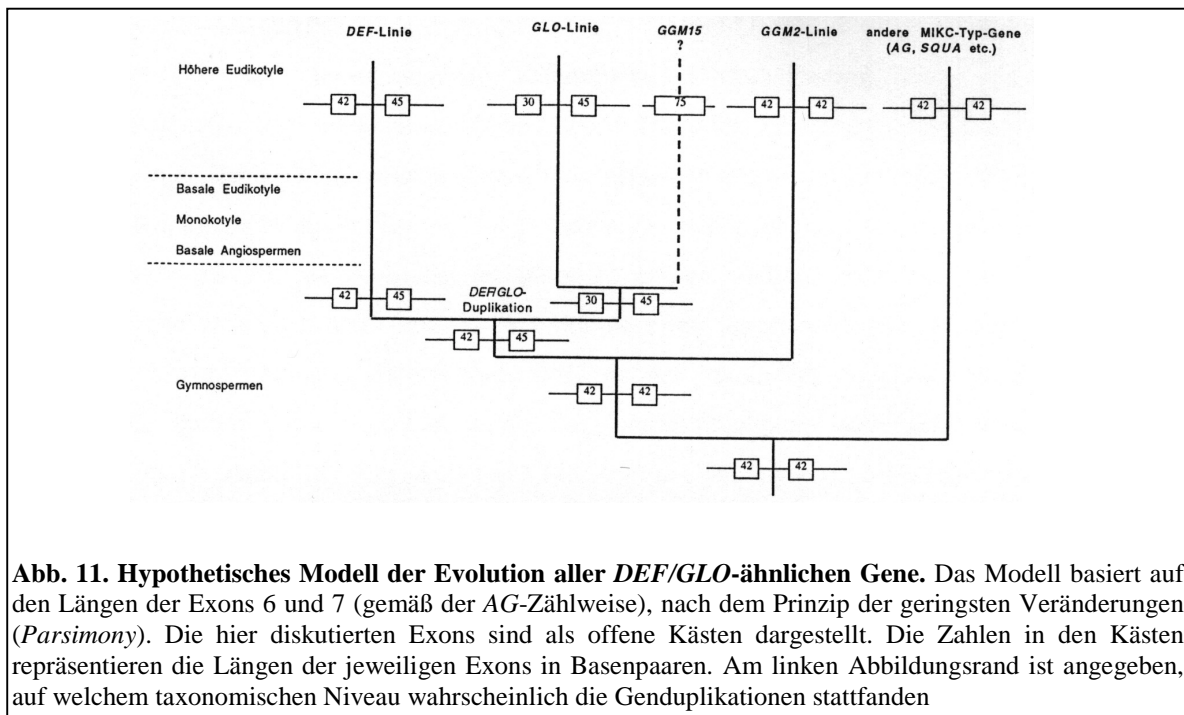
Ein zweites Merkmal findet sich am C-terminalen Ende der abgeleiteten Aminosäuresequenzen *DEF/GLO*-ähnlicher Gene. Dort wurden von Kramer *et al.* (1998) Sequenzmotive identifiziert, die als „PI-Motiv“ für *GLO*-ähnliche Proteine und als „abgeleitetes PI-Motiv“ und „Eu-AP3-Motiv“ für *DEF*-ähnliche Proteine der höheren Eudikotylen und außerdem als „Paleo-AP3-Motiv“ für Proteine niederer Eudikotylen, Monokotylen und basaler Angiospermen bezeichnet wurden. Die im C-Terminus von *GGM2* gefundene Sequenzabfolge zeigt Ähnlichkeiten sowohl mit dem „PI-Motiv“ als auch mit dem „abgeleiteten PI-Motiv“. Außerdem konnte ein Sequenzabschnitt, der Ähnlichkeiten mit dem „Paleo-AP3-Motiv“ aufweist, gefunden werden (Abb. 10). In den Aminosäuresequenzen der zu *GGM2* putativ orthologen Gene aus Koniferen *PRDGL*, *DAL11* und *DAL13* findet sich ebenso das „(abgeleitete) PI-Motiv“, es fehlt jedoch das „Paleo-AP3-Motiv“ (Abb. 10). In den putativen Aminosäuresequenzen von *GGM15* und *DAL12* kann man sowohl ein „(abgeleitetes) PI-Motiv“ als auch ein „Paleo-AP3-Motiv“ erkennen. Auch die abgeleiteten Proteinsequenzen der *GGM13*-ähnlichen Gene zeigen „(abgeleitetes) PI- und Paleo-AP3-Motiv“ (Abb.10). In den Proteinsequenzen der Gymnospermen-Gene ist besonders das „Paleo-AP3-Motiv“ nur recht unvollständig vorhanden, was möglicherweise den hohen evolutionären Abstand zwischen den

Gymnospermen und den Blütenpflanzen reflektiert. Der Sequenzabschnitt, der bei Angiospermensequenzen der DEF/GLO-ähnlichen Proteine entweder das „PI-Motiv“ oder das „abgeleitete-PI-Motiv“ aufweist, zeigt bei den Gymnospermensequenzen Charakteristika beider Motive und könnte als Modell eines Vorläufer beider Motive („Paleo-PI-Motiv“) interpretiert werden (Abb. 10).

Zusätzliche Hinweise auf die phylogenetische Stellung der *Gnetum*-Gene *GGM2* und *GGM15* innerhalb der Klade aller DEF/GLO-ähnlichen Gene konnten durch die Analyse der Exon/Intron-Struktur beider Gene gewonnen werden. Abb. 6 und 7 zeigen schematische Darstellungen der genomischen Loci von *GGM2* und *GGM15*. Das fünfte und sechste Exon (entsprechen Exons 6 bzw. 7, gemäß der Zählweise des *AGAMOUS*-Gens) von *GGM2* sind von besonderem Interesse. Die meisten MADS-Box-Gene mit bekannter genomischer Struktur zeigen für beide Exons eine Länge von 42 Basenpaaren. Alle bisher darauf untersuchten DEF- und GLO-ähnlichen Gene besitzen jedoch ein verlängertes, 45 Bp langes Exon 7 (gemäß der Zählweise des AG-Gens), während zusätzlich das weiter stromaufwärts gelegene Exon 6 (gemäß der Zählweise des AG-Gens) aller GLO-ähnlichen Gene nur 30 Basenpaare aufweist (Goto und Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992). *GGM2* hingegen zeigt für beide Exons eine Länge von 42 Basenpaaren (Abb. 11, siehe auch 3.2 und Abb. 6). Auch die zu *GGM2* putativ orthologen Fichtengene *DAL11* und *DAL13* besitzen an dieser Stelle 42 Bp lange Exons (Sundström *et al.*, 1999). Geht man bei der Entstehung der DEF- und GLO-spezifischen Exons von dem Prinzip der geringsten Veränderungen aus (*Parsimony*), so kann *GGM2* nur einem basalen Ast zugeordnet werden, der vor der Differenzierung der DEF/GLO-ähnlichen Gene in die DEF- und die GLO-ähnliche Gene abzweigt, wie in Abb. 11 dargestellt.

Das sechste Exon von *GGM15* allerdings weist eine Länge von 75 Basenpaaren auf (Abb. 11, siehe auch 3.2 und Abb. 7). Führt man sich vor Augen, daß diese Länge genau der Summe von 30 und 45, also der Länge der GLO-spezifischen Exons, entspricht, so wird die Vermutung nahegelegt, daß das sechsten Exon von *GGM15* durch eine Fusion von einem 30 Bp langen Exon 6 und einem 45 Bp langen Exon 7 entstanden ist. Demzufolge wäre *GGM15* besonders nah mit den GLO-ähnlichen Genen verwandt (Abb. 11). Das putativ orthologe Gen *DAL12* besitzt jedoch ein Exon 6 mit einer Länge von 113 Basenpaaren (Sundström *et al.*, 1999), was zu keiner der bisher bekannten genomischen Strukturen paßt. Es bleibt also zu diskutieren, ob das 75 Bp lange Exon von *GGM15* als

Fusion der 30 und 45 Bp langen Exons der *GLO*-ähnlichen Gene oder als Variation eines längeren Exon 6 der *DALI2*-ähnlichen Gene gesehen werden kann.



**Abb. 11. Hypothetisches Modell der Evolution aller DEF/GLO-ähnlichen Gene.** Das Modell basiert auf den Längen der Exons 6 und 7 (gemäß der AG-Zählweise), nach dem Prinzip der geringsten Veränderungen (*Parsimony*). Die hier diskutierten Exons sind als offene Kästen dargestellt. Die Zahlen in den Kästen repräsentieren die Längen der jeweiligen Exons in Basenpaaren. Am linken Abbildungsrand ist angegeben, auf welchem taxonomischen Niveau wahrscheinlich die Genduplikationen stattfanden

### 3.4 Expressionsmuster von *GGM2* und *GGM3*

Vorangegangene Expressionsanalysen mittels Northern-Hybridisierungen hatten gezeigt, daß das AG-ähnliche Gen *GGM3* in den getesteten generativen, nicht aber in den vegetativen Geweben transkribiert wird. Die Transkripte dieses Gens ließen sich sowohl in männlichen als auch in weiblichen Strukturen nachweisen (Winter, 1997). Transkripte des DEF/GLO-ähnlichen Gens *GGM2* konnten hingegen nur in männlichen generativen Geweben festgestellt werden, nicht jedoch in weiblichen generativen Strukturen und nicht in vegetativen Blattgeweben (Abb. 12A-B) (Winter, 1997). Für die Transkription von *GGM15* konnte ein der *GGM2*-Expression sehr ähnliches Muster festgestellt werden, auch hier ließen sich die Transkripte in männlichen nicht aber in weiblichen generativen Geweben und nicht in vegetativen Geweben nachweisen (Becker *et al.*, im Druck). Um den Expressionsnachweis für diese Gene innerhalb der reproduktiven Strukturen räumlich und zeitlich höher aufzulösen, wurden *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt.

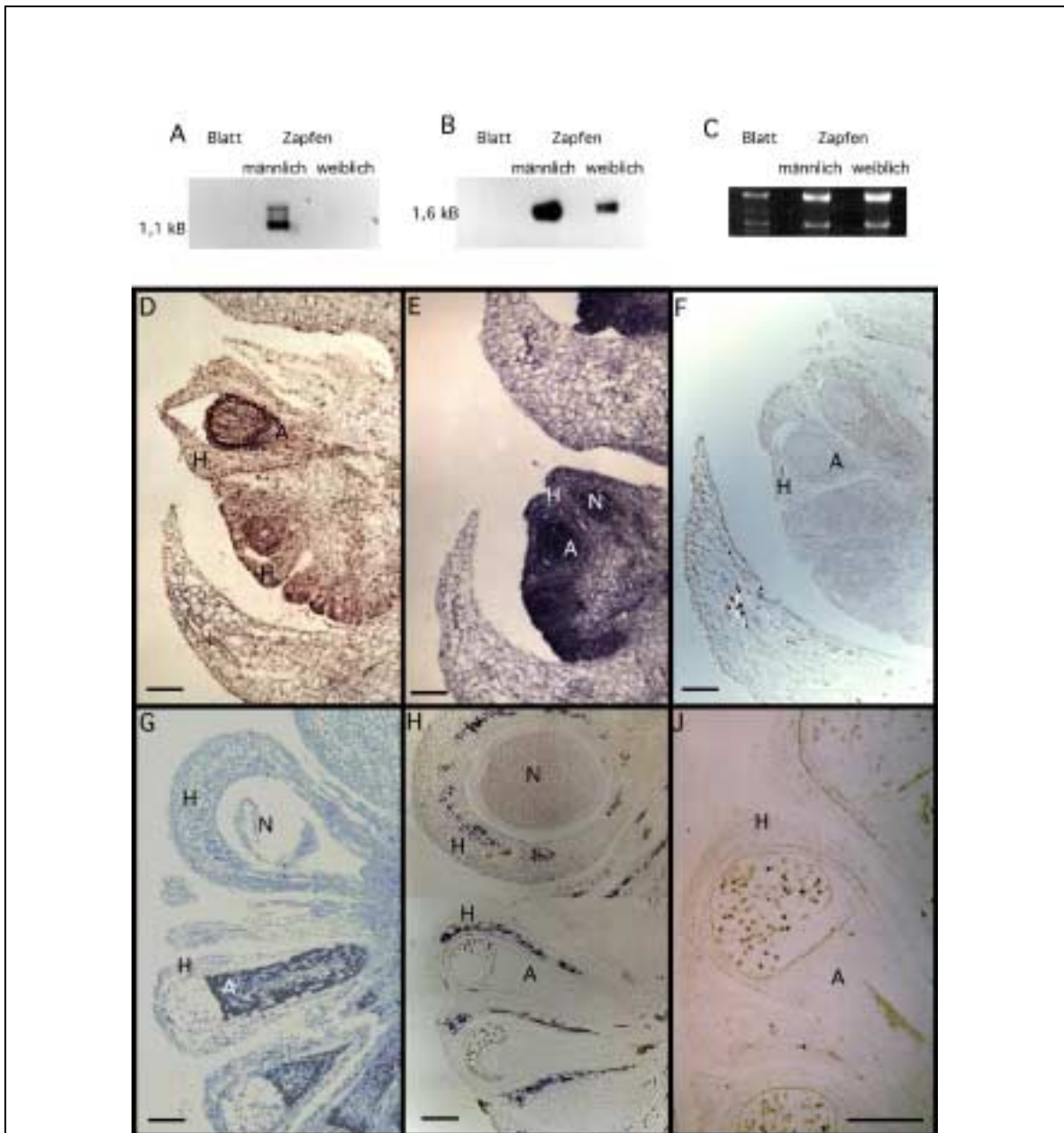
Nach diesen Analysen beschränkt sich das Signal von *GGM2* auf die männlichen Reproduktionseinheiten. Kein Signal konnte innerhalb der sterilen weiblichen Einheiten, die ebenfalls im männlichen Zapfen vorhanden sind (siehe auch Einleitung, Abb.1),



gefunden werden. Innerhalb der männlichen Reproduktionseinheiten beschränkt sich die Transkription von *GGM2* auf die Antherophoren. In den die Antherophoren umgebenden Hüllorganen ist kein Signal nachweisbar (Abb. 12D und G). Die Expression von *GGM2* scheint mit der morphologisch erkennbaren Differenzierung der männlichen Reproduktionsorgane zu beginnen (Abb. 12 D). Die Abb. 12D zeigt einen Längsschnitt durch einen Strobilus männlicher Reproduktionseinheiten mit anschaulicher Abfolge von Einheiten unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Die Reife der Einheiten nimmt von unten nach oben zu. Ein erstes Signal ist schon in einem Stadium erkennbar, in dem die Hüllorgane sich noch nicht um das sich entwickelnde Reproduktionsorgan geschlossen haben. Mit zunehmender Entwicklung wird an der Spitze der Antherophore die sich bildende Pollenkammer sichtbar, in der das Signal zunehmend schwächer wird (Abb. 12D), bis es schließlich dort in den gebildeten Pollen nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 12G). Auch ist in reiferen Entwicklungsstadien kein *GGM2*-Transkript im Antherophorengewebe direkt um die Pollenkammer nachweisbar (Abb. 12 G), wohingegen ein solches Signal im spätesten Entwicklungsstadium der Abb. 12D noch deutlich erkennbar ist. Das ebenfalls *in-situ* untersuchte Expressionsmuster von *GGM15* zeigt sich zumindest für die jüngeren Entwicklungsstadien dem für *GGM2* beschriebenen Muster sehr ähnlich (A. Becker, pers. Mitt.).

Das *AG*-ähnliche Gen *GGM3* wird dagegen in frühen Entwicklungsstadien in allen Organen sowohl der männlichen als auch der weiblichen Reproduktionseinheiten exprimiert (Abb. 12E). Innerhalb der sterilen weiblichen Einheiten des männlichen Zapfens ist ein besonders starkes Signal im Nucellus erkennbar, aber auch in den Hüllorganen, die den Nucellus umschließen ist das Transkript nachweisbar. In den männlichen Einheiten, deren Entwicklungsstadien in dem in Abb. 12 E gezeigten Längsschnitt ebenfalls gut zu verfolgen sind, ist die Expression von *GGM3* noch etwas früher als für *GGM2* nachweisbar (vergl. Abb. 12D mit E). Deutlich zu erkennen ist das Signal in den sich entwickelnden Antherophoren und den umgebenden Hüllstrukturen. Mit zunehmender Reife scheint die Expression in den Hüllorganen abzunehmen (Abb. 12E), ein Eindruck der wahrscheinlich aber durch die zunehmende Zellgröße verursacht wird. In späten Entwicklungsstadien beschränkt sich die Transkription von *GGM3* auf die inneren Zellschichten dieser Hüllorgane sowohl der weiblichen als auch der männlichen Reproduktionseinheiten. Im Nucellus und den Antherophoren ist das Signal jedoch nicht mehr nachweisbar (Winter, 1997) (Abb. 12H). Hybridisierungen der Gewebe mit Sinnstrang-Kontrollsonden ergaben keine nachweisbaren Signale, hier exemplarisch

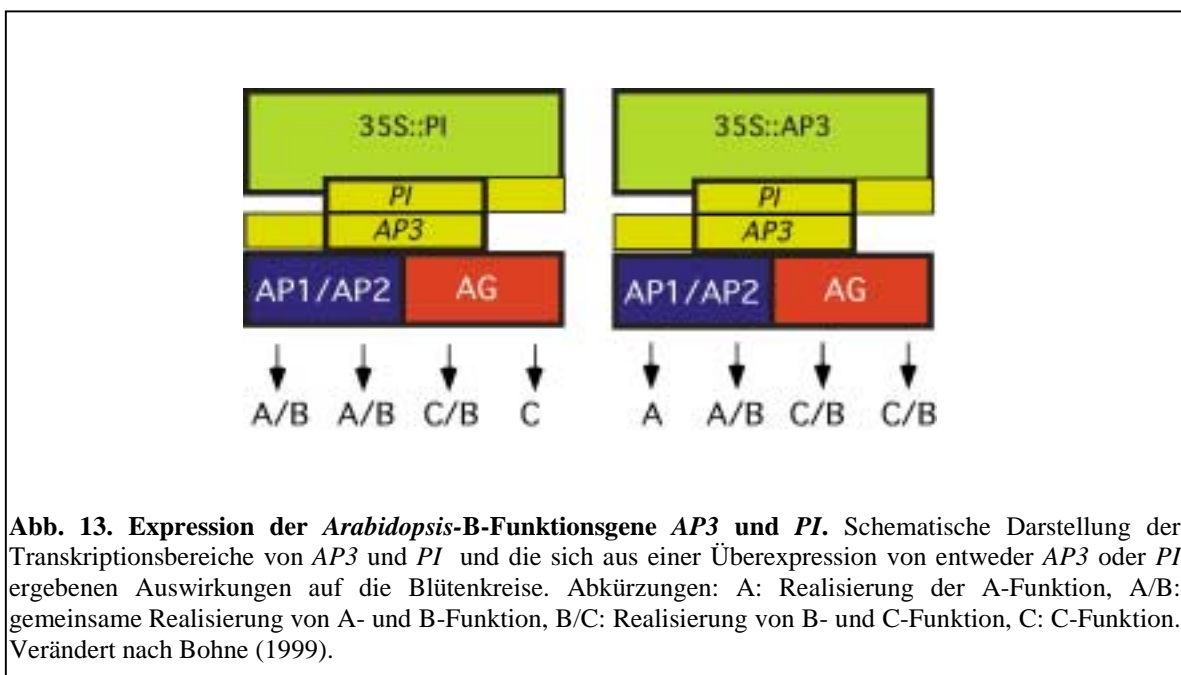
gezeigt an einem Längsschnitt durch einen Strobilus eines jüngeren (Abb. 12F) und eines reiferen (Abb. 12H) Entwicklungsstadiums, hybridisiert mit einer *GGM2*- bzw. *GGM3*-Sinnstrang-Kontrollsonde.



**Abb. 12. Expressionsmuster der *Gnetum*-Gene *GGM2* und *GGM3*.** Abb. 12A und B: Autoradiographie einer RNA-Filter-Hybridisierung mit einer für *GGM2* spezifischen DNA-Sonde (Abb.:12A) und mit einer DNA-Sonde spezifisch für *GGM3* (Abb. 12B). Abb. 12C: UV-Licht Photographie des RNA-Gels, als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung. Abb. 12D bis J: *In-situ*-Hybridisierungen von Längsschnitten durch männliche Zapfen von *Gnetum gnemon* mit für *GGM2* spezifischen RNA-Gegensinnsonden (Abb. 12D und G), mit für *GGM3* spezifischen RNA-Gegensinnsonden (Abb 12E und H) und mit RNA-Sinnstrangsonden (siehe Text) als Negativkontrolle (Abb. 12F und J). Abb. 12D-F: Männliche Zapfen in einem relativ jungen Entwicklungsstadium. Abb. 12G-J: Männliche Zapfen in einem relativ fortgeschrittenen Entwicklungsstadium. Abb. 12A, B, H und J sind aus der vorangegangenen Diplomarbeit Winter (1997) entnommen. Die eingespiegelten Balken entsprechen jeweils 200  $\mu$ m. Abkürzungen: A: Antherophore, H: äußere Hüllorgane, kB: Kilo-Basen, N: Nucellus.

### 3.5 Überexpression von *GGM2* im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*

Da funktionelle Studien wie Überexpression bestimmter Gene und Komplementation von Mutanten in *Gnetum gnemon* aus praktischen Gründen nicht durchgeführt werden können, müssen sich *in-planta* Analysen auf heterologe Systeme beschränken. Als heterologe Modellpflanze wurde für diese Studien *Arabidopsis thaliana* ausgesucht, da sich dieses System durch einfache Handhabbarkeit und etablierte Transformationsprotokolle auszeichnet. Bei der Überexpression eines *DEF/GLO*-ähnlichen putativen B-Funktionsgens können innerhalb der Blüte vor allem Veränderungen im ersten und vierten Wirtel erwartet werden, da in wildtypischen *Arabidopsis* Pflanzen hier keine natürliche B-Funktion vorhanden ist (vergl. die Pictogramme in Abb.14A mit B und C und siehe Einleitung). Bei einer vollständigen funktionellen Äquivalenz des Transgens und der endogenen B-Funktionsgene sollten im ersten Wirtel Petalen statt Sepalen und im vierten Wirtel Stamina statt Karpellen auftreten. Solche Veränderungen sind für *Arabidopsis* Pflanzen beobachtet worden, die gleichzeitig beide endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* überexprimieren, nicht aber für Pflanzen, die nur eines dieser beiden Transgene ektopisch exprimieren (Krizek und Meyerowitz, 1996). Pflanzen, die allein *PI* überexprimieren zeigen vor allem Veränderungen im ersten Wirtel (Abb. 14C; Krizek und Meyerowitz, 1996), während Pflanzen, die ektopisch *AP3* ausbilden eher im vierten Wirtel modifiziert sind (Jack *et al.*, 1994).



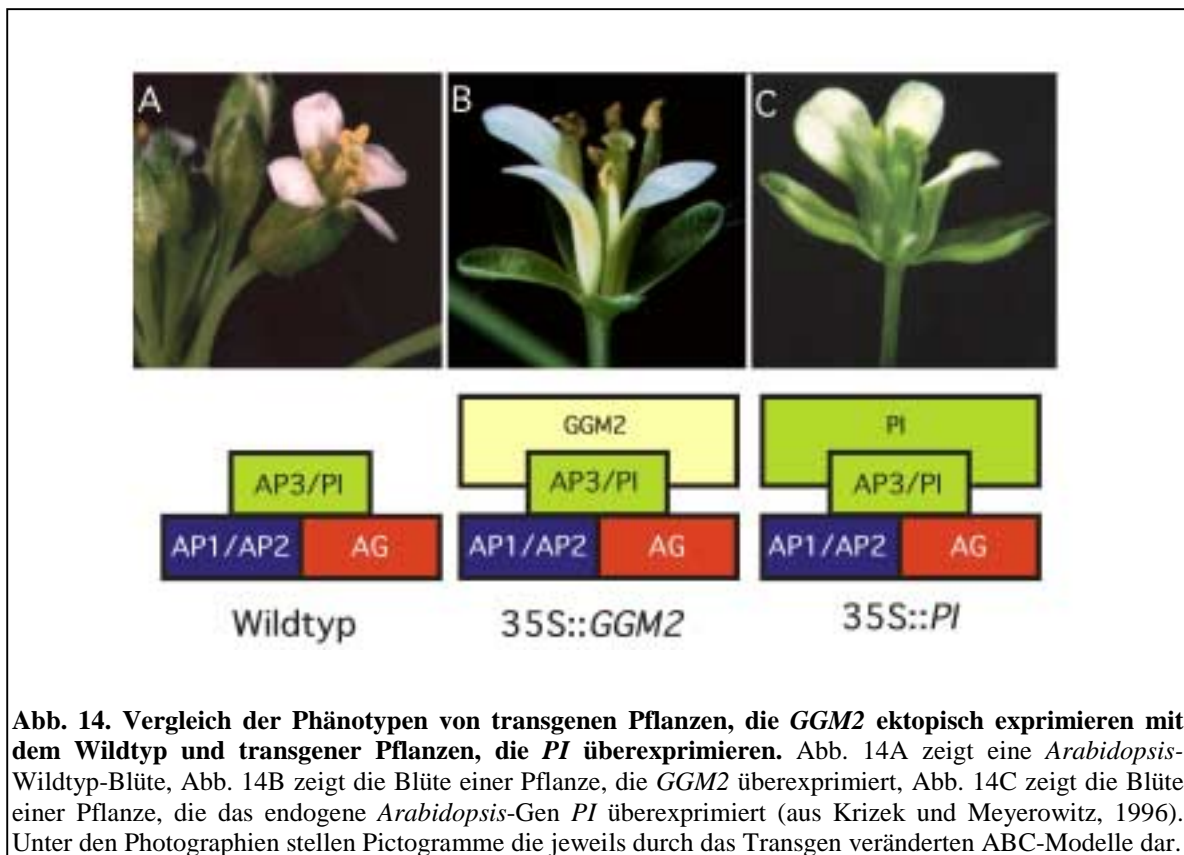
**Abb. 13. Expression der *Arabidopsis*-B-Funktionsgene *AP3* und *PI*.** Schematische Darstellung der Transkriptionsbereiche von *AP3* und *PI* und die sich aus einer Überexpression von entweder *AP3* oder *PI* ergebenden Auswirkungen auf die Blütenkreise. Abkürzungen: A: Realisierung der A-Funktion, A/B: gemeinsame Realisierung von A- und B-Funktion, B/C: Realisierung von B- und C-Funktion, C: C-Funktion. Verändert nach Bohne (1999).

Diese Ergebnisse werden vor allem auf die unterschiedlichen Expressionsbereiche von *AP3* und *PI* zurückgeführt (siehe 1.7). Während *AP3*-Transkripte im ersten, zweiten und dritten Wirtel wildtypischer *Arabidopsis*-Blüten nachgewiesen werden konnten, findet man *PI*-Transkripte im zweiten, dritten und vierten Blütenkreis (Abb. 13) (Jack *et al.*, 1994; Krizek und Meyerowitz, 1996). Bei Überexpression von entweder *AP3* oder *PI* kann sich demnach im ersten bzw. vierten Wirtel möglicherweise der *AP3/PI*-Heterodimerkomplex bilden, was zu den phänotypischen Veränderungen führen könnte (Krizek und Meyerowitz, 1996).

In den folgenden Analysen sollten erste Hinweise, in welchem Umfang *GGM2* die Funktion der *Arabidopsis*-B-Funktionsgene *AP3* und *PI* substituieren kann, durch die Überexpression von *GGM2* in wildtypischen *Arabidopsis* Pflanzen gewonnen werden. Hierfür wurden *Arabidopsis* Pflanzen mit einem Konstrukt, bestehend aus dem CaMV-35S-Promotor und *GGM2*-cDNA (35S::*GGM2*), transformiert (siehe 2.9.4). Insgesamt konnten acht unabhängige T<sub>1</sub>-Linien transgener, BASTA-resistenter Pflanzen generiert werden (als T<sub>0</sub>-Generation werden hier die Pflanzen des Transformationsexperiments bezeichnet). Von jeweils vier Pflanzen jeder T<sub>1</sub>-Linie wurden Samen geerntet und als T<sub>2</sub>-Generation ausgesät. 17 der 24 Linien der T<sub>2</sub>-Generation, die Vertreter mit dem auffälligen mutanten Phänotyp (wie in Abb. 14 gezeigt) aufwiesen, wurden weiter analysiert (siehe Abb. 18). Zehn Pflanzen jeder T<sub>2</sub>-Linie wurden mit dem bloßen Auge auf die in Abb. 14 und 17 dargestellten Merkmale untersucht. Der mutante Blüten-Phänotyp (siehe Abb. 14) segregierte in der T<sub>2</sub>-Generation jeweils im Verhältnis 1:3. Je Linie wurden von vier Pflanzen mit besonders auffälligen Merkmalen (s.o.) Samen geerntet und als T<sub>3</sub>-Generation ausgesät. Alle beobachteten phänotypischen Veränderungen beschränkten sich ausschließlich auf die Blüten der Pflanzen. Auch heterozygot transgene Pflanzen zeigten deutliche Phänotypen. Analysen mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskopes, wie in Abb. 15 und 16 dargestellt, wurden nur exemplarisch an einigen Pflanzen der T<sub>3</sub>-Generation der Linien 2CV, 4DIII, 5AII und 7BIV durchgeführt. Die folgenden Darstellungen und Abbildungen der phänotypischen Untersuchungen in 3.5.1 sowie der Gen-Expressionsanalyse in 3.5.2 beziehen sich auf Pflanzen der transgenen 35S::*GGM2*-Linie 5AII der T<sub>3</sub>-Generation.

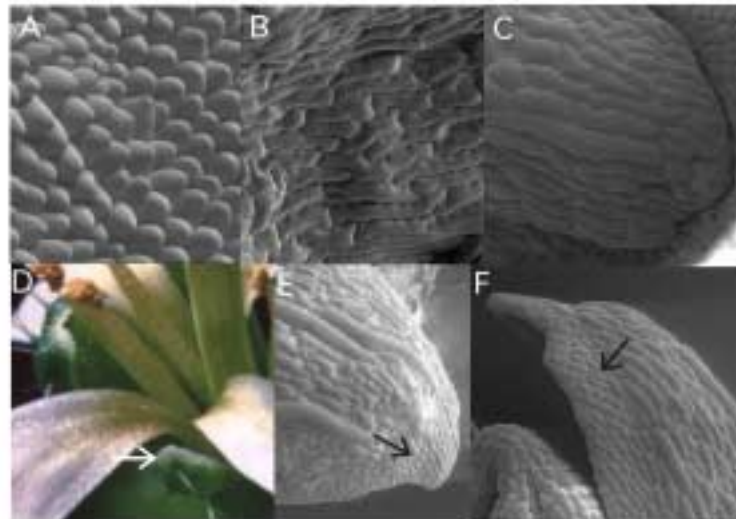
### 3.5.1 Phänotypische Analyse

Abb. 14 zeigt den auffälligen mutanten Phänotyp transgener 35S::*GGM2*-*Arabidopsis*-Pflanzen im direkten Vergleich mit wildtypischen Pflanzen und dem von Krizek und Meyerowitz (1996) publizierten Phänotyp von *Arabidopsis*-Pflanzen, die das endogene B-Funktionsgen *PI* überexprimieren. Deutlich erkennt man die im Vergleich zur Wildtyp-Blüte (Abb. 14A) weit abgespreizten Sepalen der für *GGM2* transgenen Blüten (Abb. 14B). Dieses Phänomen konnte in allen 17 T<sub>2</sub>-Linien (siehe Abb. 18) und in allen daraus hervorgegangenen Pflanzen der T<sub>3</sub>-Generation beobachtet werden. Keine dieser transgenen Pflanzenlinien zeigte vollständige Transformationen der Sepalen im ersten Wirtel zu Petalen. Das oben beschriebene Merkmal der *GGM2* überexprimierenden Pflanzen (Abb. 14 B) sieht dem von Krizek und Meyerowitz (1996) beschriebenen Charakteristikum für 35S::*PI* transgene Pflanzen sehr ähnlich (vergleiche Abb. 14B mit C). Auch in diesem Fall (Abb. 14C) sind die Sepalen nicht vollständig zu Petalen transformiert, zeigen aber eine ungewöhnlich stark abgespreizte Stellung.



Krizek und Meyerowitz (1996) beschreiben neben der geöffneten Blattstellung der Sepalen in *PI* überexprimierenden Pflanzen zusätzlich eine Veränderung der

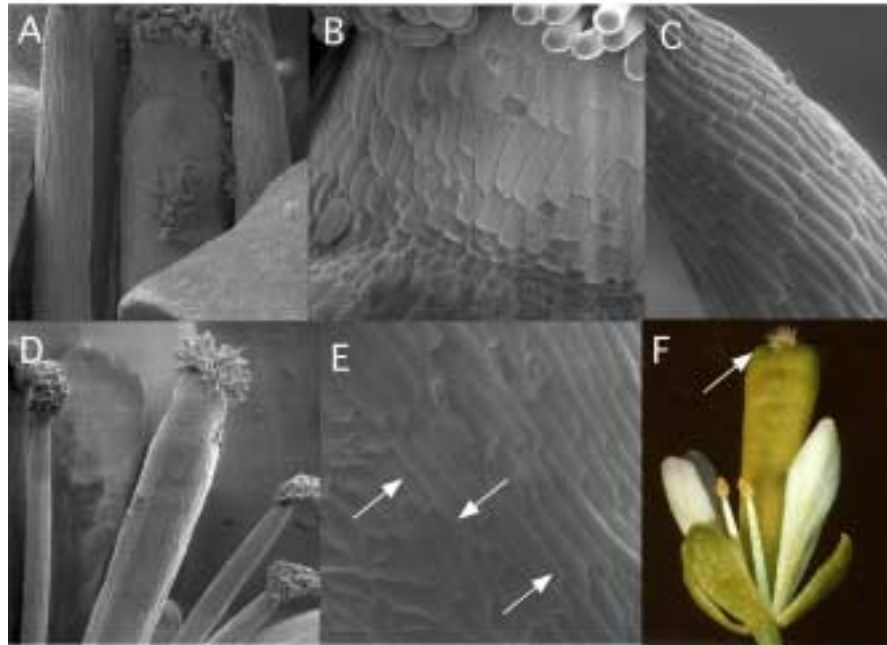
Oberflächenzellstruktur. So bestehen die abgespreizten Sepalen aus einer Mischung von für Sepalen typischen länglichen und gezackten Zellen (siehe auch Abb. 15B und C) und den kleineren, kissenförmigen Zellen, die für Petalen typisch sind (siehe auch Abb. 15A). Vor allem an der Basis und an den Rändern der veränderten Sepalen konnte dieser Phänotyp beobachtet werden (Krizek und Meyerowitz, 1996). Diese Modifikationen konnten ebenfalls an einer von Dr. T. Münster, MPIZ-Köln zur Verfügung gestellten 35S::*PI* T<sub>2</sub>-Linie beobachtet werden (ohne Abb.). Untersuchungen der Sepalen von Pflanzen die *GGM2* ektopisch exprimieren, zeigen schon mit bloßem Auge einen hellen Saum entlang der Sepalenränder (Abb. 15D). Unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskopes lassen sich dann die oben beschriebenen Veränderungen der Zellformen an den Rändern der Organoberflächen erkennen. Entlang dieser Ränder findet man verhältnismäßig kleine geordnete Zellen (Abb. 15E und F). Diese Zellformen zeigen mehr Ähnlichkeit zu denen von Petalen als zu denen von wildtypischen Sepalen (vergl. Abb. 15E/F mit Abb. 15C).



**Abb. 15. Vergleich der Zellstrukturen von Sepalen *GGM2* transgener Pflanzen mit Zellstrukturen wildtypischer Pflanzen.** Abb. 15A-C zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Zelloberflächen wildtypischer *Arabidopsis* Blütenorgane. Abb.15A zeigt die Oberfläche einer Petale, Abb.15B zeigt die Oberfläche einer Sepale und Abb. 15C zeigt den äußeren Rand einer wildtypischen Sepale. Abb. 15D zeigt einen Ausschnitt einer Blüte einer transgenen, *GGM2* überexprimierenden Pflanze. Ein Pfeil weist auf den ungewöhnlich hellen äußeren Rand einer Sepale hin. Abb.15E und F zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von äußeren Rändern von Sepalen von transgenen *GGM2* überexprimierenden Pflanzen. Pfeile verweisen auf ungewöhnlich kleine (petaloide) Zellen.

Die Merkmale im ersten Wirtel von transgenen *GGM2* ektopisch exprimierenden *Arabidopsis* Pflanzen gleichen demnach auch auf Ebene der Zellstrukturen den Charakteristika, die von Krizek und Meyerowitz (1996) an Pflanzen, die *PI* allein überexprimieren, beobachtet wurden. Pflanzen, die ektopisch das andere B-Funktionsgen *AP3* bilden, zeichnen sich durch Modifikationen im vierten Wirtel aus (siehe auch Abb. 13). Besonders dramatische Phänotypen solcher Pflanzen zeigen Stamina statt Karpellen im vierten Wirtel, lassen aber den ersten Wirtel unverändert (Jack *et al.*, 1994). Als Kontrollexperiment wurden auch in dieser Arbeit transgene *Arabidopsis*-Linien, die *AP3* ektopisch exprimieren, generiert (siehe 2.5.4). Die Mehrzahl solcher Pflanzen zeigt jedoch, wie auch bei Jack *et al.* (1994) beschrieben, weniger drastische Veränderungen. So kann in solchen Pflanzen zum Beispiel das Karpellgewebe im vierten Wirtel kein funktionierendes Gynoeceum bilden, was in weiblich sterilen Blüten resultiert. Außerdem wurden Gewebemischungen aus karpelloiden und staminoiden Geweben beobachtet (ohne Abb.). Abb. 16 zeigt Details des vierten Wirtels von Pflanzen, die *GGM2* ektopisch exprimieren. Eine Veränderung, die in allen für *35S::GGM2* transgenen Pflanzen aller Linien der T<sub>3</sub>-Generation zu beobachten ist, wird in Abb. 16D dargestellt. Das Gynoeceum solcher Blüten zeigt nicht die deutliche Ausprägung der Fruchtklappen in den einzelnen Karpellen, sondern ist dünner und tubusartiger (vergleiche Abb. 16D mit A). Eine Detailaufnahme (Abb. 16E) eines solchen Gynoeceums zeigt eine Mischung aus Zellstrukturen mit kurzen und ineinander verzahnten Zelltypen, wie auch bei wildtypischem Karpellgewebe zu beobachten (vergleiche mit Abb. 16B), andererseits aber auch mit sehr länglichen schmalen Zellen (die Grenze der verschiedenen Zelltypen ist in Abb. 16E durch Pfeile gekennzeichnet), die starke Ähnlichkeit zu den Zellen der Filamente von wildtypischen Stamina aufweisen (vergleiche mit Abb. 16C). Bei Pflanzen einiger Linien (besonders in 2CV, 4DIII und 5AII) konnten auch weitere Veränderungen des Gynoeceums verzeichnet werden, wie in Abb. 16F dargestellt. Die Form des Gynoeceums ist verändert, oft in Zusammenhang mit einer deutlichen Reduktion des stigmatischen Gewebes. Je nach Stärke der Ausprägung dieses Phänotypes sind solche Blüten reduziert weiblich fertil bis vollständig unfertil. Auch zeigten die Oberflächen solcher Organe eine Mischung aus karpelloiden und staminoiden Zellen. Eine vollständige Transformation von Karpellen in Stamen, wie in Jack *et al.* (1994) für *AP3* überexprimierende Pflanzen beschrieben, konnte in keiner der *35S::GGM2* Linien gefunden werden. Die beobachteten Veränderungen im vierten Wirtel ähneln dennoch stark den von Jack und Mitarbeitern (1994) und in eigenen

Kontrollexperimenten beobachteten schwächeren Phänotypen der 35S::AP3 Pflanzen (ohne Abb.).

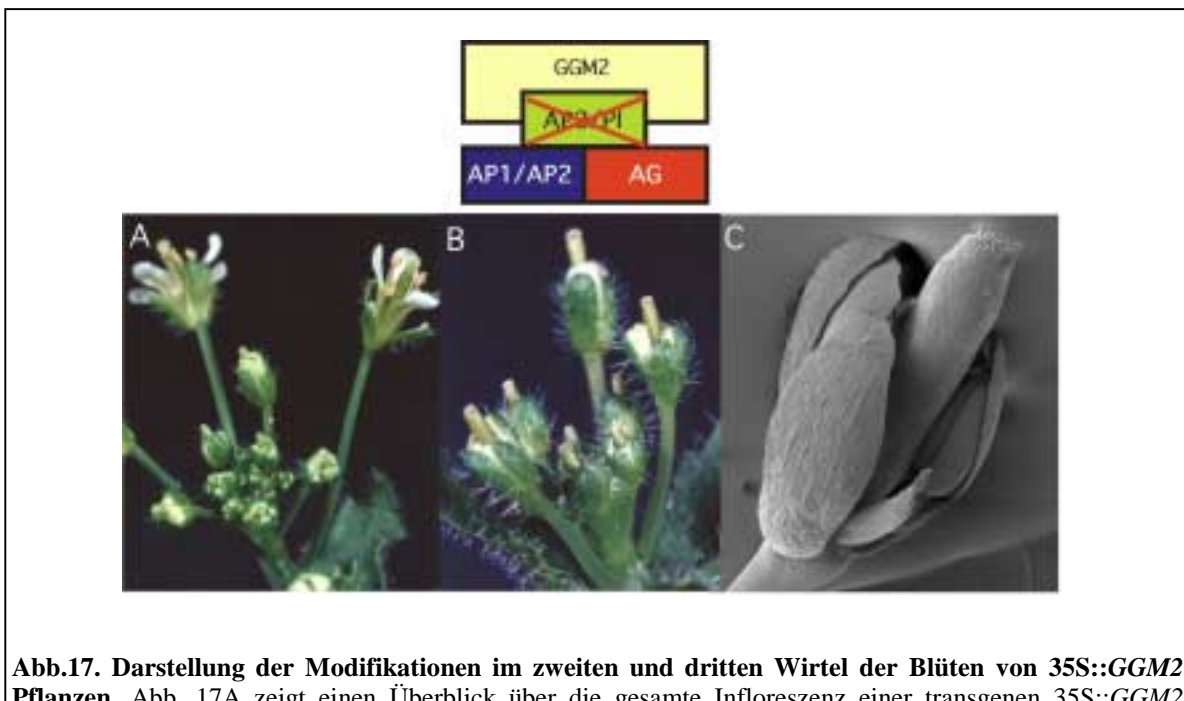


**Abb. 16. Vergleich des vierten Wirtels von Pflanzen, die ektopisch *GGM2* exprimieren mit dem wildtypischer Pflanzen.** Abb. 16A-C zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Ausschnitten wildtypischer *Arabidopsis* Blüten. Abb. 16A zeigt den dritten und vierten Wirtel im Überblick, Abb. 16B zeigt ein Detail des Gynoeceums im vierten Wirtel und Abb. 16C zeigt die Zelloberfläche des Filaments eines Stamens im dritten Wirtel. Abb. 16D-F zeigen Blütendetails von Pflanzen, die ektopisch *GGM2* exprimieren. Abb. 16D zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des vierten Wirtels im Überblick, während Abb. 16E ein Detailansicht von Abb. 16D darstellt. Pfeile weisen auf die Grenze zwischen karpeloiden (links unten) und staminoiden (rechts oben) Zellstrukturen hin. Abb. 16F zeigt eine Photographie einer Blüte einer transgenen, *GGM2* überexprimierenden Pflanze mit verändertem Gynoeceum.

Außer den oben beschriebenen phänotypischen Veränderungen, die zumindest teilweise den Erwartungen einer ektopischen Expression eines putativen B-Funktionsgens im ersten und vierten Wirtel einer *Arabidopsis* Blüte entsprechen, konnten auch im zweiten und dritten Wirtel Modifikationen beobachtet werden, die allerdings eher einer Störung der B-Funktion ähneln (Abb.17). So wurde vor allem bei den sich später entwickelnden Blüten einer Infloreszenz eine zunehmende Tendenz zur Reduktion der Petalen beobachtet. Solche Organe des zweiten Wirtels gleichen bei den sich am spätesten entwickelnden Blüten der Infloreszenz oft in Farbe und Größe den Sepalen. Allerdings konnte mittels des Rasterelektronenmikroskopes keine vollständige Transformation der Zelloberflächen solcher Organe in sepaloide Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 17C). Zudem zeigen die Stamen solcher Blüten eine veränderte Entwicklung. Obwohl sie angelegt werden,



wachsen sie nicht wie in wildtypischen Blüten aus, erreichen mit den Antheren somit nicht das stigmatische Gewebe des Gynoeceums, so daß es nicht zur Befruchtung kommt. In den sich später entwickelnden Blüten von Infloreszenzen der 35S::*GGM2* Pflanzen erkennt man eine deutliche Störung der Organidentität im zweiten und dritten Wirtel. Diese Organidentität wird in wildtypischen Pflanzen durch die B-Funktion garantiert (siehe Einleitung). Eine solche Beeinträchtigung der Entwicklung könnte demnach auf eine Störung der endogenen B-Funktion durch das GGM2-Protein zurückzuführen sein (siehe dazu 4.3). Zusätzlich zeigen solche Blüten ebenso die oben beschriebenen Modifikationen im ersten und vierten Wirtel (Abb.17). Diese hier beschriebenen Merkmale konnten in Pflanzen aller Linien beobachtet werden.



**Abb.17. Darstellung der Modifikationen im zweiten und dritten Wirtel der Blüten von 35S::*GGM2* Pflanzen.** Abb. 17A zeigt einen Überblick über die gesamte Infloreszenz einer transgenen 35S::*GGM2* Pflanze. Die früheren äußeren Blüten zeigen im ersten und vierten Wirtel die beschriebenen Überexpressionsphänotypen und keine sichtbare Veränderung im zweiten und dritten Wirtel. Während die späteren Blüten eine deutliche Reduktion der Petalen im zweiten Wirtel zeigen. Abb. 17B zeigt einen Ausschnitt der sich später entwickelnden Blüten einer Infloreszenz. Abb. 17C zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer wie für Abb. 17B beschriebenen Blüte. Das über den Abbildungen dargestellte Pictogramm zeigt das veränderte ABC-Modell bei einer solchen Störung der endogenen B-Funktion in transgenen 35S::*GGM2* Pflanzen.

### 3.5.2 Molekulare Analyse

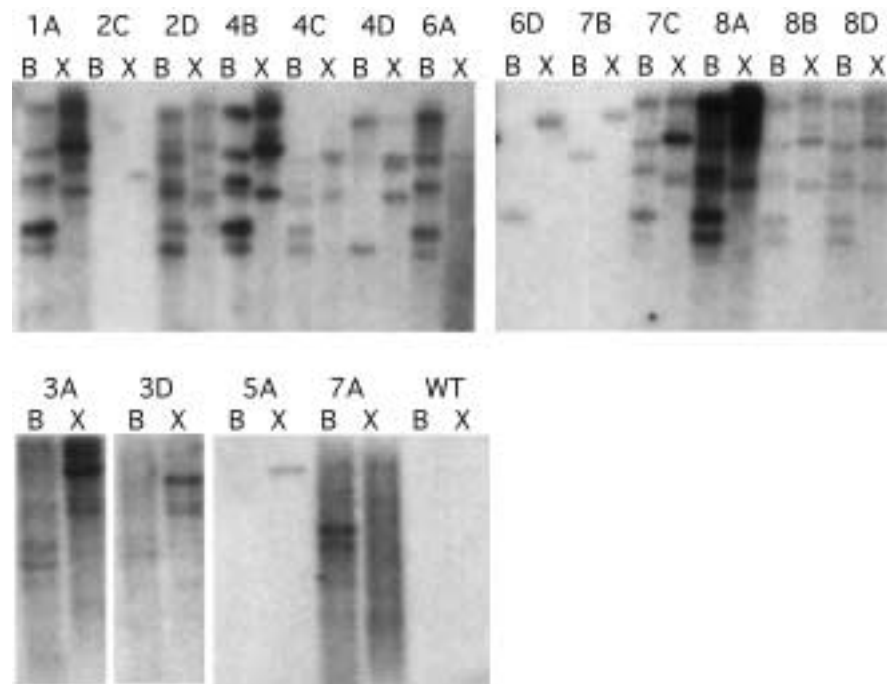
Zur Bestimmung der Anzahl der transformierten Konstrukte pro transgener Pflanzenlinie wurden DNA-Filter-Analysen mit genomischer DNA von 17 Linien der T<sub>2</sub>-Generation durchgeführt. Dafür wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I

verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Schließlich wurden die Filter mit einer DNA-Sonde, die spezifisch für *GGM2* war, hybridisiert.

Diese Untersuchung zeigte, daß die Anzahl der Kopien pro Transformationsereignis stark variiert (Abb. 18). Neben Linien mit nur einem Hybridisierungssignal (Linien 2C, 5A, 6D und 7B, Abb. 18) finden sich ebenfalls Linien mit fünf oder sogar mehr Banden (Linien 1A, 2D, 4B, 6A und 8A-D, Abb. 18), die auf jeweils mehrfache Loci des Transgens innerhalb einer Linie hinweisen. Die Intensität der zu beobachtenden phänotypischen Veränderungen korreliert dabei nicht positiv mit der zunehmenden Anzahl der Transgenkopien innerhalb des Genoms der transformierten *Arabidopsis* Pflanzen. Von den 17 T<sub>2</sub>-Pflanzenlinien zeigen eher die Linien mit nur einer bis zwei Banden (Linien 2C, 4D, 5A und 7B) Vertreter mit besonders auffälligen Phänotypen wie in 3.5.1 beschrieben. Alle 17 Pflanzenlinien wiesen Vertreter auf mit abgespreizten Sepalen (Abb. 14) und reduzierten Fruchtklappen des Gynoeceums (Abb. 16D). Ebenfalls zeigten Pflanzen aller 17 Linien die beschriebenen Veränderungen im zweiten und dritten Wirtel (Abb. 17) Nur bei Pflanzen der Linien 2C, 4D und 5A konnten ähnlich starke Veränderungen des Gynoeceums, wie in Abb. 16F dargestellt, beobachtet werden.

Kein Hybridisierungssignal konnte mit der für *GGM2* spezifischen DNA-Sonde in genomischer DNA von wildtypischen *Arabidopsis* Pflanzen gefunden werden (Abb. 18), was als Kontrolle dienen kann, daß die in Abb. 18 dargestellten Hybridisierungssignale nicht auf Kreuzreaktionen mit anderen *Arabidopsis*-eigenen MADS-Box-Genen zurückzuführen sind.

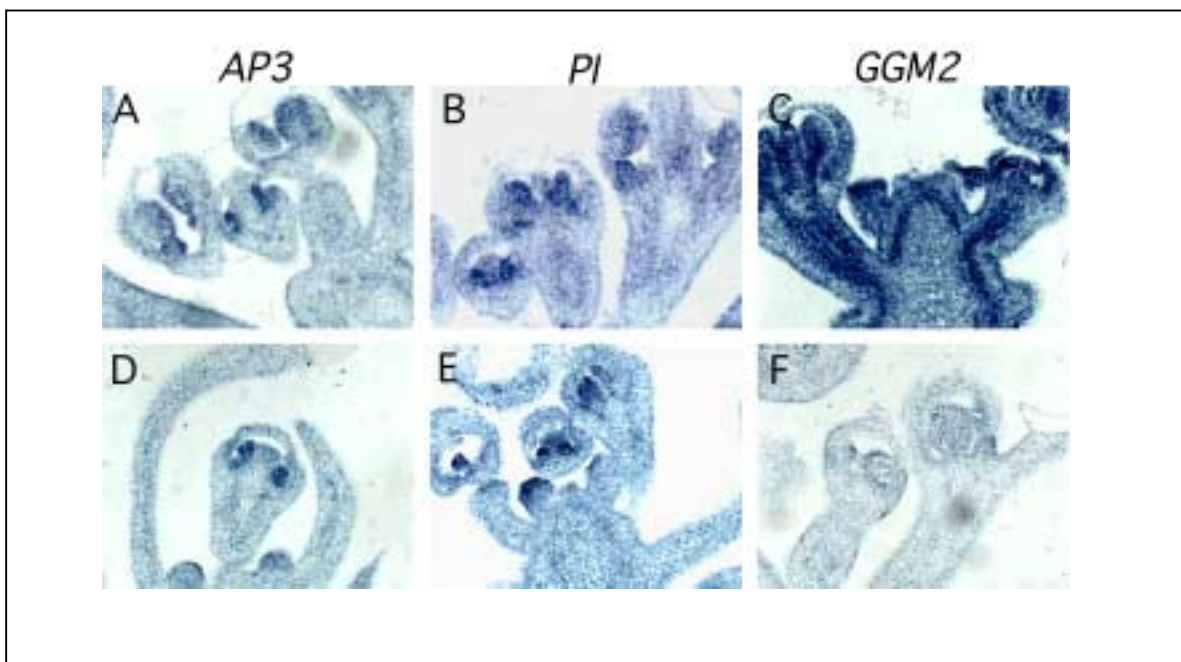
Außerdem konnte anhand solcher Experimente festgestellt werden, ob zusätzlich den T<sub>1</sub>-Linien auch innerhalb der T<sub>2</sub>-Generation weitere unabhängige Linien gefunden werden konnten. Da die T<sub>1</sub>-Linien auf mehrere zufällig zusammengefaßte Pflanzen der T<sub>0</sub>-Generation zurückgehen, können sich in einer solchen Gruppe mehrere unabhängig transformierte Pflanzen befinden, die erst in der T<sub>2</sub>-Generation unterschieden werden können. Aus der Abb. 18 ist zu entnehmen, daß alle T<sub>1</sub>-Linien (hier zu unterscheiden an der ersten Ziffer der Benennung, z.B.: 3A) eindeutig durch unabhängige Transformationsereignisse entstanden sind. Die Bandenmuster (*RFLP: restriction fragment length polymorphism*) aller T<sub>1</sub>-Linien unterscheiden sich deutlich. Zusätzlich findet man unterschiedliche RFLPs innerhalb der T<sub>2</sub>-Linien 2C/2D, 6A/6D und 7B/7C. Hier beinhaltete die jeweilige T<sub>1</sub>-Linie noch Pflanzen, die auf verschiedene Transformationsereignisse zurückgingen



**Abb. 18. Genomische Southernfilter-Analyse verschiedener T<sub>2</sub>-Linien transgener *Arabidopsis* Pflanzen.** Autoradiographien mehrerer Southernfilter-Analysen nach Hybridisierung mit einer für *GGM2* spezifischen DNA-Sonde. Die Angaben bezeichnen die verschiedenen Pflanzenlinien der T<sub>2</sub>-Generation und die jeweiligen Restriktionsenzyme, mit denen die genomische DNA vor der Auftrennung verdaut wurde. Abkürzungen: B: *Bam*HI; WT: Wildtyp; X: *Xho*I.

Weitere molekulare Analysen sollten die Expression des Transgens zeigen und zusätzlich die Expression der endogenen B-Funktionsgene kontrollieren. Da es durchaus denkbar wäre, daß die Expression des Transgens auch das Transkriptionsmuster der endogenen Gene *PI* und *AP3* verändert (siehe dazu auch 1.6 und 4.3), konnten hier nur räumlich und zeitlich hoch auflösende Expressionsstudien wie *in-situ*-Hybridisierung befriedigende Ergebnisse liefern. Das hierfür verwendete Blütenmaterial entstammte der T<sub>3</sub>-Linie 5AII (alle Pflanzen der 5A-Linien besitzen das Transgen nur in einer einfachen Kopie, siehe Abb. 18). Abb. 19C zeigt ein solches *in-situ*-Hybridisierungsexperiment mit einer RNA-Sonde, die spezifisch für das Transgen *GGM2* war. Das blaue Signal ist in allen Geweben deutlich zu erkennen. Das durch den CaMV 35S-Promotor gesteuerte *GGM2* wird in vegetativen sowie in allen generativen Geweben und somit auch in allen vier Wirteln der Blüten transkribiert. Zum Vergleich zeigt Abb. 19F eine Hybridisierung von Schnitten von wildtypischen Pflanzen mit derselben, für *GGM2* spezifischen Sonde, die hier kein Signal erkennen läßt. Die unbeeinflusste Transkription der endogenen B-Funktionsgene wird durch Abb. 19A, B, D und E belegt. Hybridisierungen von Schnitten transgener

35S::*GGM2* Pflanzen mit *AP3*- und *PI*-spezifischen Sonden werden in Abb. 19A bzw. 19B gezeigt. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Experimente mit denen in Abb. 19D und E, die solche Hybridisierungsexperimente mit gleichen Sonden aber mit Schnitten nicht transgener, wildtypischer Pflanzen zeigen, so zeigen sich gleichartige Expressionsmuster dieser Gene in transgenen und wildtypischen Pflanzen. Transkripte von *AP3* sind in Abb. 19A genau wie in Abb. 19D nur im zweiten und dritten Wirtel der Blüten nachzuweisen (siehe auch: Jack *et al.*, 1992). *PI*-Expression findet sich in jungen Stadien hingegen außer im zweiten und dritten auch im vierten Wirtel. In späteren Entwicklungsstadien allerdings beschränkt sich die Transkription dieses Gens ebenfalls auf den zweiten und dritten Wirtel einer *Arabidopsis* Blüte (Goto und Meyerowitz, 1994). Auch hier finden wir die gleichen Expressionsmuster in transgenen (Abb. 19B) und wildtypischen Geweben (Abb. 19E). Die ektopische Expression des putativen B-Funktionsgens *GGM2* aus *Gnetum gnemon* scheint die Transkription der endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* in *Arabidopsis thaliana* nicht nachweisbar zu verändern.

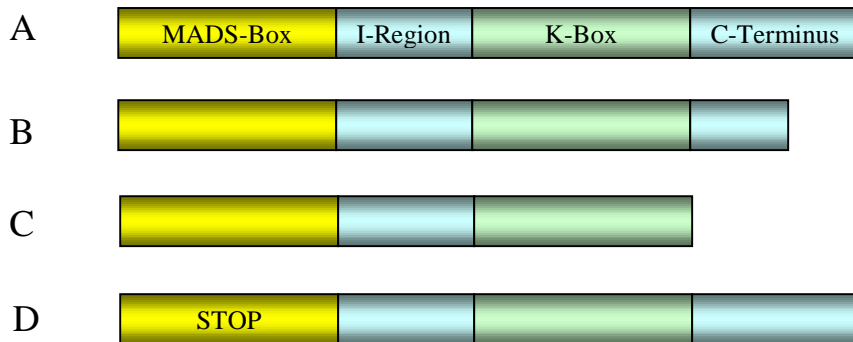


**Abb. 19. *In-situ*-Hybridisierungsexperimente transgener und wildtypischer *Arabidopsis*-Blüten mit Sonden spezifisch für die endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* und für das Transgen *GGM2*.** Abb. 19A-C zeigen *in-situ*-Hybridisierungen von Schnitten durch junge Blüten der transgenen T<sub>3</sub>-Linie 5AII. Abb. 19D-F zeigen *in-situ*-Hybridisierungen von Schnitten durch junge Blüten wildtypischer *Arabidopsis*-Pflanzen. Abb. 19A und D zeigen Hybridisierungen mit RNA-Sonden spezifisch für *AP3*, Abb. 19B und E zeigen Hybridisierungen mit RNA-Sonden spezifisch für *PI* und Abb. 19C und F zeigen Hybridisierungen mit RNA-Sonden spezifisch für das Transgen *GGM2*.

### 3.6 Überexpression von *GGM2*-Derivaten zur weiteren Analyse der *GGM2*-Funktion im heterologen System

Phänotypische Veränderungen durch die ektopische Expression eines *DEF/GLO*-ähnlichen Gens werden vor allem im ersten und vierten Wirtel erwartet. Hier wirkt in einer wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanze die endogene B-Funktion nicht, und so können kombinatorische Effekte der A- bzw. C-Funktion mit der Funktion des Transgens erwartet werden (siehe auch 3.5.1). Im zweiten und dritten Blütenkreis sollte jedoch die endogene B-Funktion bereits vorhanden sein, und da additive Effekte von homöotischen Funktionen in diesem Sinne nicht bekannt sind, sollten die Organe in diesen Wirteln unverändert sein. Exprimiert man zum Beispiel in *Arabidopsis* die endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* allein oder in Kombination ektopisch unter der Kontrolle des CaMV-Promotors, so beobachtet man keine morphologischen Veränderungen der Organe im zweiten und dritten Wirtel (Jack *et al.*, 1994; Krizek und Meyerowitz, 1996).

Die Überexpression des *DEF/GLO*-ähnlichen Gens *GGM2* zeigt jedoch neben den Modifikationen in den äußeren Wirteln auch Veränderungen der Organe im zweiten und dritten Wirtel (siehe 3.5.1 und Abb. 17). Diese allerdings zeigen Charakteristika einer Störung statt einer Überexpression der B-Funktion. Ein als Ko-Suppression bekannter Effekt beruht allgemein auf sehr hohen Ähnlichkeiten zwischen Transgenen und endogenen Genen. Solche Modelle wurden für transgene Pflanzen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene formuliert (Matzke und Matzke, 1995). Alternativ dazu könnte *GGM2* Protein mit dem *AP3/PI*-Heterodimer um spezifische Bindestellen konkurrieren. Dieses Phänomen sollte mit *35S::GGM2* Konstrukten analysiert werden, deren C-Terminus verkürzt ist oder komplett fehlt (Abb. 20B und C, siehe auch 2.9.4). Für solche *GGM2*-Derivate konnte *in-vitro* eine wenn auch verminderte Bindefähigkeit an *CArG-Box*-Sequenzen gezeigt werden (Weiser, 1999). Alle bisher analysierten Pflanzen der T<sub>1</sub>-Generation, die transgen für solche Konstrukte waren, zeigten keinerlei phänotypische Abweichungen von wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen (ohne Abb.). Auch Pflanzen, die transgen für ein *35S::GGM2* Konstrukt sind, welches ein Translationsstopkodon in der *MADS-Box* aufweist (Abb. 20D, siehe auch 2.9.4) und demnach kein funktionsfähiges Protein wohl aber ein vollständiges Transkript produzieren kann, zeigen keine morphologischen Veränderungen zum Wildtyp (ohne Abb.). Die in 3.5.1 beschriebenen Veränderungen benötigen demnach vollständiges *GGM2*-Protein.



**Abb. 20. Schematische Darstellung der verwendeten *GGM2*-cDNA-Derivate.** Abb. 20A stellt eine vollständige *GGM2*-cDNA dar, während Abb. 20B und C verkürzte Derivate wie in 3.6 beschrieben symbolisieren. Abb. 20D stellt ein *GGM2*-cDNA-Derivat dar, dessen MADS-Box ein Translationsstopkodon aufweist (siehe dazu auch 2.9.4).

### 3.7 Überexpression von *GGM2* in der *Arabidopsis thaliana* Mutante *pi-1*

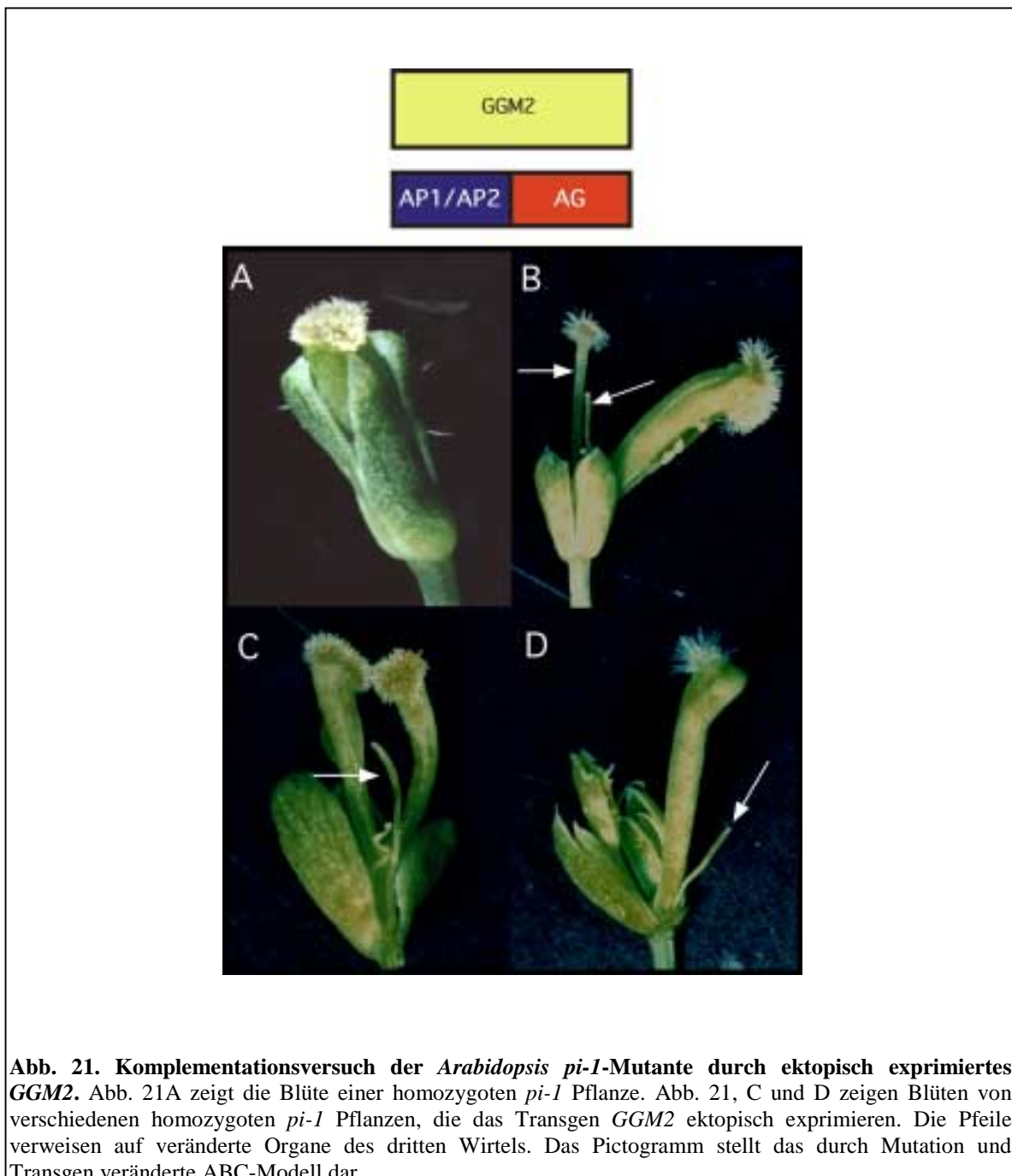
Das stärkste Allel der bisher bekannten Mutanten des *PISTILLATA*-Gens von *Arabidopsis thaliana* ist *pi-1* (Bowman *et al.*, 1989; Bowman *et al.*, 1991; Goto und Meyerowitz, 1994). Dem klassischen ABC-Modell (Bowman *et al.*, 1991; Coen und Meyerowitz, 1991) zur Folge sollten sich in solchen Pflanzen, ähnlich wie bei *AP3* Mutanten, im zweiten Wirtel Sepalen anstelle der Petalen und im dritten Wirtel Karpelle statt der Stamina bilden. Tatsächlich zeigen *pi-1*-Pflanzen sepaloide Organe im zweiten Wirtel, im dritten Wirtel jedoch bilden sich gewöhnlich gar keine Organe. Dafür ist der vierte Wirtel im Durchmesser stark vergrößert und besteht oft aus mehr als zwei Karpellen. Eine solche Blüte besteht also eher aus drei statt aus vier Wirteln (Bowman *et al.*, 1989; Abb. 21A). Erst die schwächeren Allele *pi-2* und *pi-3* zeigen die gewohnten vier Wirtel. Neben den Sepalen im zweiten Wirtel findet man im dritten Blütenkreis solcher Pflanzen karpelloide Organe oder filamentöse Strukturen, die den Filamenten der Stamina ohne Antheren ähnlich sind. Teilweise fehlen aber auch in solchen Blüten die Organe des dritten Wirtels (Bowman *et al.*, 1991). Zum Komplementationsversuch durch *GGM2* wurde in dieser Arbeit das *pi-1*-Allel verwendet, da es sich hierbei um eine vollständige Funktionsverlustmutante handelt. Anstelle des Tryptophans an Position 80 innerhalb der I-Region weist das *pi-1*-Allel ein Translationsstopkodon auf. Die beiden schwächeren Allele zeichnen sich lediglich durch nicht konservierte Aminosäureaustausche in der MADS-Domäne bzw. der I-Region aus (Goto und Meyerowitz, 1994). Für das in diesem Abschnitt

beschriebene Experiment wurden homozygote *pi-1*-Pflanzen mit Pflanzen der in 3.5 beschriebenen 35S::*GGM2*-Linie 5AII (T3-Generation) gekreuzt. Pflanzen der folgenden Generation, die sowohl für die Mutation als auch für das Transgen heterozygot waren, wurden geselbstet und deren Nachfolger durch BASTA-Selektion auf das Transgen und mittels PCR-Analyse und Sequenzierung (siehe auch 3.7.2) auf die homozygote Mutation getestet.

### 3.7.1 Phänotypische Analyse

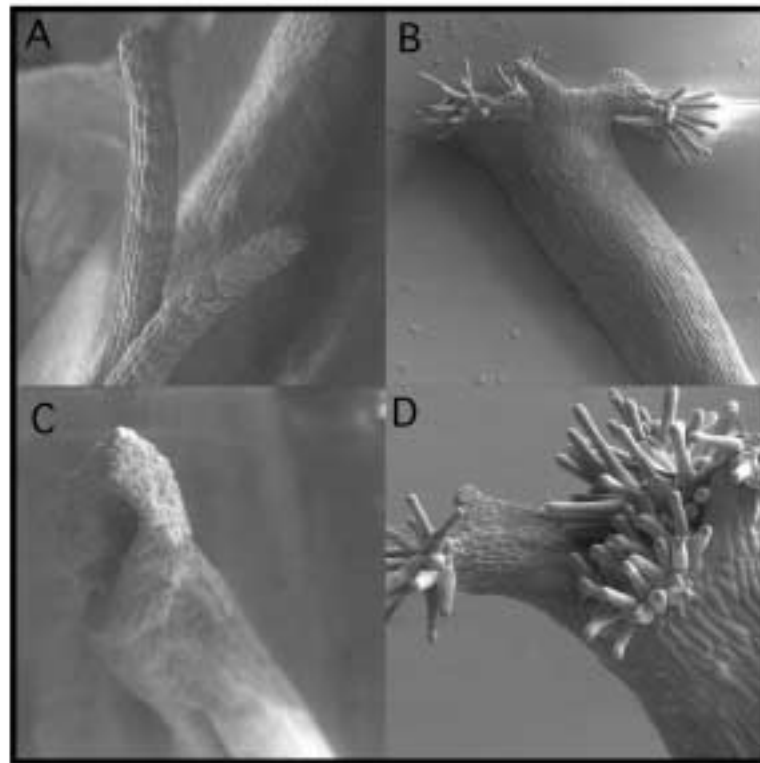
Die ektopische Expression des *DEF/GLO*-ähnlichen Gymnospermengens *GGM2* in *pi-1*-mutanten *Arabidopsis*-Pflanzen zeigt drastische phänotypische Veränderungen im Vergleich zu nicht transgenen *pi-1*-Pflanzen (vergleiche Abb. 21B, C und D mit Abb. 21A). Im ersten Wirtel zeigen die Sepalen die schon in 3.5 beschriebenen Charakteristika, wie die abnorme, geöffnete Stellung. Die sepaloiden Organe im zweiten Wirtel sind morphologisch nicht von den Organen der nicht-transgenen *pi-1*-Pflanzen zu unterscheiden. Sie bestehen aus Mischungen sepaloider und petaloider Zellen, sind verglichen mit den Sepalen des ersten Wirtels relativ klein und sind grün gefärbt. Damit gleichen sie auch den Organen des zweiten Wirtels von *ap3*-mutanten Blüten. Die inneren beiden Blütenkreise der *GGM2* überexprimierenden *pi-1*-Pflanzen zeigen die deutlichsten Veränderungen. Besonders ist zu bemerken, daß in solchen Pflanzen der dritte Wirtel, im Gegensatz zu den Blüten nicht veränderter *pi-1*-Pflanzen, vorhanden ist. Hier finden sich offene nicht fusionierte karpelloide Organe oder sehr viel häufiger filamentöse Strukturen (Abb. 21B, C, D und Abb. 22), die teils an ihren Spitzen stigmatisches Gewebe zeigen (Abb. 21B, 22B und D) aber häufig gar nicht gekrönt sind (Abb. 21C, D und 22A). Nur die Blüten weniger transgener *pi-1*-Pflanzen zeigen an solche Filamentspitzen Gewebe, daß dem von Antheren ähnlich sieht (Abb. 22C). Es konnten jedoch keine vollständigen wildtypischen Stamina beobachtet werden. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Organe der dritten Wirtels zeigen Zelloberflächen, die partiell denen von Stamenfilamenten und teilweise denen von Karpellen ähnlich sind (Abb. 22A, B und D). Zusammenfassend scheint vor allem der dritte Wirtel *GGM2* überexprimierender *pi-1*-Pflanzen eher dem dritten Wirtel in den schwächeren *PI*-Allelen *pi-2* und *pi-3* (Bowman *et al.*, 1991) ähnlich zu sehen. Die Basis des Gynoeceums im vierten Blütenkreis ist in den *GGM2* überexprimierenden Pflanzen im Vergleich zu nicht transformierten *pi-1*-Pflanzen von normalem Durchmesser. Das Gynoeceum selbst zeigt sich stark deformiert,

ohne erkennbare Fruchtklappen. Ferner ist das stigmatische Gewebe oft reduziert und teilweise deplaziert (Abb. 21D). Auch die Oberfläche des Gynoeceums besteht aus Mischungen von Zelltypen, die entweder eher staminoiden oder eher karpelloiden Charakter haben. Zusammenfassend finden sich im vierten Wirtel ähnliche Merkmale, die schon in den *GGM2* überexprimierenden Linien mit wildtypischen (siehe 3.5) sowie mit für *ap3-1*-mutanten Hintergrund (siehe 3.8) beobachtet werden konnten.



**Abb. 21. Komplementationsversuch der *Arabidopsis pi-1*-Mutante durch ektopisch exprimiertes *GGM2*.** Abb. 21A zeigt die Blüte einer homozygoten *pi-1* Pflanze. Abb. 21, C und D zeigen Blüten von verschiedenen homozygoten *pi-1* Pflanzen, die das Transgen *GGM2* ektopisch exprimieren. Die Pfeile verweisen auf veränderte Organe des dritten Wirtels. Das Pictogramm stellt das durch Mutation und Transgen veränderte ABC-Modell dar.



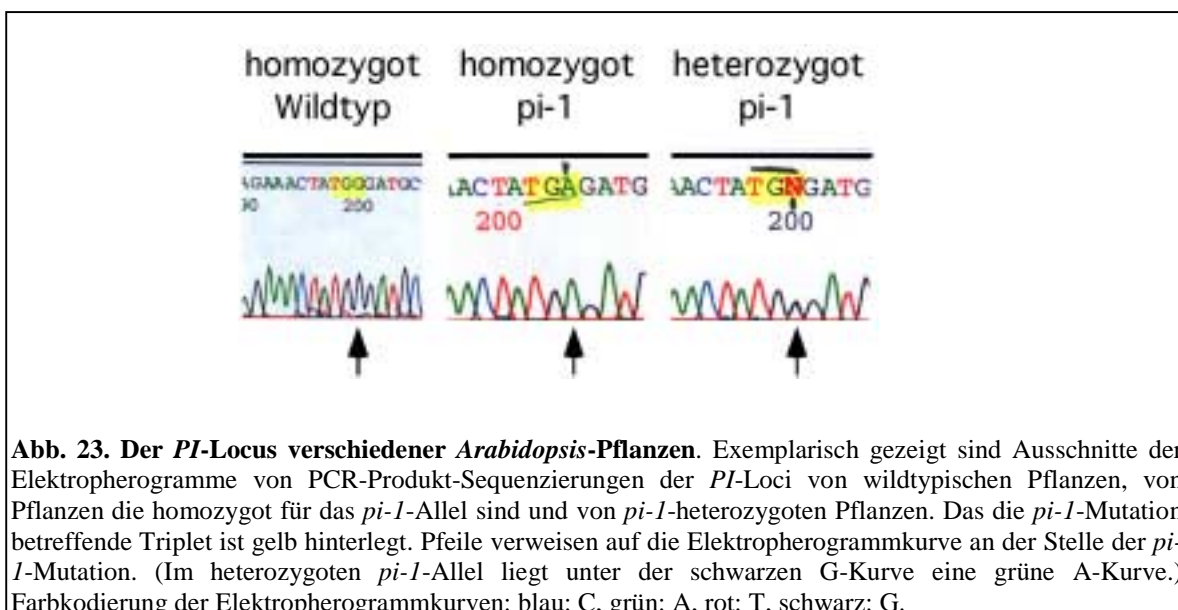


**Abb. 22. Verschiedene Organe des dritten Wirtels in 35S::GGM2; *pi-1*-Pflanzen.** Abb. 22A stellt ungekrönte filamentöse Strukturen des dritten Wirtels von 35S::GGM2; *pi-1*-Pflanzen dar. Abb. 22B zeigt ein Organ, das sowohl staminoide als auch karpelloide Charakteristika aufweist. Abb. 22C zeigt die Spitze eines filamentösen Organs, dessen Gewebe dem von Antheren ähnlich ist. Abb.22D zeigt stigmatisches Gewebe an der Spitze eines Organs ähnlich dem in Abb. 22B.

### 3.7.2 Molekulare Analyse

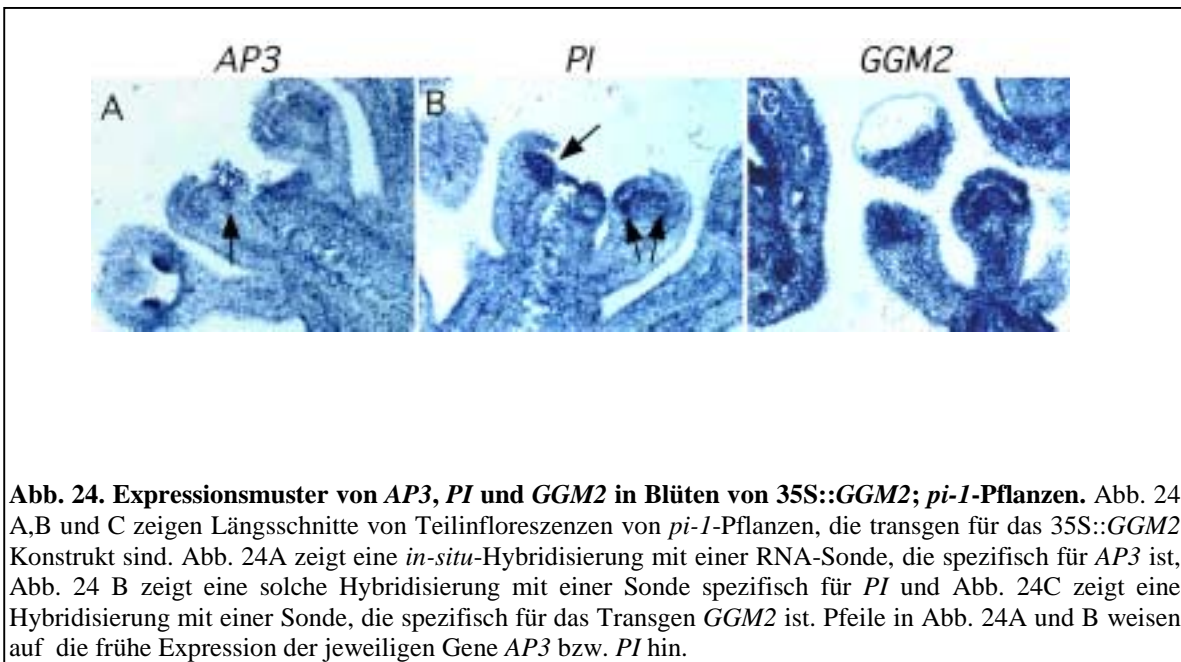
Nach der Kreuzung homozygoter *pi-1*-Pflanzen mit Pflanzen der homozygoten T<sub>3</sub>-35S::GGM2-Linie 5AII und der Selbstung derer Nachkommen segregieren sowohl das Transgen als auch die Mutation bei ungekoppelten Loci jeweils in der Verteilung 1:3. Ein Viertel dieser Pflanzen ist nicht transgen und somit nicht resistent gegen das Herbizid BASTA. Ein Drittel der BASTA-resistenten Pflanzen ist homozygot für die Mutation und trägt das Transgen zumindest in einer Kopie. Da auch heterozygot transgene Pflanzen deutliche phänotypische Veränderungen zeigen und sich morphologisch nicht von homozygot transgenen Pflanzen unterscheiden lassen, konnten alle transgenen Pflanzen,

die zudem homozygot für *pi-1* waren, weiter analysiert werden. Um sicher homozygot mutante von heterozygot mutanten Pflanzen zu unterscheiden, wurde von allen BASTA-resistenten Pflanzen einzeln DNA isoliert und diese mittels PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte analysiert. Amplifikate von DNA mit wildtypischen *PI*-Locus weisen das Tryptophan kodierende Triplet TGG auf, während DNA homozygot mutanter Pflanzen an dieser Stelle das Stopkodon TGA zeigt (Abb. 23). PCR-Produkte von DNA, die von Pflanzen isoliert wurde, die heterozygot für die *pi-1*-Mutation waren, zeigen an dieser Stelle ein überlappendes Sequenzsignal von G und A (Abb 23).



Die Expression des Transgens, aber auch die der endogenen B-Funktionsgene, wurde auch für dieses Experiment durch *in-situ*-Hybridisierung untersucht. Abb. 24 zeigt Hybridisierungen von homozygot mutanten Pflanzen, die das 35S::*GGM2* Konstrukt tragen. Das Expressionsmuster von *AP3* in der *pi-1*-Mutante gleicht in frühen Entwicklungsstadien der Blüte dem Muster in wildtypischen Pflanzen. Das Transkript läßt sich im zweiten und dritten Wirtel nachweisen. Erst in späteren Stadien nimmt die Intensität des Signal stark ab, und in den Stamina ist schließlich gar kein Transkript mehr nachzuweisen (Jack *et al.*, 1992). In Abb. 24A ist die frühe Expression von *AP3* im zweiten und dritten Wirtel zu erkennen, kein Signal findet sich im ersten oder vierten Wirtel der Blüten. In Blüten reiferer Entwicklungsstadien ist kein Transkript mehr feststellbar (ohne Abb.). Der postulierte Autoregulationsmechanismus zur Erhaltung der Transkription beider B-Funktionsgene (Jack *et al.*, 1994; Tilly *et al.*, 1998; Honma und Goto, 2000) scheint in der *pi-1* Mutante erwartungsgemäß nicht zu funktionieren.

Ähnliches läßt sich auch für die Transkription von *PI* in diesen Blüten feststellen (Abb. 24B). Die Expression des Gens beginnt im zweiten, dritten und vierten Blütenkreis, ist aber in reiferen Blüten nicht mehr nachzuweisen (ohne Abb.). Das durch den CaMV-35S-Promotor regulierte Transgen *GGM2* wird hingegen in allen vier Wirteln der Blüten und ebenso in vegetativen Geweben transkribiert (Abb. 24C). Auch in diesem Experiment scheint das Transkriptionsmuster der endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* nicht durch die ektopische Expression von *GGM2* verändert zu werden.



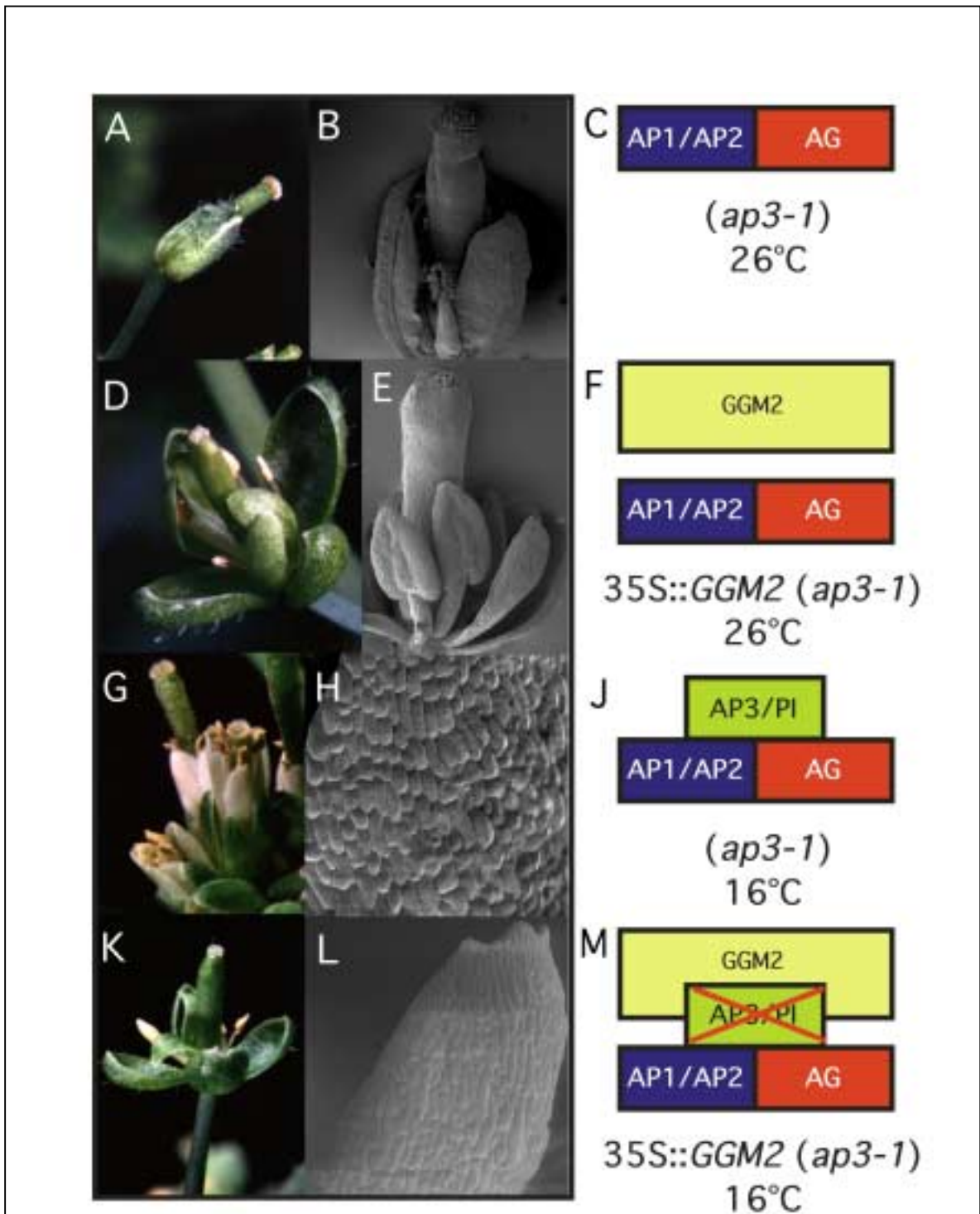
**Abb. 24. Expressionsmuster von *AP3*, *PI* und *GGM2* in Blüten von *35S::GGM2*; *pi-1*-Pflanzen.** Abb. 24 A,B und C zeigen Längsschnitte von Teilinfloreszenzen von *pi-1*-Pflanzen, die transgen für das *35S::GGM2* Konstrukt sind. Abb. 24A zeigt eine *in-situ*-Hybridisierung mit einer RNA-Sonde, die spezifisch für *AP3* ist, Abb. 24 B zeigt eine solche Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für *PI* und Abb. 24C zeigt eine Hybridisierung mit einer Sonde, die spezifisch für das Transgen *GGM2* ist. Pfeile in Abb. 24A und B weisen auf die frühe Expression der jeweiligen Gene *AP3* bzw. *PI* hin.

### 3.8 Überexpression von *GGM2* in der *Arabidopsis thaliana* Mutante *ap3-1*

In dieser Arbeit wurden zwei mutante Allele des *APETALA3*-Gens verwendet, die vollständige Funktionsverlustmutante *ap3-3* und das besonders einfach zu handhabende *ap3-1*-Allel. Die *ap3-1*-Mutanten sind temperatursensitiv (Bowman *et al.*, 1989; Sablowski und Meyerowitz, 1998). Bei hohen Temperaturen zeigen sie einen mutanten Phänotyp (Abb. 25A), während sie bei Temperaturen von 16°C und niedriger fertil und nahezu wildtypisch sind (Abb. 25G). Samen von Pflanzen, die homozygot für dieses Allel sind, wurden über das *Arabidopsis Stock Center* (siehe 2.4) bezogen. Nach Aussaat wurden die daraus gezogenen, homozygoten Pflanzen bei 16°C gehalten und wurden durch Selbstung vermehrt. Zudem lassen sich bei 16°C gezogene Pflanzen, die homozygot für das *ap3-1*-Allel sind, ebenso einfach transformieren wie wildtypische *Arabidopsis*-Pflanzen.

### 3.8.1 Phänotypische Analyse

Pflanzen, die homozygot für das *ap3-1* Allel sind und ektopisch das Transgen *GGM2* exprimieren, zeigen phänotypische Veränderungen, die ähnlich schon in 3.5.1 bei transgenen Pflanzen mit wildtypischen Hintergrund beschrieben werden konnten. Besonders auffällig ist auch in diesen Experimenten die abgespreizte Stellung der Sepalen (Abb. 25D und K). Ebenso gut zu erkennen, sind die Veränderungen im vierten Wirtel (vergleiche Abb. 25B mit Abb. 25E). Abb. 25E zeigt deutlich die veränderte Form des Gynoeceums im Bereich der Fusionen der einzelnen Karpelle und das stark reduzierte stigmatische Gewebe. Ebenso ist bei solchen Pflanzen eine veränderte Zellstruktur der Karpelloberflächen, ähnlich wie in Abb. 16E gezeigt und in 3.5.1 beschrieben, zu erkennen (ohne Abb.). Von besonderem Interesse sind bei diesen Experimenten jedoch die Veränderungen im zweiten und dritten Wirtel im Vergleich zu der nicht-transgenen Mutante. Pflanzen, die bei Temperaturen von 26°C und höher gehalten wurden, sollten, wenn sie nicht transgen für *35S::GGM2* sind, den Phänotyp einer B-Funktionsmutante zeigen. Nach dem klassischen ABC-Modell (Bowman *et al.*, 1991; Coen und Meyerowitz, 1991) sollten sepaloide Organe im zweiten Wirtel und karpelloide Organe im dritten Wirtel zu erkennen sein. Die *ap3-1*-Mutante ist jedoch ein relativ schwaches Allel, so findet man zwar sepaloide Organe im zweiten Wirtel, im dritten Wirtel allerdings bilden sich neben erwarteten karpelloiden Organen ebenfalls Stamina (Abb. 25A und B), die aber nicht fertil sind. Häufig fehlen auch die Organe des dritten Wirtels teilweise oder komplett (Bowman *et al.*, 1991). Pflanzen, die in homozygotem *ap3-1*-Hintergrund bei Temperaturen von 26°C und höher gehalten wurden und *GGM2* ektopisch transkribieren, zeigen ebenfalls Stamina, die nicht fertil sind (Abb. 25D und E), oder fehlende Organe im dritten Wirtel. Karpelloide Organe konnten nur sehr selten oder gar nicht beobachtet werden. Um eindeutige Aussagen machen zu können, ob dieses seltenere Auftreten karpelloider Organe auf die Expression des Transgens *GGM2* zurückzuführen ist oder auf statistischen Schwankungen beruht, wäre eine ausführliche statistische Untersuchung notwendig. Leider konnte aus zeitlichen Gründen eine solche Analyse in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Zusätzliche Hinweise sind durch Komplementationsversuche von echten Null-Mutanten wie dem *ap3-3*-Allel zu erwarten. Die Organe des zweiten Wirtels zeigen keine Veränderungen durch *GGM2* im Vergleich zu nicht-transgenen, *ap3-1*-mutanten Pflanzen.



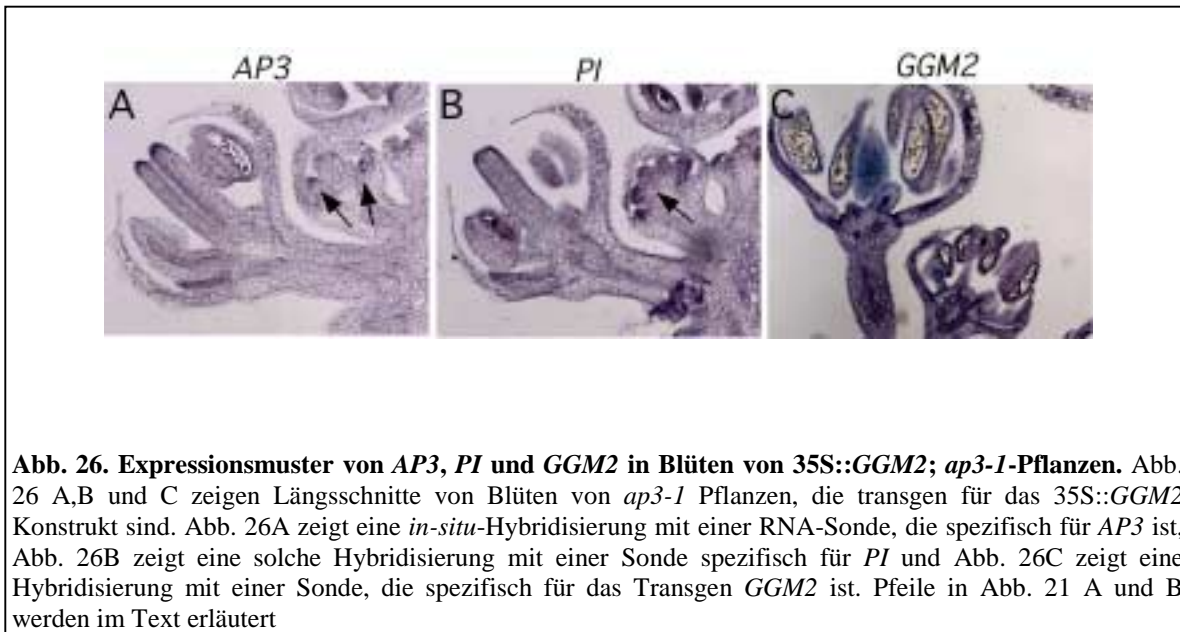
**Abb. 25. Komplementationsversuch der *ap3-1*-Mutante durch ekto­pisch exprimiertes *GGM2*.** Abb. 25A und B zeigen Blüten der *ap3-1*-Mutante bei nicht permissiver Temperatur von 26°C, während die Abb. 25G und H *ap3-1*-Blüten bei permissiver Temperatur von 16°C zeigen. In Abb. 25D, E, K und L sind Pflanzen gezeigt, die das 35S::*GGM2*-Konstrukt bei *ap3-1*-mutantem Hintergrund tragen. In Abb. 25D und E sind die Pflanzen bei 26°C, in Abb. 25K und L bei 16°C gehalten. Die Abb. 25 B, E, H und L zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Die Pictogramme in Abb. 25C, F, J und M stellen die durch Mutation und Transgenexpression veränderten ABC-Modelle dar.

Hält man die *ap3-1*-Mutante bei einer Temperatur von 16°C, so ist sie fertil und zeigt einen nahezu wildtypischen Phänotyp (Abb. 25G). Eine Untersuchung der Petalenoberflächen im zweiten Wirtel mittels des Rasterelektronenmikroskopes zeigt jedoch eine Zellstruktur, die nicht so vollständig geordnet wirkt, wie die von wildtypischen Petalen (vergleiche Abb. 25H mit Abb. 15A). Eher entsprechen die in Abb. 25H gezeigten Zellen den Randzellen der in Abb. 15E und F gezeigten Sepalen transgener 35S::*GGM2* Pflanzen. 35S::*GGM2*-transgene Pflanzen mit *ap3-1*-Mutation zeigen indes bei permissiver Temperatur von 16°C keine wildtypischen Organe im zweiten und dritten Wirtel, sondern gleichen den bei nicht permissiven 26°C gehaltenen Pflanzen (Abb. 25K). Die Stamina sind nicht fertil und die Organe im zweiten Wirtel bleiben relativ klein, haben eine grüne Farbe und zeigen deutlich sepaloide Zelloberflächen (Abb. 25K und L). Wie auch in wildtypischem Hintergrund ist die endogene B-Funktion dieser Pflanzen gestört (vergleiche mit 3.5.1, Abb. 17).

### 3.8.2 Molekulare Analyse

Die Expression des *GGM2* Transgens und der endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* wurde auch in den Pflanzen mit *ap3-1*-mutantem Hintergrund durch *in-situ*-Hybridisierungen analysiert. Die Abb. 26 zeigt Gewebeschnitte von Pflanzen der T<sub>2</sub>-Generation, die bei einer Temperatur von 26°C gehalten wurden. Das *ap3-1*-Allel weist einen Austausch von Lysin zu Methionin am 3'-Ende der K-Domäne auf (Jack *et al.*, 1992), weshalb instabile Interaktionen mit bestimmten Kofaktoren als Grund für die temperatursensitive Entwicklungsstörung postuliert wurden. In jüngster Zeit konnte jedoch gezeigt werden, daß bei *ap3-1*-Pflanzen ein *Splicing*-Fehler zum Verlust des fünften Exons und so zu einem nicht funktionierenden Protein führt. Bei nicht permissiver Temperatur hat die falsch zusammengesetzte mRNA einen Anteil von ca. 80%, was vermutlich in einer zu geringen Menge an funktionsfähigem AP3-Protein resultiert (Sablowski und Meyerowitz, 1998). Die Expression von *AP3* sollte demnach in der *ap3-1* Mutante in jungen Entwicklungsstadien auf Transkriptionsebene nachzuweisen sein, erst in reiferen Stadien kann die Transkription beider B-Funktionsgene nicht aufrecht gehalten werden, da es hierfür sehr wahrscheinlich des AP3/PI-Protein-Heterodimerkomplexes bedarf, der die Transkription beider Gene positiv autoregulierte (Jack *et al.*, 1992; Goto und Meyerowitz, 1994; Hill *et al.*, 1998; Tilly *et al.*, 1998). Abb. 26A zeigt eine relativ schwache Detektion des *AP3*-Transkripts in recht frühen Stadien (Pfeile weisen darauf hin) und ebenso in den Organen des zweiten Wirtels von reiferen Blüten 35S::*GGM2*-transgener *ap3-1*-Pflanzen.

Ein möglicher Grund für die verhältnismäßig schwache Detektion des Transkripts könnte das fehlende Exon sein, das von der in diesem Experiment verwendeten RNA-Sonde überspannt wird. Der Hybridisierungsbereich zwischen Sonde und Transkript wird demnach eingeschränkt. Auch die oben beschriebene autoregulative Kontrolle der *AP3*-Expression erklärt die Tatsache, daß zumindest in den reiferen Blüten kein deutliches *AP3*-Signal nachweisbar ist. Die länger anhaltende *AP3*-Transkription im zweiten Wirtel, verglichen mit dem dritten Wirtel, ist für die Expression dieses Gens ebenfalls in *pi-1*- (Jack *et al.*, 1992) und *ap3-3*-Mutanten (Samach *et al.*, 1997) beschrieben worden. Ein Erklärungsmuster dafür läßt sich aus Arbeiten von Tilly *et al.* (1998) ableiten. Aus den dort beschriebenen Experimenten geht hervor, daß die sogenannte „CArG2-Box“ im Promotor von *AP3* eine wichtige Rolle für die Expression des Gens in den Petalen spielt. Der Heterodimerkomplex aus *AP3/PI*-Protein kann jedoch nicht *in-vitro* an diese Sequenz binden (Tilly *et al.*, 1998). Demnach könnte die Expression von *AP3* im zweiten Wirtel weniger autoreguliert sein und deshalb in den *ap3*- und *pi*-Mutanten dort länger als in den Stamina nachzuweisen sein. Das Expressionsmuster von *PI* in *ap3-1*-Pflanzen, die ektopisch *GGM2* exprimieren, erstreckt sich in jüngeren Entwicklungsstadien über die inneren drei Wirtel (Abb. 26B, ein Pfeil weist auf die Transkription von *PI* im vierten Wirtel hin). Dieses Expressionsmuster ist auch aus wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen bekannt. Auch das *PI*-Signal wird in reiferen Blüten der transgenen *ap3-1*-Pflanzen schwächer (Abb. 26B) und ist in noch älteren Entwicklungsstadien nicht mehr nachweisbar (ohne Abb.). Die Hybridisierung von Blüten solcher Pflanzen mit einer Sonde, die spezifisch für *GGM2* ist, zeigt die Transkription des Transgens in allen Wirteln der Blüte sowohl in jungen, als auch in älteren Entwicklungsstadien (Abb. 26C). Zusammenfassend ist deutlich geworden, daß die Expression der endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI* in den hier untersuchten Blüten der *ap3-1*-Pflanzen durch die Expression des Transgens nicht auf weitere Wirtel ausgebreitet ist.



**Abb. 26. Expressionsmuster von AP3, PI und GGM2 in Blüten von 35S::GGM2; ap3-1-Pflanzen.** Abb. 26 A,B und C zeigen Längsschnitte von Blüten von *ap3-1* Pflanzen, die transgen für das 35S::GGM2 Konstrukt sind. Abb. 26A zeigt eine *in-situ*-Hybridisierung mit einer RNA-Sonde, die spezifisch für AP3 ist, Abb. 26B zeigt eine solche Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für PI und Abb. 26C zeigt eine Hybridisierung mit einer Sonde, die spezifisch für das Transgen GGM2 ist. Pfeile in Abb. 21 A und B werden im Text erläutert

### 3.9 Überexpression von GGM2 in der *Arabidopsis thaliana* Mutante *ap3-3*

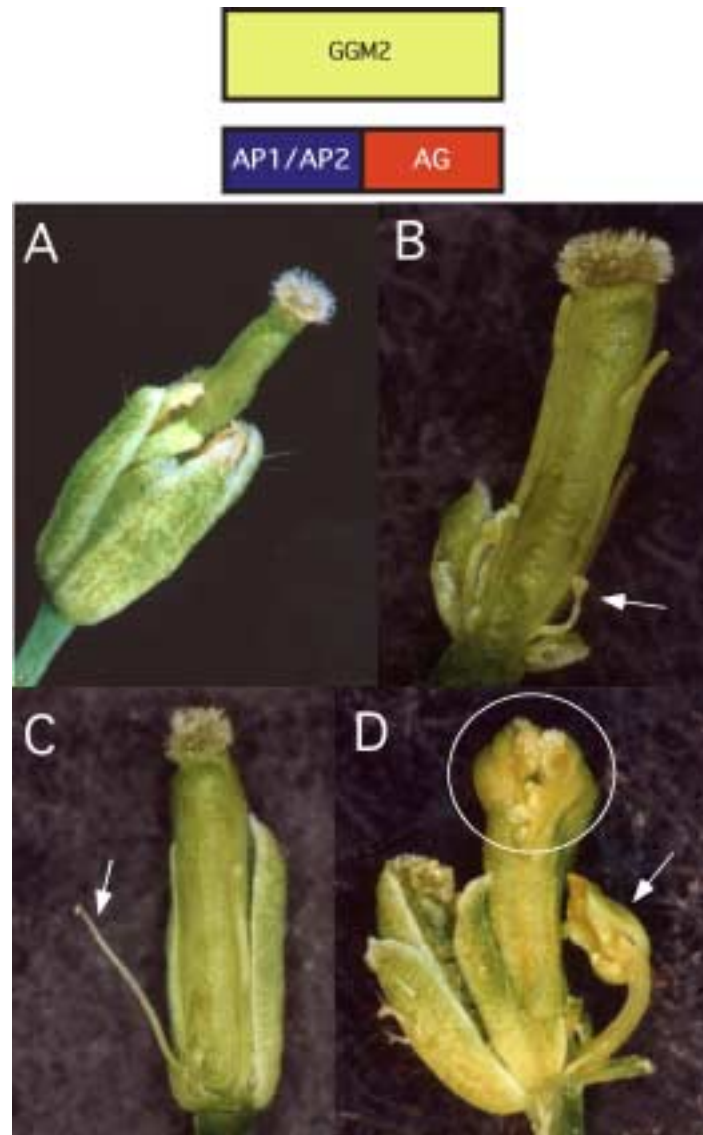
Da die temperatursensitive *Arabidopsis*-Mutantae *ap3-1* auch bei nicht-permissiven, hohen Temperaturen keine vollständige homöotische Transformation der Organe im dritten Wirtel zeigt (Abb. 25A bis C), und somit eventuelle Komplementationen durch das Transgen *GGM2* nur schwer zu analysieren sind (3.8.1), wurde zusätzlich die vollständige Funktionsverlustmutante *ap3-3*-Mutante für Komplementationsversuche mit *GGM2* herangezogen. Die Mutation betrifft die Aminosäure Glutamin innerhalb der MADS-Domäne an Position 18 der Proteinsequenz, wo statt CAA ein TAA, also ein Translationsstopkodon vorzufinden ist (Jack *et al.*, 1992). Pflanzen mit dieser Mutation zeigen im zweiten Wirtel sepaloide Organe an Stelle der wildtypischen Petalen und im dritten Blütenkreis Karpelle statt Stamina (Abb. 27A). Die Karpelle des dritten Wirtels sind bei einigen Blüten mutanter Pflanzen mit denen des vierten Wirtels verwachsen oder bilden ein äußeres Gynoeceum, welches das Gynoeceum des vierten Wirtels vollständig umhüllt (Jack *et al.*, 1992). Um das Transgen *GGM2* in der *ap3-3*-Mutante unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors ektopisch zu exprimieren, wurden homozygote *ap3-3*-Pflanzen mit der in 3.5 beschriebenen 35S::GGM2-Linie 5AII (T<sub>3</sub>-Generation) gekreuzt. Die Nachkommen, die sowohl für das Transgen als auch für die *ap3-3*-Mutation heterozygot waren, wurden geselbstet und die darauf folgende Generation durch BASTA-



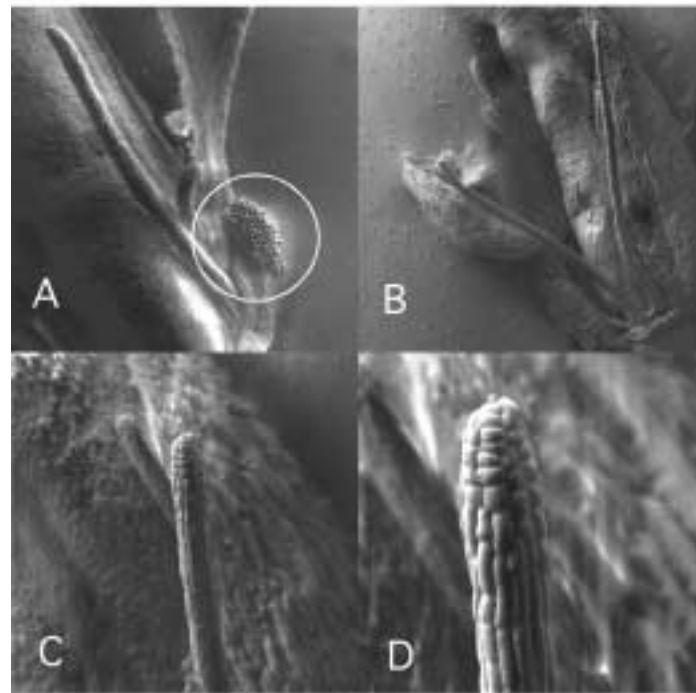
Selektion auf das Transgen und mittels PCR-Analyse und Sequenzierung (3.9.2) auf homozygote *ap3-3*-Mutation getestet.

### 3.9.1 Phänotypische Analyse

Pflanzen, die homozygot für die *ap3-3*-Mutation sind und ektopisch *GGM2* exprimieren zeigen deutliche Veränderungen der Blütenorgane im Vergleich zu nicht-transgenen *ap3-3*-Pflanzen (vergleiche Abb. 27B, C und D mit Abb. 27A). Im ersten Wirtel fallen, wie bei den in 3.5.1 beschriebenen Pflanzenlinien, abnorm gespreizte Sepalen auf. Die Organe im zweiten Wirtel unterscheiden sich jedoch bei transgenen und nicht-transgenen *ap3-3*-Pflanzen nicht. Es können in diesem Blütenkreis sepaloide Organe sowohl in transgenen, als auch in nicht-transgenen Pflanzen beobachtet werden. Im dritten Wirtel der transgenen *ap3-3*-Pflanzen hingegen finden sich sehr viel seltener karpelloide Strukturen als in den nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Besonders häufig sind in diesem Blütenkreis filamentöse Organe (Abb. 27B, C und Abb. 28) zu erkennen, die entweder an den Spitzen Strukturen erkennen lassen, die Ähnlichkeiten mit stigmatischem Gewebe zeigen (Abb. 27B[Pfeil] und Abb. 28A[Kreis]), oder aber gar nicht gekrönt sind (Abb. 28C und D). Die Zelloberflächen der Filament-ähnlichen Organe weisen ähnliche Charakteristika auf wie die Zellen von Filamenten der Stamina in wildtypischen Pflanzen (Abb. 27D, vergleiche mit Abb. 16C). Allerdings sind die hier beschriebenen filamentösen Organe erheblich dünner als die Filamente von wildtypischen Stamina (vergleiche Abb. 27B mit Abb. 16A). Gewebestrukturen, die Ähnlichkeiten zu Antheren zeigen oder gar vollständig ausgebildete Stamina konnten in diesen Pflanzen nicht gefunden werden. Einige Blüten von zwei für *GGM2* transgenen *ap3-3*-Pflanzen bildeten im dritten Wirtel vollständige „Tochterblüten“ (Abb. 27D[Pfeil]), deren Organe ebenfalls mit dem bloßen Auge betrachtet, die oben beschriebenen Charakteristika der transgenen *ap3-3*-Blüten zeigten. Die Organe im vierten Blütenkreis transgener *ap3-3*-Pflanzen zeigten allgemein keine Veränderungen zu den nicht-transgenen Pflanzen. In einigen Fällen konnte jedoch eine unvollständige Fusion der Karpelle im oberen Bereich des Gynoeceums beobachtet werden (Abb. 27D[Kreis]).



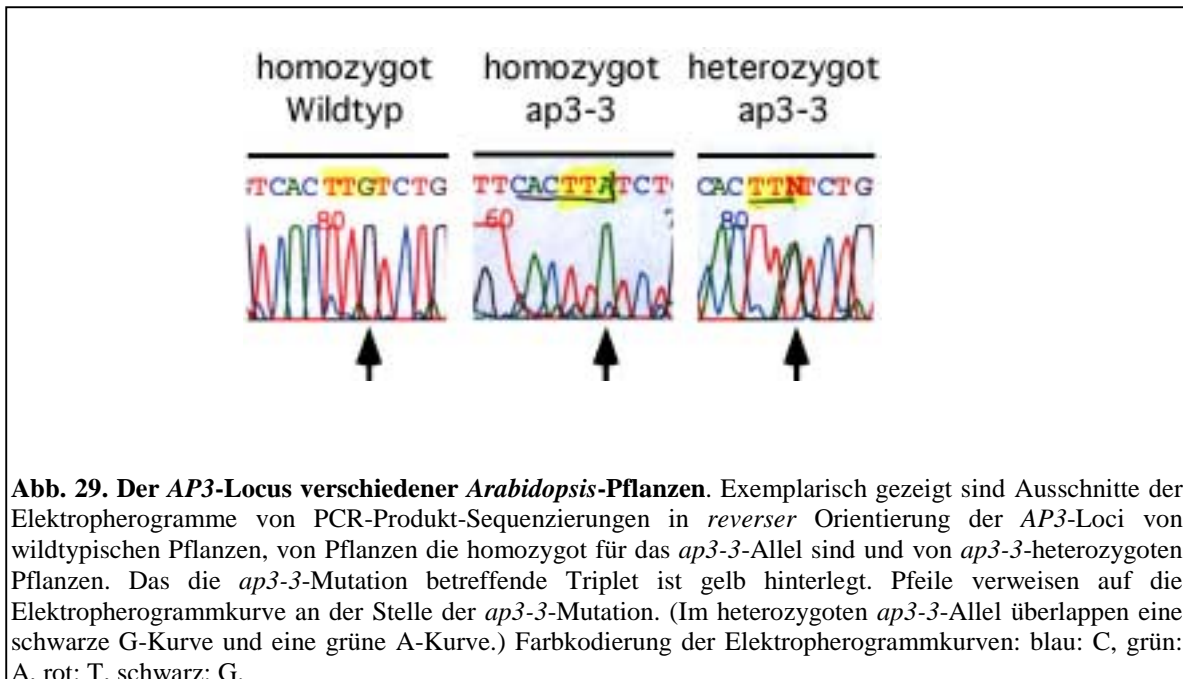
**Abb. 27. Komplementationsversuch der *Arabidopsis ap3-3*-Mutante durch ektopisch exprimiertes *GGM2*.** Abb. 27A zeigt die Blüte einer homozygot mutanten *ap3-3*-Pflanze. Abb. 27B, C und D zeigen Blüten von homozygoten *ap3-3*-Pflanzen, die ektopisch *GGM2* exprimieren. Die Pfeile verweisen auf verschiedene veränderte Organe des dritten Wirtels, während der Kreis in Abb. 27D unvollständig fusionierte Karpelle im vierten Wirtel hervorhebt. Das Pictogramm stellt das durch Mutation und Transgen veränderte ABC-Modell dar.



**Abb. 28. Verschiedene Organe des dritten Wirtels in Blüten von 35S::GGM2; *ap3-3*-Pflanzen.** Abb. 28A verweist auf stigmates Gewebe (Kreis) an der Spitze eines filamentösen Organs. Abb. 28B zeigt filamentöse Organe. Abb. 28C und D zeigen die Spitzen dieser Organe.

### 3.9.2 Molekulare Analyse

Ähnlich wie schon in 3.7.2 beschrieben, wurden nach Kreuzung homozygoter *ap3-3*-Pflanzen mit der 35S::GGM2-T<sub>3</sub>-Linie 5AII (siehe 3.5) und Selbstung derer Nachkommen transgene von nicht-transgenen Pflanzen durch Selektion mit dem Herbizid BASTA unterschieden. Um sicher homozygot mutante von heterozygot mutanten Pflanzen zu unterscheiden, wurde auch hier wie in 3.7.2 von allen BASTA-resistenten Pflanzen einzeln DNA isoliert und diese mittels PCR analysiert. Die Loci im Bereich der *ap3-3*-Mutation wurden amplifiziert und sequenziert. Bei wildtypischen *AP3* Locus findet man das Glutamin kodierende Triplet CAA, während man bei homozygoten Mutanten das Stopkodon TAA vorfindet. Die Amplifikate von DNA heterozygoter Pflanzen zeigen an dieser Stelle ein überlappendes Sequenzsignal aus C und T. In Abb. 29 sind Ausschnitte der Elektropherogramme solcher Sequenzierungen in *reverser* Orientierung gezeigt.

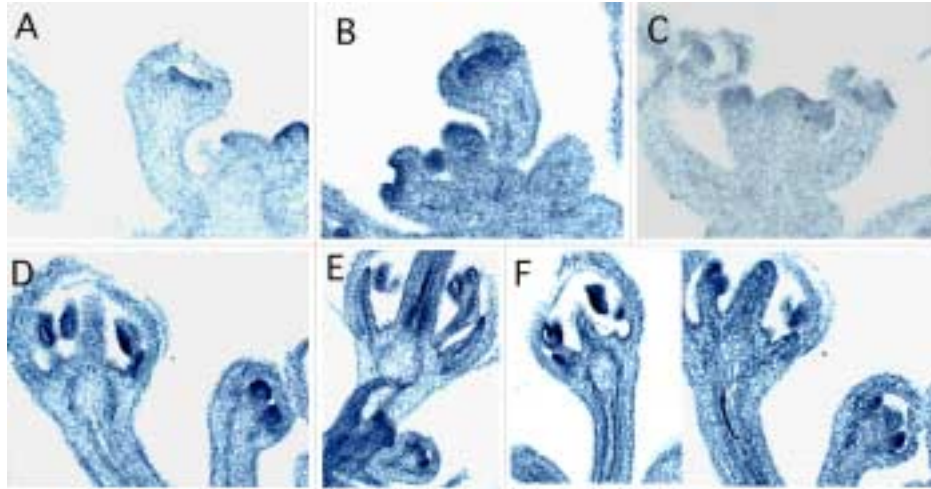


**Abb. 29. Der AP3-Locus verschiedener Arabidopsis-Pflanzen.** Exemplarisch gezeigt sind Ausschnitte der Elektropherogramme von PCR-Produkt-Sequenzierungen in *reverse* Orientierung der AP3-Loci von wildtypischen Pflanzen, von Pflanzen die homozygot für das *ap3-3*-Allel sind und von *ap3-3*-heterozygoten Pflanzen. Das die *ap3-3*-Mutation betreffende Triplet ist gelb hinterlegt. Pfeile verweisen auf die Elektropherogrammkurve an der Stelle der *ap3-3*-Mutation. (Im heterozygoten *ap3-3*-Allel überlappen eine schwarze G-Kurve und eine grüne A-Kurve.) Farbkodierung der Elektropherogrammkurven: blau: C, grün: A, rot: T, schwarz: G.

### 3.10 Komplementationsversuch der *Arabidopsis* Mutanten *ap3-3* und *pi-1* durch AP3::*GGM2*

Obwohl die Überexpression von *AP3* die Modifikationen im dritten Wirtel der *ap3-3* Mutante vollständig komplementieren kann, ist eine Transformation der mutanten Organe im zweiten Wirtel von sepaloiden Organen zu Petalen so nicht möglich (Jack *et al.*, 1994). Hingegen kann sowohl der genomische Klon von *AP3* inklusive des eigenen Promotors (Okamoto *et al.*, 1994) als auch die vom *AP3*-Promotor gesteuerte *AP3*-cDNA (Irish und Yamamoto, 1995) die *ap3-1* bzw. die *ap3-3* Mutante vollständig im zweiten und dritten Wirtel komplementieren. Dem CaMV-35S-Promotor scheinen also wichtige Regulationselemente des *AP3*-Promotors zu fehlen, die für eine präzise Expression dieser homöotischen Gene und deren vollständigen Funktion wichtig sind. Das 1,7 kBp lange Fragment des *AP3*-Promotors, dessen Funktion bereits ausführlich beschrieben war (Irish und Yamamoto, 1995; Hill *et al.*, 1998), bot sich an, *GGM2* kontrolliert nur im zweiten und dritten Wirtel einer *Arabidopsis* Blüte zu exprimieren. Wildtypische *Arabidopsis* Pflanzen wurden mit dem AP3::*GGM2*-Konstrukt (siehe 2.9.4) transformiert und deren Nachkommen ( $T_1$ -Generation) mit homozygoten *ap3-3* und *pi-1* Pflanzen gekreuzt. Die daraus resultierenden Pflanzen wurden geselbstet und deren segregierende Nachkommen mittels BASTA-Selektion und PCR-Analyse, wie in 3.7.2 und 3.9.2 beschrieben,

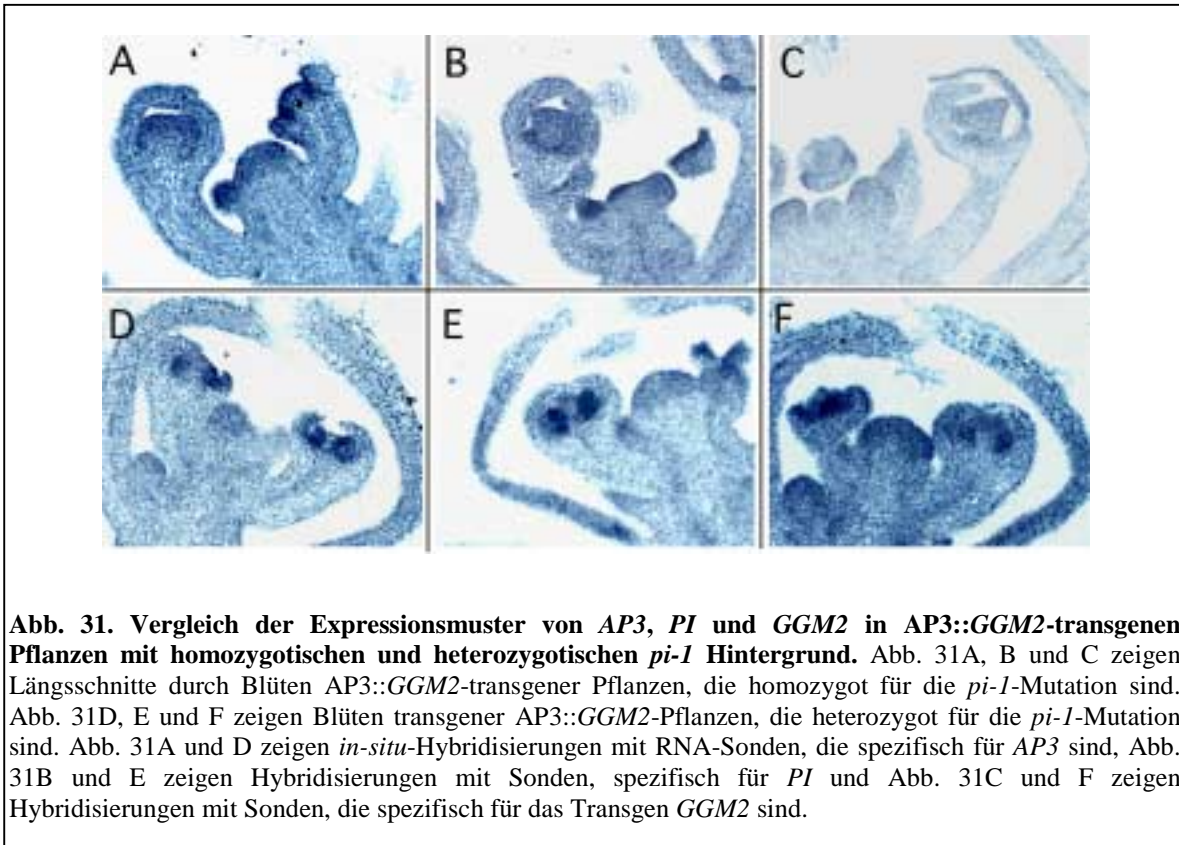
untersucht. Die DNA-Präparation sowie die PCR-Analysen wurden für dieses Experiment von Frau Britta Grosardt durchgeführt. Keine der für AP3::*GGM2* transgenen Pflanzen, die gleichzeitig homozygot für die *ap3-3*-Mutation waren, zeigt Phänotypen, die von denen nicht transgener *ap3-3*-Mutanten abweichen (ohne Abb.). Das AP3::*GGM2* Konstrukt kann die starke *ap3-3*-Mutation offensichtlich nicht komplementieren. *In-situ*-Hybridisierungen sollten zeigen, ob *GGM2* unter der Kontrolle des AP3-Promotors in den transgenen Pflanzen das erwartete Expressionsmuster im zweiten und dritten Blütenkreis zeigt. Abb. 30 zeigt einen Vergleich der Expressionsmuster von AP3, *PI* und *GGM2* in AP3::*GGM2* Pflanzen, die homozygot für die *ap3-3*-Mutation sind, mit heterozygoten Pflanzen, die ebenfalls das erwähnte Konstrukt tragen. In homozygoten *ap3-3*-Pflanzen ist das AP3-Transkript nur in sehr jungen Blüten im zweiten und dritten Wirtel nachweisbar. In älteren Entwicklungsstadien solcher Blüten läßt sich das AP3-Signal nur noch in wenigen Zellen an der Basis des zweiten Wirtels feststellen (Samach *et al.*, 1997; vergleiche auch 3.8.2). Abb. 30A zeigt das Expressionsmuster von AP3 in einer schon weiter entwickelten Blüte einer homozygoten *ap3-3*-Pflanze, die gleichzeitig transgen für das AP3::*GGM2*-Konstrukt ist. Das Transkript läßt sich nur sehr schwach nachweisen, in noch reiferen Entwicklungsstadien konnte keine AP3-mRNA mehr nachgewiesen werden (ohne Abb.). Die Expression von *PI* läßt sich in solchen Blüten ein wenig länger dokumentieren (Goto und Meyerowitz, 1994; Samach *et al.*, 1997). Abb. 30B zeigt eine ähnlich weit entwickelte Blüte wie Abb. 30A, das *PI*-Signal in Abb. 30B ist aber deutlich stärker als das AP3-Signal in Abb. 30A. Transkripte des Transgens *GGM2* können hingegen nahezu gar nicht detektiert werden (Abb. 30C). Besonders auffällig ist der Vergleich der oben beschriebenen Expressionsmuster mit denen in AP3::*GGM2* transgenen Pflanzen, die heterozygot für die *ap3-3*-Mutation sind (Abb. 30D bis F). Hier kann das nicht mutierte Allel noch genügend AP3-Protein produzieren, um die Expression sowohl der endogenen Gene AP3 und *PI* als auch des Transgens *GGM2* über den schon beschriebenen Autoregulationsmechanismus aufrecht zu erhalten. Für alle drei Gene sieht man starke Expressionssignale auch in recht reifen Entwicklungsstadien (Abb. 30D, E und F). Damit wäre ebenfalls gezeigt, daß das verwendete AP3::*GGM2*-Konstrukt durchaus funktionstüchtig ist, jedoch ohne genügend AP3/PI-Proteinkomplex nicht exprimiert wird.



**Abb. 30. Vergleich der Expressionsmuster von *AP3*, *PI* und *GGM2* in *AP3::GGM2*-transgenen Pflanzen mit homozygotischen und heterozygotischen *ap3-3* Hintergrund.** Abb. 30A, B und C zeigen Längsschnitte durch Blüten *AP3::GGM2*-transgener Pflanzen, die homozygot für die *ap3-3* Mutation sind. Abb. 30D, E und F zeigen Blüten transgener *AP3::GGM2* Pflanzen, die heterozygot für die *ap3-3*-Mutation sind. Abb. 30A und D zeigen *in-situ*-Hybridisierungen mit RNA-Sonden, die spezifisch für *AP3* sind, Abb. 30B und E zeigen Hybridisierungen mit Sonden, spezifisch für *PI* und Abb. 30C und F zeigen Hybridisierungen mit Sonden, die spezifisch für das Transgen *GGM2* sind.

Auch der Komplementationsversuch der *pi-1*-Mutante durch das *AP3::GGM2*-Konstrukt zeigt in transgenen Pflanzen, die homozygot für die Mutation sind, keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu nicht transgenen *pi-1*-Pflanzen (ohne Abb.). Ebenfalls zeigten *in-situ*-Hybridisierungsexperimente, daß das durch den *AP3*-Promotor kontrollierte Transgen *GGM2* in homozygoten Mutanten nicht ausreichend exprimiert wird (Abb. 31C), während heterozygote Mutanten sehr wohl eine deutliche Transkription des Gens im zweiten und dritten Wirtel der Blüten zeigen (Abb. 31F). Das Transgen wird nur dann exprimiert, wenn genügend *AP3/PI*-Protein zur Verfügung stehen, was in heterozygoten nicht aber in homozygoten Mutanten der Fall ist. Die endogenen B-Funktionsgene zeigen ebenso das gewohnte Transkriptionsmuster in der B-Funktionsmutante *pi-1*. Die Expression von *AP3* beginnt in sehr jungen Entwicklungsstadien der Blüte im Bereich des zweiten und dritten Wirtels, ist aber in älteren Blüten nicht mehr zu erkennen (Abb. 31A). Abb. 31D zeigt die deutlich stärkere Transkription dieses Gens in der heterozygoten *pi-1*-Mutante, die auch phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist. *PI*-Transkripte sind auch in der *pi-1*-Mutante etwas länger nachzuweisen als die *AP3*-Expression (Goto und Meyerowitz, 1994). Abb. 31B zeigt das *PI*-Signal in der homozygoten und Abb. 31E

in der heterozygoten Mutante, in der es deutlich stärker zu erkennen ist. In reiferen Entwicklungsstadien homozygoter *pi-1*-Blüten konnte weder *AP3*- noch *PI*-Transkript detektiert werden (ohne Abb.).



**Abb. 31. Vergleich der Expressionsmuster von *AP3*, *PI* und *GGM2* in *AP3::GGM2*-transgenen Pflanzen mit homozygotischen und heterozygotischen *pi-1* Hintergrund.** Abb. 31A, B und C zeigen Längsschnitte durch Blüten *AP3::GGM2*-transgener Pflanzen, die homozygot für die *pi-1*-Mutation sind. Abb. 31D, E und F zeigen Blüten transgener *AP3::GGM2*-Pflanzen, die heterozygot für die *pi-1*-Mutation sind. Abb. 31A und D zeigen *in-situ*-Hybridisierungen mit RNA-Sonden, die spezifisch für *AP3* sind, Abb. 31B und E zeigen Hybridisierungen mit Sonden, spezifisch für *PI* und Abb. 31C und F zeigen Hybridisierungen mit Sonden, die spezifisch für das Transgen *GGM2* sind.

## 4. Diskussion

Die Evolution der Blütenpflanzen (*Angiospermae*) wird, wie in der Einleitung dieser Arbeit (siehe 1.1) bereits dargestellt, seit über einhundert Jahren kontrovers diskutiert. Weder klassische, morphologische Studien an rezenten Pflanzen und fossilen Funden noch molekulare, systematische Ansätze konnten bisher eine befriedigende und allgemein akzeptierte Theorie der Angiospermenevolution vorstellen.

Gene, die ontogenetische Prozesse bei höheren Vielzellern steuern, haben ein besonders großes Potential neue Phänotypen und Grundbaupläne von Lebewesen zu bilden (Purugganan, 1998; Theißen und Saedler, 1995). Da die Blütenentwicklung der Angiospermen eines der wohl am besten verstandenen Beispiele von pflanzlichen Entwicklungsprozessen darstellt (Theißen und Saedler, 1999), sollte die evolutionäre molekulare Entwicklungsbiologie besonders geeignet sein, die lang diskutierten Fragen zur Evolution der Blüte zu beantworten. In der vorliegenden Arbeit wurden putative Orthologe der floralen homöotischen B-Funktionsgene, denen ein besonderes Potential bei der morphologischen Diversifizierung der Blüten zugesprochen wird (siehe 1.6), aus einer phylogenetisch informativen Spezies, der Gymnosperme *Gnetum gnemon* charakterisiert.

### 4.1 Ein Modell zur Evolution der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene

Eine große Anzahl jüngst klonierter MADS-Box-Gene aus Gymnospermen zeigt deutliche Ähnlichkeiten zu Genen, die schon aus Blütenpflanzen bekannt sind. Phylogenetische Analysen konnten belegen, daß mindestens sieben der bekannten Subgenkladen der MADS-Box-Genfamilie Vertreter aus Angiospermen und Gymnospermen aufweisen. Diese Genkladen, zu denen auch die floralen homöotischen B- und C-Funktionsgene gehören, waren demnach schon im letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Samenpflanzen etabliert (Becker *et al.*, im Druck).

Die homöotischen B-Funktionsgene der Angiospermen sind Mitglieder zweier Subgenkladen der MADS-Box-Genfamilie (siehe 1.5 und 3.3), der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene. Obwohl aus *Gnetum* und Koniferen isolierte Gene eine besonders nahe Verwandtschaft zu den *DEF*- und den *GLO*-ähnlichen Genen der Blütenpflanzen zeigen (Mouradov *et al.*, 1999; Sundström *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 1999), konnte bisher kein



Gymnospermengen eindeutig einer dieser beiden Genkladen zugeordnet werden. Die beiden Linien der B-Funktionsgene gehen sehr wahrscheinlich auf einen gemeinsamen Vorfahren *DEF/GLO*-ähnlicher Gene zurück und bilden so eine übergeordnete Genklade (Theißen *et al.*, 1996; Theißen *et al.*, 2000). Aus der Abb. 8 in Kapitel 3.3 läßt sich ersehen, daß die *Gnetum*-Gene *GGM2* und *GGM15* und ihre jeweiligen Orthologen aus Koniferen zwei basale Kladen bilden, die als Schwestergruppen vor dieser übergeordneten, monophyletischen Gruppe aus *DEF*- und *GLO*-ähnlichen Genen abzweigen (Abb. 8). Daß die *DEF*- und die *GLO*-Klade und die *DAL12*- und die *GGM2*-ähnlichen Gene zusammen eine gemeinsame Genklade, die Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene, bilden, ist in der in 3.3 gezeigten Phylogenierekonstruktion statistisch sehr gut abgesichert (Abb. 8). Aus Phylogenierekonstruktionen mit Vertretern weiterer MADS-Box-Genkladen wurde deutlich, daß die *GGM13*-ähnlichen Gene die am nächsten mit der Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene verwandte MADS-Box-Genklade darstellen (Becker *et al.*, im Druck; Theißen *et al.*, 2000).

Innerhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenzen *DEF/GLO*-ähnlicher und *GGM13*-ähnlicher Gene finden sich zudem weitere informative Merkmale, die deren Verwandtschaft untermauern. In Sequenz-*Alignments* der MADS-Domäne-Proteine fallen alle bisher bekannten Sequenzen der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Proteine durch eine im Vergleich zu anderen MADS-Domäne-Proteinen verkürzte I-Region (siehe 1.5 und 3.3) auf. Ein solcher in Abb. 9 dargestellter Vergleich von Sequenzen von exemplarischer Auswahl zeigt, daß auch die Aminosäuresequenzen von *GGM13* und der *GGM2*- und *DAL12*-ähnlichen Gene eine derart verkürzte I-Region besitzen. *GGM15* und *PRDGL* zeigen allerdings in der I-Region zusätzlich zu dieser Sequenzdeletion Insertionen (Abb. 9), die in keiner weiteren der hier aufgeführten Sequenzen festzustellen sind. Durch diese Insertionen entsprechen die I-Regionen von *GGM15* und *PRDGL* in der Länge insgesamt wieder den I-Regionen anderer MIKC-Typ MADS-Box-Gene. Da das in Abb. 9 dargestellte *Alignment* im Bereich stromabwärts der diskutierten Sequenzinsertionen eine recht gute Konservierung zeigt, ist nicht anzunehmen, daß die Insertionen von *PRDGL* und *GGM15* ein *Alignment*-Artefakt darstellen und diesen Sequenzen einfach die für *DEF/GLO*-ähnliche Proteine spezifische Deletion fehlt. Das Fehlen einer solchen Deletion könnte indes als plesiomorpher Charakter interpretiert werden. Legt man jedoch zusätzlich die (gut unterstützte) Topologie der Phylogenierekonstruktion aus Abb.8 zugrunde, muß für *GGM15* und *PRDGL* jeweils eine sekundäre Verlängerung der I-Region angenommen

werden. Die alternative Hypothese, bei der die Deletion mehrfach unabhängig entstanden sein müßte, ist sehr viel unwahrscheinlicher.

Im C-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenzen *DEF/GLO*-ähnlicher Gene konnten Kramer *et al.* (1998) die schon in 3.3 beschriebenen charakteristischen Sequenzmotive identifizieren (Abb. 10). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sowohl der *GGM13*-ähnlichen als auch der *DEF/GLO*-ähnlichen Gymnospermengene, zeigten Charakteristika des „PI-Motivs“ der *GLO*-ähnlichen Proteine und des „abgeleiteten PI-Motivs“ der *DEF*-ähnlichen Proteine (Abb. 10). Nur sehr wenige Aminosäuren sind für eine Unterscheidung zwischen „PI-Motiv“ und „abgeleitetem PI-Motiv“ informativ. Dennoch zeigen alle hier diskutierten Sequenzen aus Gymnospermen spezifische Aminosäuren des „PI-Motivs“. Zusätzlich weisen PRDGL, DAL11 und DAL13 auch eine charakteristische Aminosäure des abgeleiteten „PI-Motivs“ auf (Abb. 10 [Pfeile]). Möglicherweise zeigt das PI-Motiv der Gymnospermensequenzen noch Merkmale eines putativen basalen PI-Motivs aus dem sich das „abgeleitete-PI-Motiv“ und das „PI-Motiv“ der Angiospermensequenzen entwickeln konnte. Der Terminologie von Kramer *et al.* (1998) folgend wäre ein solches Motiv als „Paleo-PI-Motiv“ zu bezeichnen (Abb. 10). Merkmale des „Paleo-AP3-Motivs“ konnten in den Sequenzen der *GGM13*-ähnlichen Proteine, der DAL12-ähnlichen Proteine und in der Proteinsequenz von *GGM2* gefunden werden. Jedoch fand sich kein Hinweis auf ein „Paleo-AP3-Motiv“ in PRDGL, DAL11 und DAL13. Da die in Abb. 8 gezeigte Phylogenierekonstruktion diese drei Sequenzen in einer gut unterstützten Genklade zusammenfaßt, ist ein einmaliger Verlust des „Paleo-AP3-Motivs“ für diese Gruppe nicht unwahrscheinlich. Ein weiterer unabhängiger Verlust dieses Motivs wäre für die Klade der *GLO*-ähnlichen Gene zu postulieren.

Weitere Hinweise auf die phylogenetische Stellung der *Gnetum*-Gene *GGM2* und *GGM15* innerhalb der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene ergeben sich aus der genomischen Struktur dieser Gene (Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 11). Während das letzte Exon der K-Box und das erste Exon des C-Terminus (Exon 6 und 7, gemäß der Zählweise des *AG*-Gens) bei den meisten der bisher auf ihre genomische Struktur untersuchten MIKC-Typ-Gene eine Länge von 42 Bp zeigt, besitzen alle bisher daraufhin untersuchten *DEF*-ähnlichen Gene ein 45 Bp langes siebtes Exon und alle Gene der *GLO*-Linie zeigen zusätzlich ein verkürztes, 30 Bp langes sechstes Exon. Nach dem *Parsimony*-Prinzip muß eine Länge von 42 Bp dieser Exons als plesiomorpher Charakter angesehen werden (Abb. 11). Eine solche plesiomorphe Exon/Intron-Struktur findet sich auch für *GGM13* (A. Becker, pers. Mitt.) und für die *GGM2*-ähnlichen Gene *GGM2*, *DAL11* und *DAL13* (Abb. 6) (Sundström *et al.*,

1999). Die genomische Struktur von *PRDGL* ist nicht publiziert. Die Exon/Intron-Struktur dieser Gene unterstützt demnach ihre schon in der Abb. 8 postulierte basale Stellung gegenüber der *DEF*- und der *GLO*-Linie. Die ebenfalls im Stammbaum in der Abb. 8 basal eingeordneten *DAL12*-ähnlichen Gene weisen jedoch ein sechstes Exon mit stark abweichender Länge auf. Während für *GGM15* dieses Exon mit einer Länge von 75 Bp aus einer Fusion eines 30 Bp und eines 45 Bp langen Exons, wie für *GLO*-ähnliche Gene üblich, entstanden sein könnte, paßt das 113 Bp lange Exon 6 von *DAL12* zu keiner der diskutierten Strukturen. Aufgrund der Exon/Intron-Struktur für *GGM15* eine besonders nahe Verwandtschaft mit den Genen der *GLO*-Linie zu postulieren (Abb. 11), widerspräche der Topologie der in Abb. 8 gezeigten Phylogeniekonstruktion. Eine alternative Hypothese auf der Basis dieser Phylogeniekonstruktion interpretiert das 75 Bp lange Exon von *GGM15* als eine Variation des ebenfalls verlängerten Exon 6 von *DAL12*. Möglicherweise haben ähnliche evolutionäre Zwänge bei den *GLO*-ähnlichen Genen und bei *GGM15* konvergent zu einer ähnlichen genomischen Struktur geführt.

Unter Berücksichtigung aller hier vorgestellten Daten ergibt sich für die Evolution der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene das folgende hypothetische Bild (Abb. 32): Nach der Genduplikation, welche die *GGM13*-ähnlichen Gene und die *DEF/GLO*-ähnlichen Gene von den übrigen MIKC-Typ-Genen separiert, aber vor der Abspaltung der *GGM13*-ähnlichen Gene von den *DEF/GLO*-ähnlichen Genen, ist die Sequenzdeletion der I-Region und das „Paleo-PI-Motiv“ sowie das „Paleo-AP3-Motiv“ entstanden. Bereits publizierte Phylogeniekonstruktionen (Becker *et al.*, im Druck; Theißen *et al.*, 2000) weisen die *GGM13*-ähnlichen Gene als Schwestergruppe einer Klade aus *DEF*-, *GLO*-, *DAL12*- und *GGM2*-ähnlichen Genen, der *DEF/GLO*-Genklade, aus (siehe auch 3.3). Die folgende Genduplikation innerhalb der Gruppe der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene ist mit den zur Verfügung stehenden Daten nicht aufzulösen. Die in Abb. 8 vorgeschlagene Topologie ist im Bereich dieser Genduplikation nur mit sehr geringen *Bootstrap*-Werten unterstützt. Während die *DAL12*-ähnlichen Gene eine Verlängerung des sechsten Exons auf 113 Bp (*DAL12*) bzw. 75 Bp (*GGM15*) zeigen, findet sich bei den *GGM2*-ähnlichen Genen der plesiomorphe Zustand bezüglich der Exon/Inton-Struktur. Innerhalb der *GGM2*-ähnlichen Gene verlieren die Koniferengene das „Paleo-AP3-Motiv“. Außerdem entstehen im *GGM2*-ähnlichen Gen *PRDGL* und im *DAL12*-ähnlichen Gen *GGM15* unabhängig voneinander Sequenzinsertionen innerhalb der I-Region (Abb. 32). Die *DEF*- und die *GLO*-ähnlichen Gene bilden eine durch hohe *Bootstrap*-Werte abgesicherte Genklade (Abb. 8), die sich außerdem durch den Besitz eines auf 45 Bp verlängerten siebten Exons

auszeichnet (Abb. 11). Diese Exon/Intron-Struktur bleibt innerhalb der *DEF*-ähnlichen Gene konserviert, während sich die *GLO*-ähnlichen Gene mit einer Verkürzung des sechsten Exons und dem Verlust des „Paleo-AP3-Motivs“ abspalten. Das „Paleo-PI-Motiv“ evolviert nach dieser Genduplikation zum „PI-Motiv“ der *GLO*-Linie und zum „abgeleiteten PI-Motiv“ der *DEF*-ähnlichen Gene.

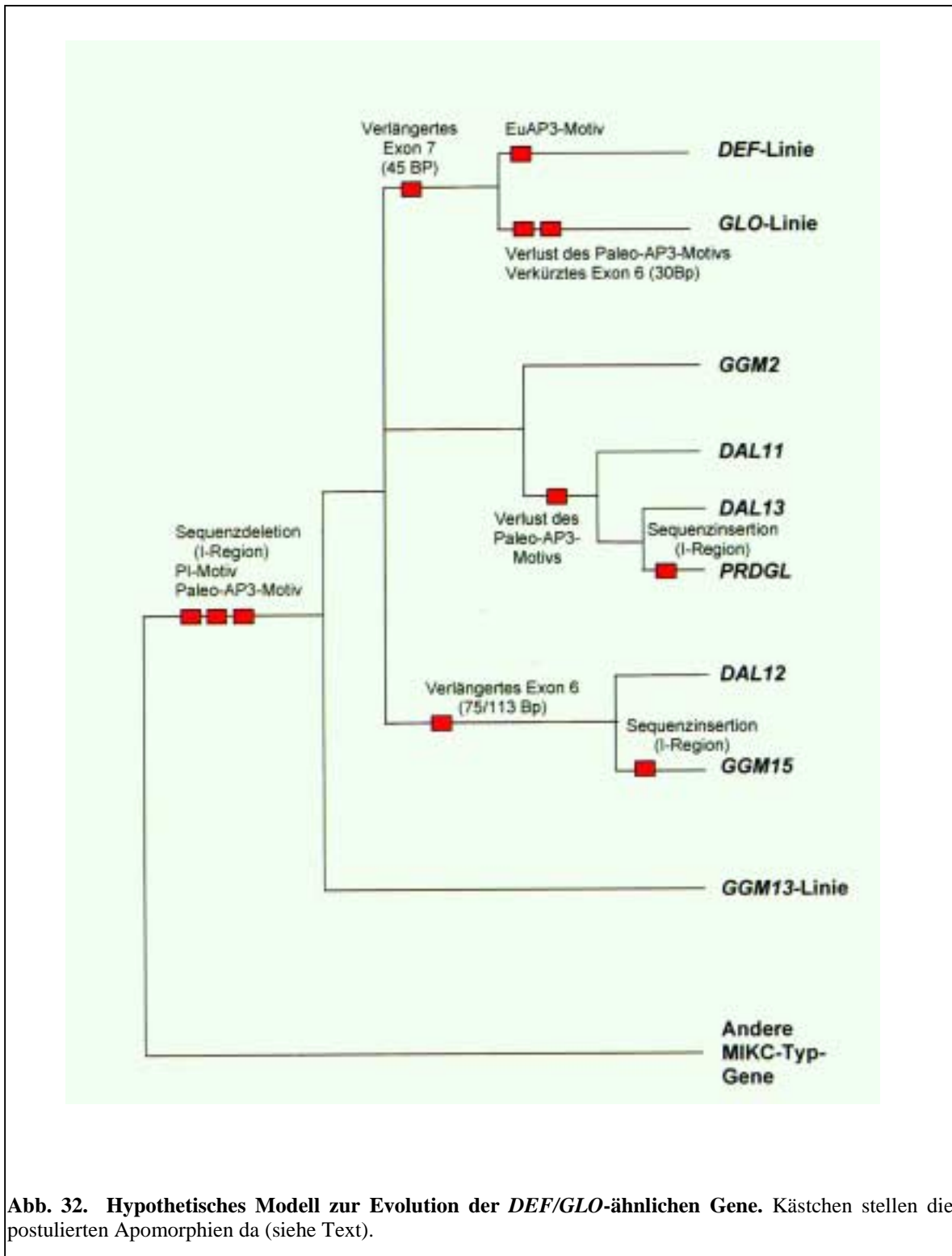


Abb. 32. Hypothetisches Modell zur Evolution der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene. Kästchen stellen die postulierten Apomorphien da (siehe Text).

Da bisher alle *DEF*-ähnlichen und alle *GLO*-ähnlichen Gene aus Angiospermen und alle *DAL12*- und *GGM2*-ähnlichen Gene ausschließlich aus Gymnospermen isoliert wurden, ist es wahrscheinlich, daß die Duplikation, die zur *DEF*- und zur *GLO*-Klade geführt hat, in der Linie stattgefunden hat, die zu den rezenten Angiospermen geführt hat. Basale *DEF/GLO*-ähnliche Gene müssen allerdings schon im letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Samenpflanzen vorhanden gewesen sein.

#### 4.2 Das B/C-Modell der Gymnospermen

Nach den in 3.4 beschriebenen Expressionsanalysen wird das *AG*-ähnliche *Gnetum*-Gen *GGM3* sowohl in den männlichen, als auch in den weiblichen Reproduktionsorganen von *Gnetum gnemon* transkribiert. Kein Transkript konnte in vegetativen Blättern nachgewiesen werden (Abb. 12; Winter, 1997). Das zu *GGM3* putativ orthologe Fichtengen *DAL2* zeigt ein ähnliches Expressionsmuster. Die Transkription dieses Gens beschränkt sich ebenfalls auf die reproduktiven Organe (siehe 1.6; Tandre *et al.*, 1995; 1998). Die floralen homöotischen C-Funktionsgene der Angiospermen, die wie *GGM3* und *DAL2* Mitglieder der *AG*-Genklade sind (siehe 1.5 und 1.6), spezifizieren, dem klassischen ABC-Modell zur Folge, innerhalb der Blüte Stamina und Karpelle. Diese Funktionen bedingen eine Expression in männlichen (Stamina) und weiblichen (Karpelle) Reproduktionsorganen. Das Expressionsmuster der *AG*-ähnlichen Gene aus Gymnospermen ist demnach bis zu den homöotischen C-Funktionsgenen der bedecktsamigen Blütenpflanzen konserviert worden. Heterologe Transformationsexperimente, die mit *DAL2* und dem orthologen Fichtengen *SAG1* durchgeführt wurden, erbrachten sogar Hinweise, daß zumindest regulative Elemente zwischen den *AG*-ähnlichen Gymnospermengen und den C-Funktionsgenen der Angiospermen konserviert sind (siehe 1.6; Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998). Auf Grundlage dieser Daten wurde für die Gymnospermen ein ancestrale C-Funktion postuliert, die reproduktive Organe, durch die Expression eines *AG*-ähnlichen „Sporophyll-Gens“, von vegetativen Organen differenziert (Theißen *et al.*, 2000; Winter, 1997; Winter *et al.*, 1999).

#### 4.2.1 Die Expression von *GGM2*

Neben dieser „Sporophyll-Grundfunktion“ wurde eine zweite Funktion postuliert, die männliche von weiblichen Reproduktionsorganen unterscheidet. Da in Angiospermen die männlichen Reproduktionsorgane, die Stamina, durch die Expression der B-Funktionsgene von den weiblichen Reproduktionsorganen, den Karpellen, differenziert werden, wurde ein solches „Mikrosporophyllgen“, als Vorläufer der floralen homöotischen B-Funktionsgene, innerhalb der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene vermutet (Albert *et al.*, 1998; Baum, 1998; Kramer und Irish, 1999). Das *DEF/GLO*-ähnliche Gen *GGM2* wird, wie auch *GGM15* (A. Becker, pers. Mitt.), ausschließlich in den männlichen Antherophoren der reproduktiven Organe von *Gnetum gnemon* exprimiert (Abb. 12). In frühen Entwicklungsstadien der männlichen reproduktiven Organe überlappen die Expressionsmuster von *GGM3* und *GGM2* (Abb. 12D und E). Damit wäre eine Interaktion der Genprodukte von *GGM2* und *GGM3* zumindest im frühen Stadium der Mikrosporophyllentwicklung von *Gnetum* möglich. Ähnliche Interaktionen werden auch für die Proteine der B- und C-Funktionsgene der Angiospermen während der Entwicklung der Stamina vermutet. Allerdings basieren solche Interaktionen nicht auf einfacher Proteindimerisierung (Davies *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996). Jüngere Daten weisen eher auf die Bildung ternärer Komplexe aus mehr als nur zwei MADS-Domäne-Proteinen hin (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Pelaz *et al.*, 2000). Die Expression von *GGM2* beginnt mit der morphologisch sichtbaren Differenzierung der Mikrosporophylle (Abb. 12D), *GGM3*-Transkripte sind hingegen schon etwas früher nachweisbar (Abb. 12E). Es wäre demnach vorstellbar, daß Proteinkomplexe, die *GGM3*-Proteine enthalten, dem Gewebe einen reproduktiven Charakter verleihen, während Komplexe mit *GGM3*- und *GGM2*-Proteinen (und *GGM15*-Proteinen?) auf dieser Basis die Mikrosporophyllentwicklung starten. Spätere Entwicklungsschritte der männlichen Antherophoren von *Gnetum* müssen ohne Beteiligung von *GGM3* ablaufen, da in späten Stadien die Transkription dieses Gens nur noch in den Hüllorganen der Mikrosporophylle nachweisbar ist (Abb. 12H). Die Transkription von *GGM2* ist in den Antherophoren auch in späteren Stadien nachweisbar (Abb. 12G), was einerseits auf unterschiedliche Proteinkomplexe für die Steuerung früher und späterer Entwicklungsschritte der Antherophoren hinweist, andererseits die Bedeutung von *GGM2* für die Mikrosporophyllentwicklung unterstreicht. Eine kontinuierliche Expression der B-Funktionsgene ist auch für die Entwicklung der Stamina von

Angiospermen als essentiell beschrieben worden (Goto und Meyerowitz, 1994; Kramer und Irish, 1999; Tröbner *et al.*, 1992).

#### 4.2.2 Regulative Elemente der Promotoren von *GGM2* und *GGM15*

Wie die schon diskutierten Expressionsmuster der Organidentitätsgene reguliert werden, ist auch für die bedecktsamigen Modellpflanzen *Arabidopsis* und *Antirrhinum* nicht vollständig verstanden. Das Meristemidentitätsgen *LFY* aus *Arabidopsis* und dessen Orthologe in anderen Spezies nehmen sehr wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in diesen Regulationsprozessen ein (Ng und Yanofsky, 2000; Theißen, 2000). So konnte kürzlich gezeigt werden, daß *LFY*-Protein direkt an den Promotor des A-Funktionsgens *AP1* und an das erste Intron des C-Funktionsgens *AG* bindet und deren Transkription aktiviert (Busch *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 1998). Ähnlich bindet *LFY* an die Promotoren der *Arabidopsis*-B-Funktionsgene *AP3* (V. Irish, pers. Mitt.) und *PI* (Honma und Goto, 2000). Für die Protein/DNA-Interaktion konnte in den Promotoren von *AP1* und *AG* eine Bindestelle mit der Konsensussequenz CCANTG identifiziert werden (Busch *et al.*, 1999). Solche Sequenzbereiche finden sich auch in den putativen Promotoren von *GGM2* und *GGM15* (siehe 3.2, Abb. 6 und 7). Auch ist aus *Gnetum gnemon* ein zu *LFY* orthologes Gen (*GNLFY*) bereits bekannt (Frohlich und Meyerowitz, 1997). RNA-Gel-Hybridisierungsexperimente haben zudem schon gezeigt, daß *GNLFY* in den reproduktiven Organen von *Gnetum* transkribiert wird (eigene, hier nicht gezeigte Daten). Ob das Protein dieses Gens allerdings an die in 3.2 beschriebenen Sequenzelemente von *GGM2* oder *GGM15* bindet, ist bisher noch nicht gezeigt worden. Zudem gibt es Hinweise, daß die Bindestellen von *LFY*-ähnlichen Proteinen an Promotoren der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene nicht der oben genannten Konsensussequenz entsprechen. So zeigt die Region der *LFY*-Bindestelle innerhalb des *AP3*-Promotors die von Busch *et al.* (1999) identifizierte Konsensussequenz nur sehr schwach konserviert (V. Irish, pers. Mitt.), und auch die innerhalb des *PI*-Promotors lokalisierten Konsensussequenzen von putativen *LFY*-Bindestellen liegen nicht auf dem Sequenzabschnitt, den Honma und Goto (2000) für eine Interaktion mit dem *LFY*-Protein gefunden hatten. *In-vitro*-Bindestudien, die in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden konnten, werden zeigen, ob das *GNLFY*-Protein an die Promotoren von *GGM2* und/oder *GGM15* bindet.

Während für die Transkriptions-Aktivierung der B-Funktionsgene in Angiospermen sehr wahrscheinlich Meristemidentitätsgene wie *LFY* eine Rolle spielen, wird für die

Fortsetzung der Transkription der B-Funktionsgene ein Autoregulationsmechanismus postuliert (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tilly *et al.*, 1998). Dabei binden die als Heterodimer (siehe auch 1.6) agierenden B-Funktionsproteine innerhalb der Promotoren der eigenen Gene an sogenannte „CArG-Boxen“ (siehe 1.5 und 3.2) und aktivieren so die Transkription (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992). Die für CArG-Boxen übliche Konsensussequenz konnte auch in der putativen Promotorsequenz von *GGM2* gefunden werden (Abb. 6). Ob *GGM2*-Protein an diesem im *GGM2*-Promotor identifizierten Sequenzmotiv binden kann, konnte aus zeitlichen Gründen noch nicht gezeigt werden. Allerdings bindet *GGM2*-Protein *in-vitro* an DNA-Fragmente, welche die Sequenz der „DEF-CArG-Box“ (siehe dazu 3.2) aufweisen (Weiser, 1999). Demnach ist auch eine *GGM2*-Bindung an den Promotor des eigenen Gens nicht unwahrscheinlich. Eventuell ist ein ähnlicher Autoregulationsmechanismus, wie von den B-Funktionsgenen der Angiospermen bekannt, auch in Gymnospermen etabliert. Ein zweites im *GGM2*-Promotor gefundenes CArG-Box-Motiv weicht um ein Nukleotid vom Konsensus ab. Innerhalb der AT-reichen Region befindet sich ein Guanin-Nukleotid (Abb. 6). Eine ähnlich abweichende CArG-Box wurde auch im *AP3*-Promotor festgestellt (Tilly *et al.*, 1998). Obwohl für dieses Sequenzmotiv, der „CArG2-Box“, Hinweise für eine Funktion während der Entwicklung der Petalen bestehen (siehe auch 3.8.2), konnte eine Bindung des *AP3/PI*-Heterodimerkomplexes an die „CArG2-Box“ nicht gezeigt werden (Tilly *et al.*, 1998). In der putativen Promotorsequenz von *GGM15* wurden zwei CArG-Box-Motive gefunden (Abb. 7), die dem Konsensus der „CArG1-Box“ des *AP3*-Promotors entsprechen (Tilly *et al.*, 1998). Auch diese Sequenzen weichen um ein Nukleotid vom Konsensus einer klassischen CArG-Box, wie z.B. der *SRE*-CArG-Box (Shore und Sharrocks, 1995) oder der „DEF-CArG-Box“ (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992), ab (Abb. 7). Die ähnlich abweichende „CArG1-Box“ des *AP3*-Promotors kann allerdings *in-vitro* als Bindestelle für den *AP3/PI*-Proteinkomplex dienen (Tilly *et al.*, 1998). Ein exakt dem Konsensus der klassischen CArG-Box entsprechendes Sequenzmotiv konnte innerhalb der zur Verfügung stehenden Sequenz des *GGM15*-Promotors nicht identifiziert werden. Allerdings zeigt auch die bisher untersuchte Promotorsequenz des *PI*-Gens keine CArG-Box-Konsensussequenz. Der auch für *PI* postulierte Autoregulationsmechanismus wird demnach indirekt ausgeführt (Honma und Goto, 2000). Ob die abweichenden CArG-Box-Motive im *GGM2*- und im *GGM15*-Promotor eine funktionelle Relevanz haben, sollte in Zukunft durch *in-vitro*-Bindestudien näher untersucht werden.



Diesen Daten bezüglich der Expression, der putativen regulatorischen Promotor-Elemente und den in 4.1 diskutierten phylogenetischen Zusammenhängen zur Folge wären *GGM2* und *GGM15* geeignete Modelle für das oben postulierte „Mikrosporophyllgen“, einem Vorläufer der floralen B-Funktionsgene. Ein ancestrales B/C-System, das Sporophylle durch die Expression eines *AG*-ähnlichen Gens wie *GGM3* etabliert und Mikrosporophylle durch die Expression von *DEF/GLO*-ähnlichen Genen wie *GGM2* und *GGM15* von Megasporophyllen differenziert, wäre demnach auch in Gymnospermen etabliert und war somit wahrscheinlich auch im letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Samenpflanzen vor 300 Millionen Jahren vorhanden.

#### 4.3 Modelle zur *GGM2*-Funktion im heterologen System *Arabidopsis thaliana*

Die ektopische Expression des *DEF/GLO*-ähnlichen *Gnetum*-Gens *GGM2* unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in der Angiospermen *Arabidopsis thaliana* bei wildtypischen Hintergrund führt zu deutlichen Veränderungen der Organentwicklung in den Blüten (siehe 3.5). Die Sepalen im ersten Wirtel solcher transgenen Pflanzen sind ungewöhnlich abgespreizt (Abb. 14), und die Form der Zellen an den äußeren Rändern der Sepalen gleicht der Zellform von Petalen (Abb. 15). Solche Veränderungen der Organe im ersten Blütenkreis sind auch bei einfacher Überexpression des endogenen *Arabidopsis*-B-Funktionsgens *PI* beobachtet worden (Krizek und Meyerowitz, 1996). Das Gynoeceum im vierten Wirtel 35S::*GGM2*-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen zeigte kaum ausgeprägte Fruchtklappen, eine Reduktion des stigmatischen Gewebes und eine Mischung von verschiedenen Zellformen, die einerseits typisch für Karpelle waren, andererseits den Zellformen der Filamente der Stamina ähnlich waren (Abb. 16). Überexpression des endogenen B-Funktionsgens *AP3* in *Arabidopsis* resultierte bei einigen Pflanzen in einer homöotischen Transformation der Karpelle des vierten Wirtels in Stamina (Jack *et al.*, 1994). Pflanzenlinien mit weniger starken Veränderungen zeigten jedoch ähnliche Phänotypen des Gynoeceums, wie für 35S::*GGM2*-Pflanzen beobachtet werden konnte (Jack *et al.*, 1994). Vollständige homöotische Transformationen der Organe des ersten und des vierten Wirtels erreichten Krizek und Meyerowitz (1996) durch gleichzeitige ektopische Expression beider endogenen B-Funktionsgene *AP3* und *PI*. Die Veränderungen im ersten Wirtel bei alleiniger Überexpression von *PI* wurde auf die wildtypische Expression von *AP3* auch im ersten Wirtel (Abb. 13) zurückgeführt. Somit

kann sich in solchen transgenen Pflanzen im ersten Wirtel der AP3/PI-Heterodimerkomplex bilden und dort die B-Funktion ausüben. *PI* wird in wildtypischen Pflanzen im zweiten und dritten aber auch im vierten Wirtel transkribiert, was somit die homöotischen Transformationen im vierten Blütenkreis transgener 35S::*AP3*-Pflanzen erklärt (Abb. 13).

Ektopisch exprimiertes *GGM2* kann in transgenen *Arabidopsis*-Blüten weder im ersten noch im vierten Wirtel eine vollständige homöotische Transformation der Organe erzeugen. Die beschriebenen phänotypischen Veränderungen zeigen jedoch Charakteristika von Teiltransformationen im ersten und im vierten Wirtel. Eine Erklärung für diese Teiltransformationen wäre eine Bindung von *GGM2*-Protein an autoregulative Promotorelemente der endogenen B-Funktionsgene, was eine ektopische Expression dieser Gene zu Folge hätte, wodurch dann die beobachteten Veränderungen im ersten und vierten Wirtel zu erklären wären. Damit wäre die Teiltransformation der Organe dieser Blütenkreise nicht durch *GGM2*-Protein allein sondern auch durch den AP3/PI-Proteinkomplex verursacht worden. Gegen eine solche Erklärung sprechen jedoch die in Abb. 19 dargestellten Expressionsanalysen. In transgenen Pflanzen, die ektopisch *GGM2* exprimieren, konnten im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen keine veränderten Expressionsmuster der endogenen B-Funktionsgene beobachtet werden (Abb. 19). Ein weiteres Argument gegen eine ektopische Aktivierung von *AP3* und *PI* durch *GGM2*-Protein ist aus den in 3.10 beschriebenen Experimenten zu erhalten. Homozygote B-Funktionsverlustmutanten (*ap3-3* und *pi-1*), die transgen für ein Konstrukt sind, das *GGM2* unter die Kontrolle des *AP3*-Promotors stellt (*AP3::GGM2*, siehe auch 2.9.4), zeigen keine Transkription des Transgens (Abb. 30 und 31). Heterozygot mutante Pflanzen (*AP3/ap3* bzw. *PI/pi*) mit gleichem Konstrukt hingegen exprimieren *GGM2* im zweiten und dritten Blütenkreis (Abb. 30 und 31). In heterozygoten Pflanzen ist demnach genügend AP3/PI-Protein vorhanden, um den Autoregulationsmechanismus des *AP3*-Promotors und damit auch die Expression des Transgens aufrecht zu erhalten. In homozygot mutanten Pflanzen fehlt der AP3/PI-Heterodimerkomplex. *GGM2*-Protein kann diesen B-Funktions-Proteinkomplex nach den in 3.10 dargestellten Ergebnissen bezüglich der Autoregulationsfunktion nicht ersetzen.

Eine alternative Deutung für die Teiltransformationen in 35S::*GGM2*-transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen wäre eine Heterodimerbildung aus *GGM2*-Protein und jeweils einem

der endogenen B-Funktionsproteine. Im ersten Wirtel der transgenen Pflanzen könnte ein GGM2/AP3-Proteinkomplex die Veränderung an den Sepalen bewirkt haben, während im vierten Wirtel ein GGM2/PI-Komplex die Teiltransformationen des Gynoeceums verursacht haben könnte. Außerdem könnten solche Heterodimere auch die Teilkomplementationen der B-Funktionsverlustmutanten *pi-1* und *ap3-3* durch ektoptisch exprimiertes *GGM2* (siehe 3.7 und 3.9) begründen. Pflanzen, die homozygot für die *pi-1*-Mutation sind, zeigen gewöhnlich keine Differenzierung der inneren Wirtel. Der vierte Wirtel ist im Durchmesser vergrößert und besteht aus mehr als nur zwei Karpellen. Blüten solcher Pflanzen weisen demnach eher drei als vier Wirtel auf (Abb. 21; Bowman *et al.*, 1989). Erst Pflanzen der schwächeren Allele (*pi-2* und *pi-3*) zeigen die gewohnte Aufteilung in vier Blütenkreise. Die Organe des dritten Wirtel solcher Pflanzen sind nicht fusionierten Karpellen oder den Filamenten der Stamina ähnlich (Bowman *et al.*, 1991). Sehr ähnliche Organe zeigen auch *pi-1*-Pflanzen, die *GGM2* ektoptisch exprimieren (Abb. 21 und 22). Der dritte Wirtel *GGM2* exprimierender *pi-1*-Pflanzen gleicht eher dem dritten Wirtel der schwächeren *pi-2* und *pi-3*-Allele (siehe 3.7.1). Pflanzen, die homozygot mutant für die *ap3-3*-Mutation sind und ektoptisch *GGM2* exprimieren, zeigen im dritten Blütenkreis ebenfalls, an Stelle der gewöhnlich in *ap3-3*-Pflanzen beobachteten Karpelle (Jack *et al.*, 1992), hauptsächlich filamentöse Organe, die den Filamenten von Stamina ähnlich sind (Abb. 27 und 28). Da Mutanten beider Gene durch *GGM2*-Expression Teilkomplementationen zeigen, müßte *GGM2*-Protein nach der oben beschriebenen Interpretation mit beiden endogenen B-Funktionsproteinen Heterodimere bilden können. Solche Komplexe könnten zudem auch die in Abb. 17 dargestellten Modifikationen der Blütenorgane im zweiten und dritten Wirtel 35S::*GGM2*-transgener *Arabidopsis*-Pflanzen erklären. Bei späteren Blüten der Infloreszenzen solcher transgener Pflanzen zeigen die Organe des zweiten und dritten Wirtels Veränderungen, die eher einer Störung statt einer Überexpression der B-Funktion ähnlich sind (Abb. 17). In solchen Blüten könnte *GGM2*-Protein durch Heterodimerbildung mit AP3- oder PI-Protein die Bildung des AP3/PI-Heterodimers verhindern. Die *GGM2*/AP3- bzw. *GGM2*/PI-Heterodimere wären möglicherweise nicht in der Lage den Heterodimerkomplex aus AP3 und PI vollständig zu substituieren, was in den beschriebenen Phänotypen (Abb. 17) resultieren könnte. Zudem wäre so zu verstehen, warum die in 3.5.1 beobachteten Veränderungen in transgenen Pflanzen mit wildtypischen Hintergrund keine vollständigen homöotischen Transformationen darstellen und weswegen die transgenen B-Funktionsmutanten nur Teilkomplementationen zeigen (siehe 3.7.1, 3.8.1 und 3.9.1). Durch *in-vitro*-Bindestudien

konnte allerdings festgestellt werden, daß GGM2-Protein als Homodimer an DNA binden kann (Weiser, 1999). Werden GGM2, AP3 und PI in solchen Experimenten gemeinsam translatiert, so gibt es nur Hinweise auf den AP3/PI-Heterodimerkomplex und einen GGM2-Homodimerkomplex (Weiser, 1999). Ob AP3- oder PI-Protein mit GGM2-Protein heterodimerisiert, wenn entweder jeweils AP3 oder PI nicht zur Verfügung steht, wenn sich also der möglicherweise sehr stabile AP3/PI-Komplex nicht bilden kann, geht aus diesen Experimenten nicht hervor. Die GGM2-Homodimere sind aber sehr wahrscheinlich deutlich stabiler als ein Heterodimer aus GGM2 und einem der beiden *Arabidopsis*-B-Funktionsproteine. Der B-Funktionsverlust-Phänotyp der in Abb. 17 dargestellten 35S::*GGM2*-Pflanzen und der in Abb. 25K gezeigten 35S::*GGM2*, *ap3-1*-Pflanzen bei permissiver Temperatur bedarf somit wahrscheinlich einer anderen Erklärung als der GGM2/AP3- bzw. GGM2/PI-Heterodimere. In diesen Geweben wird sich eher der AP3/PI-Heterodimerkomplex und der GGM2-Homodimerkomplex bilden, wie es auch in den oben beschriebenen *in-vitro*-Studien der Fall war. Alternativ könnten die im zweiten und dritten Wirtel beobachteten Veränderungen der 35S::*GGM2*-Pflanzen als Ko-Suppression verstanden werden. Solche Effekte beruhen auf besonders hoher Ähnlichkeit zwischen dem Transgen und der endogenen Gene (Matzke und Matzke, 1995). Die Ähnlichkeit von *GGM2* zu *AP3* und *PI* ist aber wohl zu gering (52 bzw. 54% Ähnlichkeit). Außerdem konnte zumindest ein auf Transkript-Ebene ablaufender Ko-Suppressionsmechanismus ausgeschlossen werden. Pflanzen, die transgen für ein 35S::*GGM2*-Konstrukt sind, welches ein Translationsstopkodon in der MADS-Box aufweist (Abb. 20D), können vollständige *GGM2*-Transkripte produzieren, die eine eventuell auf Transkript-Ebene basierende Ko-Suppression auslösen könnten. Jedoch stellen diese Pflanzen kein funktionsfähiges GGM2-Protein her. Solche Pflanzen zeigen keine phänotypischen Veränderungen zu wildtypischen Pflanzen. Auch Pflanzen, die transgen für 35S::*GGM2*-Derivate mit verkürztem oder vollständig fehlendem C-Terminus (Abb. 20B und C) sind, zeigen keinerlei morphologische Veränderungen gegenüber wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen (siehe 3.6). Diese Daten weisen eindeutig darauf hin, daß für die beobachteten Veränderungen in *GGM2* exprimierenden Pflanzen vollständiges GGM2-Protein notwendig ist.

Ein wahrscheinliches Modell für die diskutierten Veränderungen durch ektopische Expression von *GGM2* wäre demnach, daß GGM2-Protein als Homodimerkomplex an Promotoren von Zielgenen der endogenen B-Funktion binden kann, aber nicht alle dieser

Zielgene aktivieren kann. So könnte verstanden werden, weswegen es im ersten und zweiten Wirtel von 35S::*GGM2*-Pflanzen nicht zu vollständigen homöotischen Transformationen kommt, warum transgene B-Funktionsmutanten nur eine Teilkomplementation zeigen und warum im zweiten und dritten Wirtel die endogene B-Funktion der 35S::*GGM2*-Pflanzen gestört ist. Das durch den CaMV-35S-Promotor im Überfluß produzierte GGM2-Protein verdrängt möglicherweise im zweiten und dritten Wirtel den AP3/PI-Komplex von den Bindestellen der Promotoren der B-Funktions-Zielgene.

Da MADS-Domäne-Proteine nach jüngsten Erkenntnissen nicht unbedingt als Dimere sondern eher wahrscheinlich als ternäre Komplexe funktionieren (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Pelaz *et al.*, 2000), kann ebenso in Betracht gezogen werden, daß GGM2-Protein in ternären Komplexen, die in wildtypischen Pflanzen AP3- und PI-Protein enthalten, den Platz eines oder beider B-Funktionsproteine einnehmen kann. Im ersten Wirtel einer 35S::*GGM2*-Blüte könnte ein solcher ternärer Komplex aus einem AP1-Homodimer und einem GGM2-Homodimer bestehen. Im zweiten Wirtel würden möglicherweise GGM2-Homodimere mit AP3/PI-Heterodimeren konkurrieren um mit einem Heterodimer aus AP1- und SEPALATA-Protein (SEP-) (Pelaz *et al.*, 2000) einen Komplex zu bilden, während im dritten und vierten Wirtel solcher Blüten an Stelle des AP1-Proteins ein AG-Protein mit SEP-Protein und einem GGM2-Homodimer (oder im dritten Wirtel mit einem AP3/PI-Heterodimer) interagieren würde. Solche Proteinkomplexe könnten dann weiterhin einige Zielgene aktivieren, andere aber möglicherweise nicht. Für die Bildung von ternären Proteinkomplexen wurden dem C-Terminus von MADS-Domäne-Proteinen wichtige Funktionen zugeschrieben (Egea-Cortines *et al.*, 1999). Somit könnte auch verstanden werden, warum Pflanzen, die transgen für 35S::*GGM2*-Derivate mit verkürztem oder fehlendem C-Terminus sind (siehe 3.6), keine phänotypischen Veränderungen zeigen.

#### 4.4 Ein Modell zur Evolution der Blüte

Wie in vorangehenden Kapiteln ausführlicher diskutiert, existieren Orthologe der floralen homöotischen B- und C-Funktionsgene bereits in Gymnospermen wie Gnetophyten (Winter *et al.*, 1999), Koniferen (Mouradov *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 1998; Sundström *et al.*, 1999; Tandre *et al.*, 1995; 1998) und Ginkgo (Hasebe, 1999). Daraus kann man folgern, daß, wenn die Gymnospermen ein Monophylum bilden (Bowe *et al.*, 2000; Chaw

*et al.*, 2000; Goremykin *et al.*, 1996; Samigullin *et al.*, 1999; Soltis *et al.*, 1999b), Vorläufer solcher Gene bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren der rezenten Samenpflanzen vorhanden waren. Kandidaten für solche Vorfahren sind die fossil aus dem späten Devon (vor ca. 350 Millionen Jahren) bekannten „Progymnospermen“ (Beck und Wight, 1988). Abschätzungen, die auf „molekularen Uhren“ basieren, datieren die Genduplikationen, die zu den Genkladen geführt haben, zu denen auch die floralen B- und C-Funktionsgene gehören, auf eine Zeit vor mindestens 450 Millionen Jahren, was mit der ersten Besiedlung des Landes durch die Pflanzen koinzidiert (Lawton-Rauh *et al.*, 2000; Purugganan, 1997). Da bisher weder aus Moosen (K.Henschel und T. Münster, pers. Mitt.) noch aus Farnen (Münster *et al.*, 1997) MADS-Box-Gene dieser Genkladen isoliert werden konnten, ist es wahrscheinlicher, daß diese Genduplikationen zur Zeit der Entstehung der Samenpflanzen stattgefunden haben. Damit würde die Bildung der *DEF/GLO*- und der *AG*-ähnlichen Gene mit dem Übergang von der Homosporie der Farne zur Heterosporie der Samenpflanzen zusammenfallen. Ein B/C-System wie das der Gymnospermen (siehe 4.2), das durch die Expression eines basalen *DEF/GLO*-ähnlichen Gens wie *GGM2* männliche von weiblichen Sporophyllen differenziert, könnte die molekulare Ursache der Heterosporie der Samenpflanzen sein (Baum, 1998; Theißen *et al.*, 2000).

Heterologe Transformationsexperimente mit *AG*-ähnlichen Gymnospermengenen in *Arabidopsis thaliana* konnten zeigen, daß diese Gene möglicherweise die C-Funktionsgene der Blütenpflanzen teilweise substituieren, zumindest aber mit Elementen der Expressionsregulation des floralen Organidentitätsgens *AG* interagieren können (Rutledge *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998). Anders als in der hier vorliegenden Arbeit wurde dort leider nicht unterschieden, ob die beobachteten phänotypischen Effekte von unmittelbarer Wirkung des Transgens auf zahlreiche Zielgene stammen, oder lediglich endogenes *AG* aktivieren. Die in 3.5 bis 3.10 dargestellten und in 4.3 diskutierten Ergebnisse weisen hingegen darauf hin, daß das Genprodukt des *DEF/GLO*-ähnlichen Gymnospermengens *GGM2* den Heterodimerkomplex der *Arabidopsis* B-Funktionsproteine teilweise ersetzen kann und einige Zielgene der floralen B-Funktion aktivieren kann (siehe 4.3). Das legt den Schluß nahe, daß *GGM2* und möglicherweise auch die von Rutledge *et al.* und Tandre *et al.* (1998) untersuchten *AG*-ähnlichen Koniferengene jeweils Funktionen ausüben, die den Funktionen der floralen B- bzw. C-Funktionsgene im dritten und vierten Wirtel einer Angiospermenblüte grundsätzlich ähnlich sind. Der evolutionäre Schritt von den Reproduktionsorganen der Gymnospermen zu den reproduktiven Organen der Blütenpflanzen wäre demnach auf molekularer Ebene kleiner als der morphologische

Unterschied vortäuscht. Da die rezenten Gymnospermen grundsätzlich eingeschlechtliche Reproduktionsorgane zeigen, die Blüten der Angiospermen aber für gewöhnlich männliche und weibliche Organe an einer Achse aufweisen, stellt sich die Frage, ob die Vorfahren beider Linien ein- oder zweigeschlechtliche Sporophyllachsen besaßen. Der Übergang von einer eingeschlechtlichen zu einer zweigeschlechtlichen Sporophyllachse stellt allerdings nach dem in 3.2 postuliertem B/C-System keinen so großen evolutionären Schritt dar, wie die Diskussion von Eu- und Pseudanthienhypothese (siehe 1.1) erscheinen läßt. An einer grundsätzlich weiblichen Sporophyllachse könnten durch ektopische Expression eines „Mikrosporophyllgens“ wie *GGM2* an der Basis dieser Achse männliche Reproduktionsorgane ausgebildet werden. Ähnlich könnte die Expression dieses Gens an der Spitze einer grundsätzlich männlichen Sporophyllachse reduziert werden, was zur Bildung weiblicher Organe führen könnte. Ebenso einfach könnte aus einer grundsätzlich zweigeschlechtlichen Achse durch Ausweitung oder Reduktion der Expressionsdomäne eines „Mikrosporophyllgens“ eine männliche bzw. weibliche Sporophyllachse hervorgehen. Ein guter Hinweis für die Existenz eines solchen Systems sind Gymnospermen, die als Mutation anstelle der eingeschlechtlichen Achsen zweigeschlechtliche Achsen zeigen. Diese Mutation ist für Koniferen beobachtet worden (Fladung *et al.*, 1999).

Die weitere Diversifizierung der AG-ähnlichen Gene und der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene (und anderer hier nicht diskutierter MADS-Box-Genkladen) innerhalb der Linie, die zu den Angiospermen geführt hat, wie zum Beispiel die Genduplikation in *DEF*- und *GLO*-ähnliche Gene (siehe 4.1), war möglicherweise eine der molekularen Ursachen für die Entstehung weiterer typischer Merkmale der Angiospermenblüte. Die Petalen der Blütenpflanzen sind morphologischen Daten zur Folge mehrfach unabhängig von einander entstanden (Albert *et al.*, 1998). So sollen die Petalen der Aristolochiales, Piperales und Magnoliales von Brakteen, ähnlich den Sepalen abstammen, während sich die Petalen der Monokotylen, der Ranunculiden und der höheren Eudikotylen von den Stamina ableiten lassen sollen (Kramer *et al.*, 1998). Eine relativ einfache Hypothese schlägt eine Reduktion der Expressionsdomäne von C-Funktionsgenen in äußeren Mikrosporophyllwirteln oder aber eine Erweiterung der Expressionsdomäne von B-Funktionsgenen in Wirtel mit sterilen den Brakteen ähnlichen Organen vor (Baum und Whitlock, 1999). Daneben deutet die Verschiedenheit der Expressionsmuster von *DEF/GLO*-ähnlichen Genen innerhalb unterschiedlicher Spezies der Angiospermen auf mehrfache Abwandlungen der

Petalenentwicklung während der Evolution hin (Baum und Whitlock, 1999; Kramer und Irish, 1999).

Darwins „abscheuliches Geheimnis“ der Evolution der Angiospermenblüte ist sehr wahrscheinlich aus molekularer und entwicklungsbiologischer Sicht weit weniger geheimnisvoll.

#### 4.5 Ausblick auf weitere Experimente

Um die im vorigen Kapitel dargestellten Hypothesen näher zu analysieren, wäre es notwendig heterologe Transformationsexperimente auch mit *GGM15* durchzuführen. Dabei wäre es besonders wichtig eventuelle Unterschiede zu der Funktion von *GGM2* in *Arabidopsis thaliana* zu ermitteln. Solche Untersuchungen wurden bereits begonnen, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht vollständig beendet und ausgewertet werden. Hinweise auf mögliche Protein-Interaktionen zwischen *GGM2* und *GGM15* werden zur Zeit mit dem Hefe-2-Hybrid-System untersucht. Bisher konnten allerdings noch keine Hinweise auf solche Interaktionen gefunden werden.

Weitere Erkenntnisse über das postulierte B/C-System von *Gnetum gnemon* können, wie schon in 4.2 diskutiert, durch *in-vitro*-Bindestudien mit den putativen Promotorsequenzen von *GGM2* und *GGM15* untersucht werden. Gibt es Hinweise auf einen ähnlichen Autoregulationsmechanismus wie bei den B-Funktionsgenen der Angiospermen und ist eventuell auch die Transkription der *DEF/GLO*-ähnlichen Gymnospermengene durch Orthologe der *LFY*-ähnlichen Gene reguliert? Gelretardierungsexperimente könnten zeigen, ob *GGM2*- und *GGM15*-Proteine an die jeweiligen Promotoren der eigenen Gene binden können und ob *LFY*-Protein die Promotoren von *GGM2* und *GGM15* bindet.

Ein besseres Verständnis der Funktion *DEF/GLO*-ähnlicher Gene in Gymnospermen könnte insbesondere durch die Untersuchung der in 4.4 erwähnten Gymnospermenmutanten erhalten werden. Zeigen solche Mutanten mit zweigeschlechtlichen Sporophyllachsen abgewandelte Expressionsmuster der *DEF/GLO*-ähnlichen Gene? Finden sich dann im Promotorbereich dieser Gene Veränderungen zum Wildtyp, die solche Verschiebungen der Expressionsdomänen verursachen können?

Abschließend sollte auch die Ausweitung der Analyse von Orthologen der floralen Organidentitätsgene auf die basalen Blütenpflanzen der ANITA-Gruppe (siehe 1.1) weitere Erkenntnisse über die Evolution der Blüte erbringen.



## 5. Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, die Evolution der Angiospermenblüte als eine durch Veränderungen in homöotischen Kontrollgenen gelenkte Modifikation der Reproduktionseinheiten der Samenpflanzen zu verstehen. Dazu wurden Orthologe der floralen homöotischen B-Funktionsgene aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* charakterisiert.

Die Aktivität der B-Funktionsgene differenziert in eudikotylen Pflanzen nach dem klassischen ABC-Modell in den vegetativen Blütenkreisen Petalen von Sepalen und in den generativen Blütenkreisen Stamina von Karpellen. Alle bisher untersuchten B-Funktionsgene sind Mitglieder zweier definierter Schwestergenkladen der MADS-Box-Genfamilie, nämlich der *DEF*- und der *GLO*-ähnlichen Gene. Phylogenetische Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, daß die orthologen Gene der Gymnospermen eine basale Stellung zu der Genduplikation, die zu der *DEF*- und der *GLO*-Linie führt, einnehmen. Die Transkription des *DEF/GLO*-ähnlichen *Gnetum*-Gens *GGM2* beschränkt sich auf die Antherophoren der männlichen Reproduktionsorgane. Kein Transkript konnte in vegetativen Blättern und in den weiblichen Reproduktionsorganen nachgewiesen werden. Die ektopische Expression von *GGM2* in der eudikotylen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus führt zu Störungen der Blütenorganentwicklung aus denen eine spezifische Interaktion von *GGM2*-Protein mit Promotorbindestellen von Zielgenen der endogenen B-Funktionsproteine abgeleitet werden kann. Diese Interaktionen führen in wildtypischen Hintergrund sowie in B-Funktionsmutanten von *Arabidopsis* zu Teilsubstitutionen der endogenen B-Funktion, teilweise aber auch zu spezifischem Funktionsverlust der B-Funktion. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse läßt sich eine Funktion von *GGM2* in *Gnetum gnemon* postulieren, die der angiospermen B-Funktion in den generativen inneren Blütenkreisen sehr ähnlich ist, und die möglicherweise schon im letzten gemeinsamen Vorfahren aller rezenten Samenpflanzen existent war. Die Expression *DEF/GLO*-ähnlicher Gene unterscheidet wahrscheinlich in Gymnospermen sowie in Angiospermen Mikrosporophylle von Makrosporophyllen. Möglicherweise können durch relativ einfache Modifikation der Expressionsdomänen solcher Gene eingeschlechtliche Sporophyllachsen wie die der Gymnospermen zu zweigeschlechtlichen Sporophyllachsen ähnlich einer Angiospermenblüte evolvieren.

## 6. Abstract

For more than a century the evolutionary origin of the angiosperm flower has been enigmatic. Since changes in developmental programs lead to modifications of phenotypes, analyzing the evolution of floral developmental control genes may serve as a key for understanding flower origin.

According to the well-known ABC-model of angiosperm flower development, homeotic B-class genes are responsible (together with the A-class genes) for the organ identity of the petals and (together with the C-class genes) for the specification of the male sporophylls, the stamens. All known B-class genes belong to two well defined sister gene clades within the MADS-box gene family, namely the *DEF*- and the *GLO*-like genes. Phylogeny reconstructions revealed that the putative orthologs of *DEF/GLO*-like genes from gymnosperms are basal to the gene duplication leading to the *DEF*- and to the *GLO*-lineage. In the gymnosperm model plant *Gnetum gnemon* the *DEF/GLO*-like gene *GGM2* is expressed exclusively in the antherophores of male reproductive units. Constitutive expression of *GGM2* in transgenic *Arabidopsis thaliana* under the control of the 35S-promoter of the Cauliflower Mosaic Virus shows developmental alterations in flower organs. In transgenic plants with wildtype background as well as in B-function mutants of *Arabidopsis* the *GGM2* protein was able to partly substitute the endogenous B-function proteins.

Analyzing these data lead to the conclusion that *GGM2* function in *Gnetum* may be very similar to the floral homeotic B-function within the generative whorls of an angiosperm flower. Since this part of the B-function can be found in angiosperms as well as in gymnosperms, it might have been already present within the last common ancestor of all extant seed plants. The expression of *DEF/GLO*-like genes probably discriminates between male and female sporophylls in angiosperms as well as in gymnosperms. Simple modification of the expression patterns of these genes might have been served as the molecular key to evolve bisexual sporophyll axes (like in the angiosperm flowers) from unisexual axis (like in gymnosperm reproductive structures).

## 7. Literaturverzeichnis

- Albert, V.A., Gustafsson, M.H.G. und Di Laurenzio, L.** (1998), Ontogenetic Systematics, Molecular Developmental Genetics and the Angiosperm Petal, in Soltis, Soltis und Doyle (Hrsg.), *Molecular Systematics of Plants II*, Chapman and Hall, New York.
- Ambrose, B.A., Lerner, D.R., Ciceri, P., Padilla, C.M., Yanofsky, M.F. und Schmidt, R.J.** (2000). Molecular and Genetic Analyses of the *Silky1* Gene Reveal Conservation in Floral Organ Specification between Eudicots and Monocots. *Mol. Cell* **5**, 569-579.
- Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., Colombo, L. und van Tunen, A.J.** (1993). Petal and Stamen Formation in *Petunia* Is Regulated by the Homeotic Gene *FBP1*. *Plant Journal* **3**, 101-112.
- Arber, E.A.N. und Parkin, J.** (1907). On the Origin of Angiosperms. *J. Linn. Soc. Bot.* **38**, 29-80.
- Barnabas, S., Krishan, S. und Barnabas, J.** (1995). The Branching Pattern of Major Groups of Land Plants Inferred from Parsimony Analysis of Ribosomal RNA Sequences. *Biosci.* **20**, 259-272.
- Baum, D.A.** (1998). The Evolution of Plant Development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 79-86.
- Baum, D.A. und Whitlock, B.A.** (1999). Plant Development: Genetic Clues to Petal Evolution. *Curr. Biol.* **9**, R525-R527.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium* mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants. *CR Acad. Sci. Paris/Life Sciences* **316**, 1194-1199.
- Beck, C.B. und Wight, D.C.** (1988), Progymnosperms, in Beck (Hrsg), *Origin and Evolution of Gymnosperms*, Columbia University Press, New York.
- Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. und Theißen, G.** (im Druck). MADS-Box Gene Diversity in Seed Plants 300 Million Years Ago. *Mol. Biol. Evol.*
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. und Meyerowitz, E.M.** (1989). Genes Directing Flower Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **1**, 37-52.
- Bowe, L.M., Coat, G. und de Pamphillis C.W.** (2000). Phylogeny of Seed Plants Based on all three Geneomic Compartments: Extant Gymnosperms are Monophyletic and Gnetales' Closest Relatives are Conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4092-4097.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. und Meyerowitz, E.M.** (1991). Genetic Interactions Among Floral Homeotic Genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.

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

**Carlquist, S.** (1996). Wood, Bark, and Stem Anatomy of Gnetales: A Summary. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 58-76.

**Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y.-L., Kron, K.A., Rettig, J.H., Conti, E., Palmer, J.D., Manhart, J.R., Sytsma, K.J., Michaels, H.J., Kress, W.J., Karol, K.G., Clark, W.D., Hedren, M., Gaut, B.S., Jansen, R.K., Kim, K.-J., Wimpee, C.F., Smith, J.F., Furnier, G.R., Strauss, S.H., Xiang, Q.-Y., Plunkett, G.M., Soltis, P.S., Swensen, S.M., Williams, S.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Eguiarte, L.E., Golenberg, E., Learn, G.H., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Dayanandan, S. und Albert, V.A.** (1993). Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **80**, 528-580.

**Chaw, S.-M., Zharkikh, A., Sung, H.-M., Lau, T.-C. und Li, W.-H.** (1997). Molecular Phylogeny of Extant Gymnosperms and Seed Plant Evolution: Analysis of Nuclear 18S rRNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 56-78.

**Chaw, S.-M., Parkinson, C.L., Cheng, Y., Vincent, T.M. and Palmer, J.D.** (2000). Seed Plant Phylogeny Inferred from all Plant Genomes: Monophyly of Extant Gymnosperms and Origin of Gnetales from Conifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4086-4091.

**Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. und Drews, G.N.** (1999). The *Arabidopsis* *FLIAMENTOUS FLOWER* Gene is Required for Flower Formation. *Development* **126**, 2715-2726.

**Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987). Single-Step Method of RNA-Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

**Chuang, S.-E., Chen, A.-L. und Chao, C.-C.** (1995). Growth of *E. coli* at Low Temperature Dramatically Increases the Transformation Frequency by Electroporation. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1641.

**Chung, Y.Y., Kim, S.R., Kang, H.G., Noh, Y.S., Park, M.C., Finkel, D. und An, G.** (1995). Characterization of two Rice MADS Box Genes Homologous to *GLOBOSA*. *Plant Sci.* **109**, 45-56.

**Coen, E.S. und Meyerowitz, E.M.** (1991). The War of Whorls: Genetic Interactions Controlling Flower Development. *Nature* **353**, 31-37.

**Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., Went, J. van, Dons, H.J.M., Angenent, G.C. und Tunen, A.J. van** (1995). The Petunia MADS Box Gene *FBP11* Determines Ovule Identity. *The Plant Cell* **7**, 1859-1868.

**Crane, P.R., Friis, E.M. und Pedersen K.R** (1995). The Origin and Early Diversification of Angiosperms. *Nature* **374**, 27-33.

- Crane, P.R.** (1996). The Fossil History of the Gnetales. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 50-57.
- Crepet, W.L.** (1998). The Abominable Mystery. *Science* **282**, 1653-1654.
- Darwin, C.** in Darwin, F. und Seward, A.C. (Hrsg.) (1903). *More Letters of Charles Darwin: A Record of His Work in a Series of Hitherto Unpublished Letters, Vol. 2.* John Murray, London.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. und Sommer, H.** (1996). Multiple Interactions amongst Floral Homeotic MADS Box Proteins. *EMBO J.* **15**, 4330-4343.
- Davies, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H. und Schwarz-Sommer, Z.** (1999). *PLENA* and *FARINELLI*: Redundancy and Regulatory Interactions between two *Antirrhinum* MADS-Box Factors Controlling Flower Development. *EMBO J.* **18**, 4023-4034.
- DeBlock, M. und Debrouwer, D.** (1993). RNA-RNA *In Situ* Hybridization Using Digoxigenin-Labeled Probes: The Use of High-Molecular-Weight Polyvinyl Alcohol in the Alkaline Phosphatase Indoxyl-Nitroblue Tetrazolium Reaction. *Anal. Biochem.* **215**, 86-89.
- Devlin, P.F. und Kay, S.** (2000). Flower Arranging in *Arabidopsis*. *Science* **288**, 1600-1602.
- Donoghue, M.J. und Doyle, J.A.** Seed Plant Phylogeny: Demise of the Anthophyte Hypothesis? *Curr. Biol.* **10**, R106-R109.
- Doyle, J.A. und Donoghue, M.J.** (1992). Fossils and Seed Plant Phylogeny Reanalyzed. *Brittonia* **44**, 89-106.
- Doyle, J.A.** (1994). Origin of the Angiosperm Flower: A Phylogenetic Perspective. *Pl. Syst. Evol.* (Suppl.) **8**, 7-29.
- Doyle, J.A., Donoghue, M.J. und Zimmer, E.A.** (1994). Integration of Morphological and Ribosomal RNA Data on the Origin of Angiosperms. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **81**, 419-450.
- Doyle, J.A.** (1996). Seed Plant Phylogeny and the Relationships of Gnetales. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 3-39.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thomson, C.** (1991). A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1641.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H. und Sommer, H.** (1999). Ternary Complex Formation between the MADS-Box Proteins *SQUAMOSIA*, *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is Involved in the Control of Floral Architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**, 5370-5379.
- Endress, P.K.** (1996). Structure and Function of Female and Bisexual Organ Complexes in Gnetales. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 113-125.

- Endress, P.K.** Evolutionary Biology of Flowers: Prospects for the Next Century, in Iwatsuki und Raven (Hrsg.) (1997). *Evolution and Diversification of Land Plants*. Springer Verlag, Tokyo.
- Ferrandiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. und Yanofsky, M.F.** (2000). Redundant Regulation of Meristem Identity and Plant Architecture by *FRUITFULL*, *APRTALAI*, and *CAULIFLOWER*. *Development* **127**, 725-734.
- Fischer, A., Baum, N., Saedler, H. und 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**, 1901-1911.
- Fladung, M., Tusch, A., Markussen, T. und Ziegenhagen, B.** (1999). Analysis of Morphological Mutants in *Picea*. *Proc. BioFor'99*, Vitoria, Spanien.
- Friedman, W.E.** (1990). Double Fertilization in *Ephedra*, a Nonflowering Seed Plant: Its Bearing on the Origin of Angiosperms. *Science* **247**, 951-954.
- Friedman, W.E.** (1995). Organismal Duplication, Inclusive Fitness Theory, and Altruism: Understanding the Evolution of Endosperm and the Angiosperm Reproductive Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3913-3917.
- Friedman, W.E.** (1996). Introduction to Biology and Evolution of the Gnetales. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 1-2.
- Friedman, W.E. und Carmichael, J.S.** (1996). Double Fertilization in Gnetales: Implications for Understanding Reproductive Diversification among Seed Plants. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 77-94.
- Friedman, W.E.** (1998). The Evolution of Double Fertilization and Endosperm: An "Historical" Perspective. *Sex. Plant Reprod.* **11**, 6-16.
- Friis, E.M. und Endress, P.K.** (1996). Flower Evolution. *Progress in Bot.* **57**, 253-280.
- Friis, E.M., Crane P.R. und Pedersen, K.R.** Fossil History of Magnoliid Angiosperms, in Iwatsuki und Raven (Hrsg.) (1997). *Evolution and Diversification of Land Plants*. Springer Verlag, Tokyo.
- Frohlich, M.W.** (1999). MADS about Gnetales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8811-8813.
- Frohlich, M.W. und Meyerowitz, E.M.** (1997). The Search for Flower Homeotic Gene Homologs in Basal Angiosperms and Gnetales: A Potential New Source of Data on the Evolutionary Origin of Flowers. *Int. J. Plant Sci.* **158** (Suppl.), S131-S142.
- Frohlich, M.W. und Parker, D.S.** (2000). The Mostly Male Theory of Flower Origins: From Genes to Fossils. *Syst. Bot.* **25**, 155-170.

- Frohman, M.A., Dush, M.K. und 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.
- Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A. und Martin, W.** (1996). Noncoding Sequences from the Slowly Evolving Chloroplast Inverted Repeat in Addition to *rbcL* Data Do Not Support Gnetalean Affinities of Angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 383-396.
- Goto, K. und Meyerowitz, E.M.** (1994). Function and Regulation of the *Arabidopsis* Floral Homeotic Gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* **8**, 1548-1560.
- Hansen, A., Hansmann, S., Samigullin, T., Antonov, A. und Martin, W.** (1999). *Gnetum* and the Angiosperms: Molecular Evidence that Their Shared Morphological Characters Are Convergent Rather than Homologous. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1006-1009.
- Hasebe, M.** (1999). Evolution of Reproductive Organs in Land Plants. *J. Plant Res.* **112**, 463-474.
- Haughn, G.W., Schultz, E.A. und Martinez-Zapater, J.M.** (1995). The Regulation of Flowering in *Arabidopsis thaliana*: Meristems, Morphogenesis, and Mutants. *Can. J. Bot.* **73**, 959-981.
- Hill, T.A., Day, C.D., Zondlo, S.C., Thackeray, A.G. und Irish, V.F.** (1998). Discrete Spatial and temporal Cis-Acting Elements Regulate Transcription of the *Arabidopsis* Floral Homeotic Gene *APETALA3*. *Development* **125**, 1711-1721.
- Honma, T. und Goto, K.** (2000). The *Arabidopsis* Floral Homeotic Gene *PISTILLATA* is Regulated by Discrete *cis*-Elements Responsive to Induction and Maintenance Signals. *Development* **127**, 2021-2030.
- Hufford, L.** (1996). The Morphology and Evolution of Male Reproductive Structures of Gnetales. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 95-112.
- Irish, V.F.** (1999). Patterning the Flower. *Dev. Biol.* **209**, 211-220.
- Irish, V.F. und Yamamoto, Y.T.** (1995). Conservation of Floral Homeotic Gene Function between *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *The Plant Cell* **7**, 1635-1644.
- Jack, T., Brockman, L.L. und Meyerowitz, E.M.** (1992). The Homeotic Gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* Encodes a MADS Box and Is Expressed in Petals and Stamens. *Cell* **68**, 683-697.
- Jack, T., Fox, G.L. und Meyerowitz, E.M.** (1994). *Arabidopsis* Homeotic Gene *APETALA3* Ectopic Expression: Transcriptional and Posttranscriptional Regulation Determine Floral Organ Identity. *Cell* **76**, 703-716.
- Jackson, D.** (1991). *In Situ* Hybridization in Plants, in Bowles, Gurr und McPherson (Hrsg.), *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*, Oxford University Press, London.

- Joshi, C.P.** (1987). An Inspection of the Domain between Putative TATA Box and Translation Start Site in 79 Plants. *Nucl. Acids Res.* **15**, 6643-6653.
- Kenyon, C.** (1994). If Birds Can Fly, Why Can't We? Homeotic Genes and Evolution. *Cell* **78**, 175-180.
- Kramer, E.M., Dorit, R.L. und 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. und Irish, V.F.** (1999). Evolution of Genetic Mechanisms Controlling Petal Development. *Nature* **399**, 144-148.
- Krassilov, V.A.** (1991). The Origin of Angiosperms: New and Old Problems. *TREE* **6**, 215-220.
- Krizek, B.A. und Meyerowitz, E.M.** (1996). The *Arabidopsis* Homeotic Genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are Sufficient to Provide the B Class Organ Identity Function. *Development* **122**, 11-22.
- Kubitzki, K. (Hrsg.)** (1991). *The Families and Genera of Vascular Plants, Volume I Pteridophytes and Gymnosperms*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lawton-Rauh; A.L., Alvarez-Buylla, E.R. und Purugganan, M.D.** (2000). Molecular Evolution of Flower Development. *TREE*, **15**, 144-149.
- Lorow, D. und Jesse, J.** (1990). Max Efficiency DH10B: A Host for Cloning Methylated DNA. *Focus* **12**, 28-29.
- Lotsy, J.P.** (1911). *Vorträge über botanische Stammesgeschichte. Ein Lehrbuch der Pflanzensystematik, Band III, Cormophyta Siphonogamia*, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Ma, H.** (1994). The Unfolding Drama of Flower Development: Recent Results from Genetic and Molecular Analyses. *Genes and Development* **8**, 745-756.
- Ma, H. und de Pamphilis, C.** (2000). The ABCs of Floral Evolution. *Cell* **101**, 5-8.
- Martin, W., Gierl, A. und Saedler, H.** (1989). Molecular Evidence for Pre-Cretaceous Angiosperm Origins. *Nature* **339**
- Matzke, M.A. und Matzke, J.M.** (1995). How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes?. *Plant Physiol.* **107**, 679-685.
- McGinnis, W. und Krumlauf, R.** (1992). Homeobox Genes and Axial Patterning. *Cell* **68**, 283-302.
- Moon, Y.-H., Jung, J.-Y., Kang, H.-G. und An, G.** (1999). Identification of a Rice *APETALA3* Homologue by Yeast Two-Hybrid Screening. *Plant Mol. Biol.* **40**, 167-177.



- Mouradov, A., Glassick, T.V., Hamdorf, B.A., Murphy, L.C., Marla, S.S., Yang, Y., Teasdale, R.** (1998a). Family of MADS-Box Genes Expressed Early in Male and Female Reproductive Structures of Monterey pine. *Plant Physiol* **117**, 55-61.
- Mouradov, A., Glassick, T., Vivian-Smith, A. und Teasdale, R.** (1996). Isolation of a MADS Box Gene Family from *Pinus radiata* (PGR 96-002). *Plant Physiol.* **110**, 1047-1048.
- Mouradov, A., Hamdorf, B., Teasdale, R.D., Kim, J.T., Winter, K-U., Theißen, G.** (1999). A *DEF/GLO* Like MADS-Box Gene from a Gymnosperm: *Pinus radiata* Contains an Ortholog of Angiosperm B-Class Floral Homeotic Genes. *Dev Genet* **25**, 245-252.
- Münster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J.T., Martin, W., Saedler, H. und Theißen, G.** (1997). Floral Homeotic Genes Were Recruited from Homologous MADS-Box Genes Preexisting in the Common Ancestor of Ferns and Seed Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2415-2420.
- Muhammad, A.F. und Sattler, R.** (1982). Vessel Structure of *Gnetum* and the Origin of Angiosperms. *Amer. J. Bot.* **69**, 1004-1021.
- Nixon, K.C., Crepet, W.L., Stevenson, D. und Friis, E.M.** (1994). A Reevaluation of Seed Plant Phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **81**, 484-533.
- Ng, M. und Yanofsky, M.F.** (2000). Three Ways to Learn the ABCs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 47-52.
- Okamoto, H., Yano, A., Shiraishi, H., Okada, K. und Shimura, Y.** (1994). Genetic Complementation of a Floral Homeotic Mutation, *apetala3*, with an *Arabidopsis thaliana* Gene Homologous to *DEFICIENS* of *Antirrhinum majus*. *Plant Mol.Biol.* **26**, 465-472.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M., Lee, I. und Weigel, D.** (1998). A Genetic Framework for Floral Patterning. *Nature* **395**, 561-566.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. und Yanofsky, M.F.** (2000). B and C Floral Organ Identity Functions Require *SEPALLATA* MADS-Box Genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Price, R.A.** (1996). Systematics of the Gnetales: A Review of Morphological and Molecular Evidence. *Int. J. Plant Sci.* **157** (Suppl.), 40-49.
- Purugganan; M.D.** (1997). The MADS-Box Floral Homeotic Gene Lineages Predate the Origin of Seed Plants: Phylogenetic and Molecular Clock Estimates. *J. mol. Evol.* **45**, 392-396.
- Purugganan, M.D.** (1998). The Molecular Evolution of Olant Development. *BioEssays* **20**, 700-711.
- Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schmidt, R.J. und Yanofsky, M.F.** (1995). Molecular Evolution of Flower Development: Diversification of the Plant MADS-Box Regulatory Gene Family. *Genetics* **140**, 345-356.

- Purugganan, M.D. und Suddith, J.I.** (1998). Molecular Population Genetics of the *Arabidopsis* CAULIFLOWER Regulatory Gene: Nonneutral Evolution and Naturally Occurring Variation in Floral Homeotic Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8130-8134.
- Qiu, Y.-L., Lee, L., Bernasconi-Quadroni, D.E., Soltis, P.S., Soltis, M., Zanis, E.A., Zimmer, Z., Chen, Z., Savolainen, V. und Chase, M.W.** (1999). The Earliest Angiosperms: Evidence from Mitochondrial, Plastid and Nuclear Genomes. *Nature* **402**, 404-407.
- Regal, P.J.** (1977). Ecology and Evolution of Flowering Plant Dominance. *Science* **196**, 622-629.
- Riechmann, J.L., Krizek, B.A. und Meyerowitz, E.M.** (1996). Dimerization Specificity of *Arabidopsis* MADS Domain Homeotic Proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4793-4798.
- Riechmann, J.L. und Meyerowitz, E.M.** (1997). MADS Domain Proteins in Plant Development. *Biol. Chem.* **378**, 1079-1101.
- Riedl, R.** (1975). *Die Ordnung des Lebendigen. Systembedingungen der Evolution*, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Rogers, S.O. und Bedich, A.J.** (1988). Extraction of DNA from Plant Tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* **A6**, 1-10.
- Rutledge, R., Regan, S., Nicolas, O., Fobert, P., Coté, C., Bosnich, W., Kauffeldt, C., Sunohara, G., Séguin, A. und Stewart, D.** (1998). Characterization of an AGAMOUS Homologue from the Conifer Black Spruce (*Picea mariana*) that Produces Floral Homeotic Conversions when Expressed in *Arabidopsis*. *Plant J* **15**, 625-634.
- Sablowski, R.W.M. und Meyerowitz, E.M.** (1998). Temperature-Sensitive Splicing in the Floral Homeotic Mutant *apetala3-1*. *The Plant Cell* **10**, 1453-1463.
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987). The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, D.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. und Coupland, G.** (2000). Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science* **288**, 1613-1600.
- Samigullin, T.K., Martin, W., Troitsky, A.V. und Antonov, A.S.** (1999). Molecular Data from Chloroplast *rpoC1* Gene Suggest a Deep and Distinct Dichotomy of Contemporary Spermatophytes into Two Monophyla: Gymnosperms (Including Gnetales) and Angiosperms. *J. Mol. Evol.* **49**, 310-315.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. und Sommer, H.** (1990). Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**, 931-936.

- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P.J., Hansen, R., Tetens, F., Lönnig, W.E., Saedler, H. und Sommer, H.** (1992). Characterization of the *Antirrhinum* Floral Homeotic MADS-Box Gene *DEFICIENS*: Evidence for DNA Binding and Autoregulation of its Persistent Expression throughout Flower Development. *EMBO J* **11**, 251-263.
- Shore, P. und Sharrocks, A.D.** (1995). The MADS-Box Family of Transcription Factors. *Eur. J. Biochem.* **229**, 1-13.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. und Chase, M.W.** (1999a). Angiosperm Phylogeny Inferred from Multiple Genes as a Tool for Comparative Biology. *Nature* **402**, 402-404.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Wolf, P.G., Nickrent, D.L., Chaw, S.-M. und Chapman, R.L.** (1999b). The Phylogeny of Land Plants Inferred from 18S rDNA Sequences: Pushing the Limits of rDNA Signal? *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1774-1784.
- St Johnston, D. und Nüsslein-Volhard, C.** (1992). The Origin of Pattern and Polarity in the *Drosophila* Embryo. *Cell* **68**, 201-219.
- Summerton, J., Attkins, T. und Bestwick, R.** (1983). Rapid Methods of Preparation of Bacterial Plasmids. *Annal. Biochem.* **103**, 79.
- Sun, G., Dilcher, D.L., Zheng, S. und Zhou, Z.** (1998). In Search of the First Flower: A Jurassic Angiosperm *Archaeofructus*, from Northeast China. *Science* **282**, 1692-1694.
- Sundström, J., Carlsbecker, A., Svensson, M.E., Svenson, M., Urban, J., Theißen, G. und Engström, P.** (1999). MADS-Box Genes Active in Developing Pollen Cones of Norway Spruce (*Picea abies*) are Homologous to the B-Class Floral Homeotic Genes in Angiosperms. *Dev. Genet.* **25**, 253-266.
- Takaso, T. und Bouman, F.** (1986). Ovule and Seed Ontogeny in *Gnetum gnemon* L. *Bot. Mag. Tokyo* **99**, 241-266.
- Tandre, K., Albert, V.A., Sundås, A. und Engström, P.** (1995). Conifer Homologues to Genes that Control Floral Development in Angiosperms. *Plant Mol. Biol.* **27**, 69-78.
- Tandre, K., Svenson, M., Svensson, M.E. und Engström, P.** (1998). Conservation of Gene Structure and Activity in the Regulation of Reproductive Organ Development of Conifers and Angiosperms. *Plant J.* **15**, 615-623.
- Taylor, D.W. und Hickey, L.J.** Origin of the Angiosperm Flower, in Taylor und Hickey (Hrsg.) (1996). *Flowering Plant Origin, Evolution and Phylogeny*. Chapman und Hall, New York.
- Theißen, G.** (2000). Plant Breeding: *FLO*-Like Meristem Identity Genes: from Basic Science to Crop Plant Design. *Progress in Botany* **61**, 167-183.
- Theißen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.-U., und Saedler, H.** (2000). A Short History of MADS-Box Genes in Plants. *Plant Mol Biol* **42**, 115-149.

- Theißen, G., Kim, J.T. und Saedler, H.** (1996). Classification and Phylogeny of the MADS-Box Multigene Family Suggests Defined Roles of MADS-Box Gene Subfamilies in the Morphological Evolution of Eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **43**, 484-516.
- Theißen, G. und Saedler, H.** (1995). MADS-Box Genes in Plant Ontogeny and Phylogeny: Haeckel's 'Biogenetic Law' Revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 628-639.
- Theißen, G. und Saedler, H.** (1998). Molecular Architects of Body Plans. *Prog. Bot.* **59**, 227-256.
- Theißen, G. und Saedler, H.** (1999). The Golden Decade of Molecular Floral Development (1990-1999): A Cheerful Obituary. *Develop. Genetics* **25**, 181-193.
- Theißen, G., Strater, T., Fischer, A. und Saedler, H.** (1995). Structural Characterization, Chromosomal Localization and Phylogenetic Evaluation of two Pairs of *AGAMOUS*-Like MADS-Box Genes from Maize. *Gene* **156**, 155-166.
- Tilly, J.J., Allen, D.W. und Jack, T.** (1998). The CArG Boxes in the Promoter of the *Arabidopsis* Floral Organ Identity Gene *APETALA3* Mediate Diverse Regulator Effects. *Development* **125**, 1647-1657.
- Toepfer, R., Maas, C., Höricke-Grandpierre, C., Schell, J. und Steinbiss, H-H.** (1993). Expression Vectors for High-Level Gene Expression in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants. *Methods Enzymol* **217**, 66-78.
- Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönnig, W.E., Saedler, H., Sommer, H. und Schwarz-Sommer, Z.** (1992). *GLOBOSA*: A Homeotic Gene which Interacts with *DEFICIENS* in the Control of *Antirrhinum* Floral Organogenesis. *EMBO J* **11**, 4693-4704.
- Van der Krol, A.R., Brunelle, A., Tsuchimoto, S. und Chua, N.-H.** (1993). Functional Analysis of Petunia Floral Homeotic MADS Box Gene *PMADS1*. *Genes Develop.* **7**, 1214-1228.
- Van Larabeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R.A. und Schell, J.** (1974). Large Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* Essential for Crown Gall-Inducing Ability. *Nature* **252**, 169-170.
- Warburg, O.** (1913). *Die Pflanzenwelt*, Band I, Bibliographisches Institut, Leipzig.
- Weigel, D. und Meyerowitz, E.M.** (1994). The ABCs of Floral Homeotic Genes. *Cell* **78**, 203-209.
- Weiser, C.** (1999). *In-vitro* Bindestudien zweier MADS-Domäne Proteine der Gymnosperme *Gnetum gnemon*. Diplomarbeit, Universität Köln, Germany.
- Wettstein, R.** (1907). *Handbuch der systematischen Botanik*, Band II, Deuticke, Wien.
- Winter, K-U.** (1997). Charakterisierung von MADS-Box-Genen der Gymnosperme *Gnetum gnemon* L. Diplomarbeit, Universität Bonn.

**Winter, K-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. und Theißen, G.** (1999). MADS-Box Genes Reveal that Gnetophytes are more Closely Related to Conifers than to Flowering Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7342-7347.

**Wuketits, F.M.** (1988). *Evolutionstheorien: Historische Voraussetzungen, Positionen, Kritik*, Wiss. Buchgesellschaft, Darmstadt.

**Yanisch-Perran, Viera, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains – Nucleotide Sequence of M13, MP18 and PUC19 Vectors. *Gene* **33**, 103.

**Yi, Y. und Jack, T.** (1998). An Intragenetic Suppressor of the *Arabidopsis* Floral Organ Identity Mutant *apetala3-1* Functions by Suppressing Defects in Splicing. *The Plant Cell* **10**, 1465-1477.



-1750 -1700  
TTTTTCCTGTGGTTAATGAGGCTATATGCAAGACGAAATGTTGGCTCACCATGCATACCCATTATGTGAGCTCATGCACATGCATATCCATCACCATC

-1650 -1600  
ATTAGTCATGTTTAAATATTCGTGGGTCCTCAATAACAGGAACACTTGTTTAAATAAAAAATAAATTTTAAATTTCTTCCATCAAAATAGAAATAGT

-1550 -1500  
GGTTGAAGGTTCAAGTTTCTTTTATCTAATTTTACAAGGTTCAAGCCCTCTTTATCTATGTTTACCTACTCTTATGGACATATACTTAATTAATTTTTTT

-1450 -1400  
CGCAAAGCTAAGCTTAGGGTATGCATGATACGGGTACATGGGCTTTAAGGCGGAGACCATTCCAAAGGTTAAAATAAAAAATCATTATCCCTTAGCTGGT

-1350 -1300  
CATAAAATTTTATGACGGCGATGAATAATTTTTTCCGGAATTATGGAACATAATAAAAAATTTTGCAGCCTGATTCCTGAAATCGTTATCCGTTGG

-1250 -1200  
AGCCTGTGCATAAAGATCATTGGACTTAACCTAGAGATTAAAATCGTTAAAAAAGGAAAAGCGGCACAGCACGGGCATTGGTCTAGTGGTATGATTCTCG

-1150 -1100  
CTTAGGGTGCAGAGGTCCCGAGTTCAATTCTCGGAATGCCCTTCTCACAGCTTTTACGCCAGGTTGTCAAATATGGTCTTATAACCTCATTCAACAG

-1050 -1000  
TCAAATGTCATTATTGCACCTGCAAAGCAGAGTCCCATGCGCTCTATTTGAATCTTCTGAGATAGAATCATTGAATGCACGCATTTTTTATCCTAATAC

-950 -900  
CTGAATCCCACTCTGAATTGCTTATGTATGTATGTATGACAGTTTTCGCGGTGCCCAAAGAAACAACGATACATATCCATGAAATCATCAACCA

-850 -800 -772  
CATACTGTAAACGGACGGCTTCTGAAGTTAATCCCGATGTTAAATACAACCATCGTTGTGCTGACATTTGAGACCAACCTGGCTCCAGAAATGGAAAG

-750 -725 -700  
TTCCTTTAACAAATTCATACTCCATTCTCATATTTCCAAAAATGGAACTTCATCACTGAAAATGGTACGCTCTGCTATCTAATTTAAGTTCCCTTTAACAAA

-650 -600  
TTCATATTCATTTTTCATGGTCCACGGGAGCTACGGAACCCGGTGTGAATCAGTTACCGTATCCAAACAAGGAACGAACTGCCATTAACATCAACGT

-550 -500  
AGTGTGCTGTAATGAAAATAATGTGAGAGCTGATGGTTTATGGCAATATCACAGAGCAAAAGGCCAAAAATCATGTGTGAATTAACAGCAAATGAGTGG

-450 -400  
TCAGGATCAATGGGAGCAGAGGCTTAGAGCCCAATTCGTGTCAGAAATGACTAGCAGTCAACTTCATCTCCAAAGCAAGGATGTCTCATAACATGAGGT

-350 -324 -300  
TTGTTCCATGTAACAGAGCTGTGAGATCACAGCATTCCACTGTGGGCTACTGTTACAGGTCTGCCCAAAGGTGATAACCACCATTACACTATTTCTTAA

-250 -200  
AACATGATCAACCCAGTACATTTCTGATTTCTCAGAGATGCCCACTATAATGGACAACCTTGCCAACATTGACACGTGCCTCTTCTTACCCTCACTGCA

-150 -100 -77  
ACCTTCGTGTTCTAACCTTCTATGGTGTGCTATGGATCTCATATTTGTTGTTGGAGTTGCTGATTTTGGCATGGGTTTGAGCTATATATCAGTCCCATG

-50 -45 1 10 20 30 40  
GGTGATTCAGGTTTGATTGATTTTGGTGGCTGCTGCTTTAATTTGCATCTGGGAGGGCCATGGGCAGAGGAAAGATAGAGATGAAGAAGATAGAGAACA  
M G R G K I E M K K I E N

50 100 140  
CCAACAACAGGCAGGTTACGTTCTCCAAGAGGAGAAATGGACTCATGAAGAAAGCCCAAGAGCTGGCAGTGCCTCTGTGATGCAGAGGTTGGGTTTGATCAT  
T N N R Q V T F S K R R N G L M K K A Q E L A V L C D A E V G L I I

150 200 240  
CTTCTCCTCCACTGGCAAGCTTTTTCAATACTGCAACACCAGGTTTGGTTGTCTTTTCTTTGATTTTCACTCCCATTGTAGTTTGCATGAATTATT  
F S S T G K L F Q Y C N T

250 300 340  
TCTTGTGTCCGTAGCATCATCATTTATCATAAGTATTACATTGCGCTCTGACAAGAAATTAATTTTCATCATGATGTTTGAATCTTGGCTGAATTA

350 400 440  
CGTTGTCTTCTATCTGATTAGAATACCGTGAGCCAGTTTCAATCTTTGATTTGTATGTACCTGTGTATGTCAAAGTATGAGCCAGGTTCTAGAGAAA  
S M S Q V L E K

450 500 540  
TACCACAAGTCTCCAGGAGTGGATCATTGGGACATTGAGCTTCAAAGTAGGCTGCGCTGATCCTCAGTTTCTCAAATAATTAATAATCATACAATCCCGTG  
Y H K S P G V D H W D I E L Q

550 600 640  
AAATTTGCCCATTAATTTAAGTTTAACTAGTTTCAATCTCAGGCGCATGTTGTTGTTGGTATGTTTTTCTTTATTTTATTTCTCCATGAAACCAGAT  
I

650 700 740  
CATGGGGCAAGGCTCATCAAGAGAGAAGAGAGAACGAGAAGCTTCGCTCTAATTTGAGGTACAGGGCAACTAGAACTAGAAAAGTTGTGAATTCATAA  
M G Q E L I K E R R E N E K L R S K L R

```

750                               800                               840
TTGAGACAATTCTTTATTTTGCACTCTATAACCTTATGATAAGATCTGCAGGTATATGATGGGGGAAGACATTGGCGAACTAAAGATTGCACAGTTAGAA
                               Y M M G E D I G E L K I A Q L E

850                               900                               940
AAGCTTGAACATGATCTTTGAAAGTGCACCTCAGATTAGTCCGCCGGAAAAAGGTTCATTGACTCATTTCATTATCTCCAGACATATATCAGCTAATTGCTT
K L E H D L E S A L R L V R R K K

950                               1000                              1040
CTTATTGAGACATTTGCAAAAATTAACACGGCTTAGTTTGTGGCTGTATTCTATATAAAATTAAGCAGGATCACGCATGGGATTATCAAAGGACCATTCT
                               D H A W D Y Q R T I L

1050                              1100                              1140
TCTGAAGAAGGTAACCTTTTCTGTAAGTCTCAGAAGCAGGCTGCAGGCAGCGGTGTTTGTGCTAAATTCATGGAGTTGTCAAGCTAAATTAACAGT
L K K

1150                              1200                              1240
TTTCTTTTGAAATTCCTGACAAGCAGGTTAAGTTACAGTATGCCTTGCACGAGCAGATGAGCAGACAGGTATATTTTTCATTAGAATGCACCATCTTGCAG
V K L Q Y A L H E Q M S R Q

1250                              1300                              1340
GATCTATGTTTATTAGAAAGAAATCAACATAACTATATTAATAATATTATATCTGTTGAAATTCAGCTTACCGATGGAAGTTCTTGCAAAAGCTGAGGAAG
                               L P M E V L A K A E E

1350                              1400                              1440
AGGCTAGGCAGATTCTGGCGTCAACAGCTGAAGAAGAGGCTCGACAGAAATGACGTTTTCTTTTCTACCAAATGCATCAACGCAGTATGCCAGAATTGC
E A R Q I L A S T A E E E A R Q N M T F S F L P N A S T Q Y A R I A

1450                              1500                              1540
TTGAACAAGGCTAAGATAGTCAACAGCGAGGATGGTTCACATTATTATATTTATAACGTAGTCCCGTTAAAAATAAGATGGTGGTATTTATCTGTGGTG

1550                              1600                              1640
GAAGGAGCTAGTATTTAGCTCGCGTGCATATTTAAGAGATACTACTTTGGCAACACCAACGTGCCAGAAAATGAAAGAACCATTTCGTCCTAGAATCCCTT

1650                              1700                              1730
CCGGTAGGTACTTAGGAATTCATGTACGGAGCTTTAAACATAATTTTAACTAGATTGTCTGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

### 8.1.2 Die Sequenz von *GGM15*

```

-1900                               -1850
ATCTGAATCTTAGTAATAAGTAATAACATGTTTACTGAATTATTAATGCAATGCTTGGCATTGTCAATTTCTTTTTTAAAGGGTATTGGAGATACTAAT

-1800                               -1750
AGGGAAACAGGATAAGAAGTTAAGAGTTGATAATTGGAATGACTTTATATACACAGAATAAAAAAAAAAGAGTCTTGTATTTTTTTTGTTAGCTAA

-1700                               -1650
GTTGTAGCTAATTAATATTTTAGCAACAATTTCCACACCTCCTTGCTAGGGAGACTTTAAATCTCACTATCTAGGACTAAGGAGAATCATCAACTGTAAT

-1600                               -1550
GGCAATGCCTAGTCCATGAAAGTGAAAGGAAAAGTCAACGTATTTTCATTATTTTATGCTATAAAACAAAACCTAATAAAAGTTTTCAATATTTT

-1500                               -1450
TAAGAGTCTATTCTCTCTTTAAATAAATGCCAAAAAAATTTGGATCTTTTTTAAACCATTCTTATAAATAGTTTGTATTGTTTGACAATTTCC

-1400                               -1350                               -1331
CTCTTCTAGATAGAATCATATTTTATATGATTTTCATAGTCTCTAGTGACTTTGAGCTTTAATAAAAATCTAGTGTGTTTACATTCTTCAACAACCA

-1300                               -1250
TTGTTGATTGCTGTATTTTGCTATTTGAAAATATTTAAGAAAATGCAATTGAAGTTTTGTAAGACTCATACTGGATTTTTAAATTTTATTTTGAA

-1222                               -1200                               -1150
AATACTCCATTTTTCGCAGTTACTCTAAAGTACTTTGCCTCCTAGAATATCTAATATATTGTGTATTGTTAATAACATAGAGTATAAAGGGTGAACCTAG

-1100                               -1079                               -1050
TTCAGAACATTTAATGTAGCTAACATTCTTTGCCTAGAAAGAAGAAATCAATATTTGGAGGTGTCCTTTGGTCATAAAAACTGAAGCCACCTAATTT

-1000                               -950
GGATACTTATTGATGTCATTTAGAAGTGTCCCAATCTAATAAATCATTCTCCTTATAAATTAATTGTTAATCTTCGGAACACTGATTTCTTCTCCAC

-900                               -850
TTTTCTCATGTTCTAAAGAGCTTTGAGGATCCAGGAATCTTATTAGAATAATCTAGCATTAAAGTCAACACATATCAAATTTTTTCACTGAAAT

```





1600 1650 1671  
**TAATGGCAGCATCGGTATCGGCTGCTTATCACCGCGTTCAACCTACCCAGGAAATCTGGACGATGTGTGCTACCAACCACAACCCAATCTTCAGCTAAG**  
I M A A S V S A A Y H R V Q P Y P G N L D D V C Y Q P Q P N L Q L R

1700 1750 1771  
GTACATATCAATCTTAATCTCTTTTCGTCGTTAATTTAACCTGTTTAACTTCTCGCTGAATATGATACTGATTTTTTTTATTAAAAATTCAAATACGAA

1800 1850 1871  
TTAAAAAGTAGAAACATCCGTAGAAATGCATGCAGAATTAATGTTTTTAACTTTTAAAGAAAGAAATAAAATTGCAAGGCAAATCAGTGAAACCAGAAA

1900 1950 1971  
AATTCCTCTTTTAGTTTCTGAAAATTAACATGGTCACTGTGATGTAAATTACACGCTCTGTTTAAATTATTATGGAACCTGCTTGTCTTTTAGTTTTTAC

2000 2050 2071  
TACGATGCAACGCCATCTTAATCTAGTCGATATTTATGTGTGTTGTTCTGGTCTATAAACTTTGAAAGAAAAAAAAAAATACTGCATTTTCTCTATCCC

2100 2150 2171  
GAATTTGAGGCGTCAGCAAACCATCGATACCAAAGGATTTAACTTGATCAAGTATGTTTAGCTAGTTGGTATGAGCCGGCTGTAAGATGCTCTAGTGGA

2200 2250 2271  
ATTAATGTATAAGAGTCTTGGTTTTTTTCCAAGCTCTCATAATAAAGAACCAAAATTTCTTAAAAAGAATTCTGAAATGTTCCAAGAGATTTAAGGGT

2300 2350 2371  
GTTAGGGGAAGCAAAGGAAAAATTCAGTTTCAATTTTAAACCTAAAAATAAATCTTACTCAGGGATTTTATTAATTTGCAAAATAACAACCTGTGTTTCA

2400 2450 2471  
TGTGTTATATAAATCTGCAGGTTTTTGTAGTGTACTTCCAAGCATGCCTTAGCACAAGGCAGATGTATTTGCAAAACATTTACAAGTCTATGAATGGT  
F L

2500 2550 2571  
**TGCATGCCTTGTGAAACATCACCGTGCATGTGAAAAATTTAAGAGAACTTTGGATATTTACATGTTCTATTGAAGTATTTTATATGTAATATAC**

2600 2624  
**ACATCTCTGGCAATGATGTTTTTCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**

## 8.2 Oligonukleotide (*Primer*)

### 8.2.1 Genspezifische *Primer* für 5'-RACE-Experimente (2.9.3)

*GGM2*: SP1(*GGM2*) (5'-CTG GCA TAC TGC GTT GAT GC-3')  
 SP2(*GGM2*) (5'-GAA TCT GCC TAG CCT CTT CC-3')  
 SP3(*GGM2*) (5'-GGT CCT TTG ATA ATC CCA TGC-3')

*GGM3*: SP1(*GGM3*) (5'-GCT TCT ATC AGG TTT GCA TGC-3')  
 SP2(*GGM3*) (5'-CAT GTT TGC ATG CTG ATG GC-3')  
 SP3(*GGM3*) (5'-GTT TCT CAT TCC TTT TGG ATC G-3')

### 8.2.2 Spezifische *Primer* zur Amplifikation vollständiger cDNAs (2.9.3 und 3.1)

*GGM2*: *GGM2*total (5'-GGC TGC TGC TTT AAC TTG C-3')

*GGM3*: *GGM3*total (5'-CTC TCC AGC AGA CAA AGG-3')

### 8.2.3 *Primer* zur Einführung künstlicher Restriktions-Schnittstellen (2.9.4)

35S::*GGM2*: *GGM2*-Nco (5'-GAG GGC CAT GGG CAG AGG-3')  
*GGM2*-Bam (5'-GTG ACT GGA TCC TTG TTC AAG-3')

35S::*AP3*: *AP3*-Xho (5'-GAT TAA ACA AAC TCG AGA GAA TAT GGC G-3')  
*AP3*TAA-Xba (5'-CAG CTC TAG ATT ATT CAA GAA GAT GGA AGG  
 TAA TG-3')

*AP3*::*GGM2*: *ap3P*-17 (5'-AAG CTT CTT AAG AAT TAT AGT AG-3')  
*ap3P*-Nco (5'-CTA GCC ATG GTC TTC TCT CTT TG-3')

35S::*GGM2*-Derivate:

M(\*)IKC: MADS2Stop (5'-GGA CTC ATG ATT TAA ACC CAA GAG-3')

MIK(1/2)C: entspricht WG11 (Weiser, 1999)

MIK: entspricht WG3 (Weiser, 1999)

*EcoRI*-Schnittstellen in pRT100:

pRT3*Eco*: (5'-AGC TTG CAT GCC TGG AAT TCA CTG G-3')

pRT5*Eco*: (5'-TCC ATG GCG GCC GAA TTC TTG CAT G-3')

#### 8.2.4 Primer zur Amplifikation der Introns von *GGM2* und *GGM15* (2.9.5 und 3.2)

*GGM2*: Ex1UNI (5'-GAT CAT CTT CTC CAC TGG-3')  
 Ex4REV (5'-CAA TCT TTA GTT CGC CAA TGT C-3')  
 Ex4UNI (5'-GAA AGT GCA CTC AGA TTA GTC C-3')  
 Ex7REV (5'-GAA TCT GCC TAG CCT CTT CC-3')  
 Ex7UNI (5'-GGA AGA GGC TAG GCA GAT TC-3')  
 CKIMREV (5'-CAA GGA TTC TAG GAC GAA TG-3')

*GGM15*: InIuni (5'-GGA AAG GTA TGG GAA GGG-3')  
 InIIrev (5'-CTC TAT GAC ATC CCT CAC G-3')  
 InIIuni (5'-GAG GGA TGT CAT AGA GAG G-3')  
 InIVrev (5'-CGC ACT CTG GTA AGA GCC-3')  
 InIVuni (5'-GGC TCT TAC CAG AGT GCG-3')  
 InVIIrev (5'-CCG ATG CTG CCA TTA TTC C-3')  
 InVIIuni (5'-GGA ATA ATG GCA GCA TCG G-3')  
 InVIIrev (5'-CAT CAT TGC CAG AGA TGT G-3')

#### 8.2.5 Primer der RAGE-Experimente für *GGM2* und *GGM15* (2.9.6 und 3.2)

RAGE-Adapter: (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG  
 ACG GCC CGG GCT GGT-3')  
 (5'-PO<sub>4</sub>-ACC AGC CC-NH<sub>2</sub>-3')

Adapter-Primer: AP1 (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3')  
 AP2 (5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3')

#### Genspezifische Primer:

*GGM2*: G2RAGE1 (5'-CTG GAG ACT TGT GGT ATT TCT CTA GAA C-3')  
 G2RAGE2 (5'-GAA GAT GAT CAA ACC CAC CTC TGC ATC-3')

*GGM15*: G15RAGE1 (5'-CCT CAC GCT TTC TAT GGT GCA TTC GG-3')  
 G15RAGE2 (5'-GAG AGA AGA CGA TGA GAG CAA CCT GC-3')

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

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

Abb.	Abbildung
al.	alii
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine (Rinder-) Serum Albumin
Bsp.	Beispiel
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dieca	Natriumdiethyldithiocarbaminat
DIG	Digoxygenin
DMS	Dimethylsulfat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
p.A.	zur Analyse
PVP	Polyvenylpropylen
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminometan
U	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-P	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat

### 8.4 Nomenklatur

Wildtyp-Gen:	Großbuchstaben, kursiv	Bsp.: <i>GGM2</i>
Protein:	Großbuchstaben	Bsp.: GGM2
Mutante:	Kleinbuchstaben, kursiv	Bsp.: <i>ap3-1</i>

Englische und lateinische Begriffe und Bezeichnungen wurden mit kursiven Buchstaben geschrieben.

## Eidesstattliche Erklärung

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

### Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

**Becker, A., Winter, K.-U., Meyer, B., Saedler, H. und Theißen, G.** (im Druck). MADS-Box Gene Diversity in Seed Plants 300 Million Years Ago. *Mol. Biol. Evol.*

**Mouradov, A., Hamdorf, B., Teasdale, R.D., Kim, J.T., Winter, K.-U., Theißen, G.** (1999). A *DEF/GLO* Like MADS-Box Gene from a Gymnosperm: *Pinus radiata* Contains an Ortholog of Angiosperm B-Class Floral Homeotic Genes. *Dev. Genet.* **25**, 245-252.

**Theißen, G. Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.-U., und Saedler, H.** (2000). A Short History of MADS-Box Genes in Plants. *Plant. Mol. Biol.* **42**, 115-149.

**Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. und Theißen, G.** (1999). MADS-Box Genes Reveal that Gnetophytes are more Closely Related to Conifers than to Flowering Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7342-7347.

## **Danksagung**

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

Herrn Prof. Dr. Heinz Saedler danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die sehr guten Arbeitsbedingungen sowie für anregende und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz möchte ich für die Übernahme des Korreferates und für sein Interesse an dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Günter Theißen für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während der ganzen Arbeit. Ausdrücklich möchte ich mich für die wertvollen Anregungen und die humorvolle Unterstützung bedanken.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ein außerordentlich freundliches Arbeitsklima und für die ständige Hilfsbereitschaft danken.

Im besonderen möchte ich Annette Becker für eine besonders gute und einzigartig freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Auch Britta Grosardt gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit und ein besonders angenehmes Laborklima

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung des Institutes, die in jeder Hinsicht zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mir immer und in allen Belangen geholfen hat, und ganz liebevoller Dank an Susanne.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat das Projekt dieser Arbeit finanziell gefördert und somit erst ermöglicht.

## Lebenslauf

Name Kai-Uwe Winter  
Geburtstag 13.05.1971  
Geburtsort Herford  
Anschrift Parkgürtel 9  
50823 Köln

### Schulbildung

08/77 – 06/81 Grundschule Wasserfuhr in Bad Salzuflen  
08/81 – 06/91 Gymnasium im Schulzentrum Lohfeld in Bad Salzuflen  
Abschluß Abitur

### Zivildienst

07/91 – 10/92 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Bad Salzuflen

### Akademische Ausbildung

10/92 – 09/97 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
09/95 – 06/96 Auslandsaufenthalt an der University of East Anglia in Norwich, UK  
Teilnahme an *Third Year Courses* und *Third Year Research Project*  
*Tony Sims Award*  
02/97 – 09/97 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, Abteilung Molekulare Pflanzengenetik  
Thema: Charakterisierung von MADS-Box-Genen der Gymnosperme *Gnetum gnemon* L.  
30.09. 1997 Diplomvergabe  
Seit 10/97 Promotion am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, Abteilung Molekulare Pflanzengenetik  
Thema: Charakterisierung von Orthologen floraler homöotischer B-Funktionsgene der Gymnospermen *Gnetum gnemon* L.