

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung
von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos
Physcomitrella patens (Hedw.) B. S. G.**

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

vorgelegt von
Katrin Andrea Henschel
aus Reutlingen

Köln 2002

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: 15.07.2002

Für Thomas.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	MADS-Box-Gene in der Evolution der Landpflanzen	1
1.2	Das Laubmoos <i>Physcomitrella patens</i>	6
1.3	MADS-Box-Gene in <i>Physcomitrella patens</i>	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	12
2.2	Medien, Puffer und Lösungen	12
2.3	Biologisches Material	12
2.3.1	Bakterienstämme und Plasmidvektoren	12
2.3.2	Pflanzliche Nukleinsäuren	13
2.3.3	Pflanzenmaterial	13
2.4	Kultivierung von <i>Physcomitrella patens</i>	14
2.5	Transformation und Selektion von <i>Physcomitrella patens</i>	14
2.6	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.7	<i>In-planta</i> Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
2.8	Untersuchungen mittels Lupe	15
2.9	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	15
2.10	Isolierung von Nukleinsäuren	16
2.10.1	Isolierung von Plasmid-DNA	16
2.10.2	Isolierung von genomischer DNA	16
2.10.3	Isolierung von Gesamt-RNA	16
2.10.4	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA	16
2.11	Herstellung von cDNA-Pools	17
2.12	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gestützte Verfahren	17
2.12.1	Oligonukleotid-Primer	17
2.12.2	Standard-PCR	17
2.12.3	3'RACE-PCR	17
2.12.4	5'RACE-PCR	18
2.12.5	RT-PCR zur Expressionsanalyse	18
2.12.6	Genomische PCR	18
2.12.7	Genomische Linker PCR zur Amplifizierung putativer Promotorbereiche	19
2.12.8	Genomische Linker PCR zur Isolierung neuer MADS-Box-Gene	19

2.13	Sequenzierung von DNA	19
2.14	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	19
2.15	Southern- und Northern-Analysen	20
2.16	Computergestützte Sequenzanalyse	20
2.17	Accession-Nummern der <i>P. patens</i> MADS-Box-Gene	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Strukturelle Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos <i>Physcomitrella patens</i>	21
3.1.1	Isolierung einer vollständigen cDNA von <i>PPM1</i>	21
3.1.2	Isolierung des MADS-Box-Gens <i>PPM4</i> durch genomische Linker PCR	22
3.1.3	Einzelkopie-Gen-Nachweis von <i>PPM4</i> durch genomischen Southern-Blot	22
3.1.4	Sequenz- und Strukturvergleiche der <i>P. patens</i> MADS-Box-Gene	24
3.1.5	„Längere I-Domänen Hypothese“ versus „K-Domänen Insertions Hypothese“	27
3.1.6	Vergleich der Exon-Intron-Strukturen von MIKC ^c - und MIKC [*] -Typ Genen	28
3.1.7	Phylogenierekonstruktion der <i>P. patens</i> MADS-Box-Gene	31
3.1.8	Strukturanalyse der <i>P. patens</i> MIKC ^c -Typ Proteine	34
3.1.9	Abschätzung der MADS-Box-Gen-Anzahl im Genom von <i>P. patens</i>	36
3.1.10	Vorläufige Bestimmung der putativen Transkriptionsstarts von <i>PPM2</i> und <i>PPM3</i>	37
3.1.11	Analyse putativer Promotor-Bereiche von <i>PPM1</i> - <i>PPM4</i>	37
3.2	Funktionelle Charakterisierung der <i>Physcomitrella patens</i> MADS-Box-Gene	38
3.2.1	Untersuchungen zum Expressionsmuster von <i>PPM1</i> - <i>PPM4</i> im Wildtyp von <i>P. patens</i>	38
3.2.2	Herstellung von <i>PPM2</i> und <i>PPM3</i> knock-out Linien von <i>P. patens</i>	39
3.2.3	Molekulare Analyse der putativen <i>PPM3</i> knock-out Linien	40
3.2.4	Molekulare Analyse der putativen <i>PPM2</i> knock-out Linien	42
3.2.5	Untersuchung der <i>PPM2</i> -Expression in den <i>PPM2</i> knock-out Linien	43
3.2.6	Phänotypische Analyse der <i>PPM2</i> knock-out Linien	45
3.2.7	Überexpression von <i>PPM2</i> in <i>P. patens</i>	49
3.2.8	Expression von <i>PPM2</i> und <i>PPM3</i> im Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
3.2.9	Komplementationsversuch der <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutante <i>agamous</i> durch 35S:: <i>PPM2</i>	52

4	Diskussion	58
4.1	Isolierung der <i>Physcomitrella patens</i> MADS-Box-Gene <i>PPM1</i> und <i>PPM4</i>	58
4.2	In <i>P. patens</i> kommen zwei Klassen von MIKC-Typ MADS-Box-Genen vor	59
4.3	Verwandtschaftsverhältnisse der <i>P. patens</i> MADS-Box-Gene	61
4.4	Verbreitung der MIKC [*] -Typ Gene	63
4.5	Struktur des Vorläufer MIKC-Typ Gens	66
4.6	Komplexität der MADS-Box-Genfamilie in <i>P. patens</i>	66
4.7	Untersuchungen zum Expressionsmuster von <i>PPM1</i> - <i>PPM4</i>	68
4.8	Alternatives Spleißen und alternative Transkriptionsstarts von <i>PPM2</i>	69
4.9	Funktionelle Charakterisierung der <i>P. patens</i> MADS-Box-Gene in <i>Physcomitrella</i>	70
4.10	Funktionelle Charakterisierung der <i>P. patens</i> MADS-Box-Gene im heterologen Testsystem <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
5	Zusammenfassung	82
6	Abstract	84
7	Literaturverzeichnis	86
8	Anhang	99
8.1	Abkürzungsverzeichnis	99
8.2	Nomenklatur von Genen und Genprodukten	99
8.3	Alignment zur Phylogenierekonstruktion in Abbildung 6	100
8.4	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer und Adapter	104
8.5	Eidesstattliche Erklärung	105
8.6	Danksagung	106
8.7	Lebenslauf	107

1 Einleitung

1.1 MADS-Box-Gene in der Evolution der Landpflanzen

In der heutigen Zeit dürften die Hauptmuster der Landpflanzenevolution durch vergleichende morphologische und phylogenetische Studien aufgedeckt worden sein. Dennoch bleibt die Frage, wie die enorme Vielfalt an Grundbauplänen der Landpflanzen entstanden ist. Um die Prinzipien der Landpflanzenevolution aufzuklären, werden zahlreiche, vielversprechende Ansätze verfolgt. Einen davon bietet die evolutionäre Entwicklungsbiologie. Der Grundgedanke hierbei ist, daß eine enge Beziehung zwischen Entwicklungs- und Evolutionsprozessen besteht (Gilbert et al., 1996; Arthur, 2002). Durch Entwicklungsprozesse entstehen aus einer befruchteten Eizelle selbst die kompliziertesten Organismen in jeder Generation neu. Daher kann aus der Entstehung höherer Organismen abgeleitet werden, daß die Evolution der Form gleichzeitig auch mit einer Evolution von Entwicklungsprozessen einhergeht.

Als Ursache vieler Entwicklungsprozesse gilt die Ausprägung der genetischen Information, so daß Änderungen in Entwicklungs-Kontrollgenen eine Hauptursache für evolutionäre Änderungen der Form sein könnten (Theißen und Saedler, 1995; Gilbert et al., 1996; Theißen et al., 2000; Carroll et al., 2001; Davidson, 2001). So können viele Aspekte der Evolution pflanzlicher und tierischer Form wahrscheinlich durch die Analyse der Funktion und Phylogenie von Entwicklungs-Kontrollgenen aufgeklärt werden.

Anhand der bereits in den vergangenen Jahren entdeckten Entwicklungs-Kontrollgene von Pflanzen und Tieren wurde festgestellt, daß viele dieser Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren. Bei diesen Genen handelt es sich zumeist um Mitglieder von Multigenfamilien. In Hinsicht auf die Pflanzen stellte sich heraus, daß hier die Familie der MADS-Box-Gene sicher eine der wichtigsten Genfamilien für das Verständnis der wechselseitigen Beziehung von Entwicklung und Evolution sein dürfte (Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996; Hasebe und Banks, 1997; Hasebe, 1999; Theißen et al., 2000; Vergara-Silva et al., 2000). Diese kodiert für eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, deren Hauptmerkmal das Vorkommen einer hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne ist, der MADS-Domäne (Theißen et al., 1996; Theißen et al., 2000).

Als Transkriptionsfaktoren spielen die bislang bekannten MADS-Domänen-Proteine der Pflanzen, Tiere und Pilze eine wichtige Rolle bei der Signal-Transduktion und der Kontrolle von Entwicklungsprozessen (Schwarz-Sommer et al., 1990; Shore und Sharrocks, 1995; Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996). So gehören z.B. die homöotischen Organidentitätsgene zur Familie der MADS-Box-Gene, welche als Komponenten komplexer Gen-Netzwerke an der Ausbildung der Organidentität pflanzlicher Reproduktionseinheiten beteiligt sind. So wird z.B. die Blütenentwicklung zweikeimblättriger Pflanzen durch MADS-Box-Gene kontrolliert

(Schwarz-Sommer et al., 1990; Coen und Meyerowitz, 1991; Ma, 1994; Weigel und Meyerowitz, 1994; Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996; Theißen et al., 2000). Desweiteren sind Orthologe dieser Gene wahrscheinlich an der Blütenentwicklung einkeimblättriger Pflanzen beteiligt (Schmidt et al., 1993; Van Tunen et al., 1993; Theißen et al., 1995; Ambrose et al., 2000; Tzeng und Yang, 2001), sowie an der Ausprägung von Reproduktionseinheiten der Gymnospermen (Tandre et al., 1995; Winter et al., 1999; Shindo et al., 1999).

Die MADS-Box-Gene, die maßgeblich an der Ausbildung der Blütenorganidentität beteiligt sind, werden auch als florale Organidentitätsgene bezeichnet (Schwarz-Sommer et al., 1990; Weigel und Meyerowitz, 1994; Theißen und Saedler, 1999; Theißen, 2001b; Theißen und Saedler, 2001). Eine wesentliche Aufgabe der Transkriptionsfaktoren, die durch die Blüten-Organidentitätsgene kodiert werden, ist die Differenzierung der verschiedenen Blütenorgane. Dabei erfolgt die Ausbildung der charakteristischen Identität jedes Blütenorgans durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an regulatorische DNA-Sequenzen der „Zielgene“. Die Transkriptionsfaktoren aktivieren oder reprimieren diese Gene, je nach Anforderung für die Entwicklung des entsprechenden Blütenorgans. Diese Zielgene oder Gene weiter stromabwärts in der Signal-Transduktions-Kette, funktionieren dann als „Realisierungsgene“, indem sie Enzyme und Strukturproteine kodieren (Übersicht in: Theißen, 2001a; Soltis et al., 2002).

Exprimiert werden die Blüten-Organidentitätsgene generell in den Organen, deren Identität sie spezifizieren. So werden z.B. die A-, B- und C-Funktionsgene jeweils im ersten und zweiten, zweiten und dritten, oder dritten und vierten Wirtel der Blüte exprimiert. Auf diese Weise werden Sepalen, Petalen, Stamina und Karpelle mit ihrer charakteristischen Struktur an konservierter Position ausgeprägt (Weigel und Meyerowitz, 1994; Theißen und Saedler, 1999; Theißen, 2001a; Soltis et al., 2002). Allerdings enthält die Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana* alleine mehr als 80 verschiedene MADS-Box-Gene (Riechmann et al., 2000), von denen viele andere Prozesse als die Blütenentwicklung kontrollieren. So sind Mitglieder der MADS-Box-Genfamilie an der Frucht-, Blatt- und Wurzel-Entwicklung beteiligt (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Theißen et al., 2000; Liljgren et al., 2000). Ein Beispiel ist hierfür das MADS-Domänen-Protein JOINTLESS, welches in die Regulation des Fruchtfalls bei Tomaten involviert ist (Mao et al., 2000). Ebenfalls in Tomaten wurde kürzlich das Gen *RIN* entdeckt, ein MADS-Box-Gen, das die Reifung der Früchte reguliert (Vrebalov et al., 2002). Darüberhinaus ist das MADS-Box-Gen *ANRI* aus *Arabidopsis thaliana* ausschließlich in den Wurzeln exprimiert und das resultierende Genprodukt spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der NO_3^- -abhängigen Seitenwurzelverlängerung (Zhang und Forde, 1998).

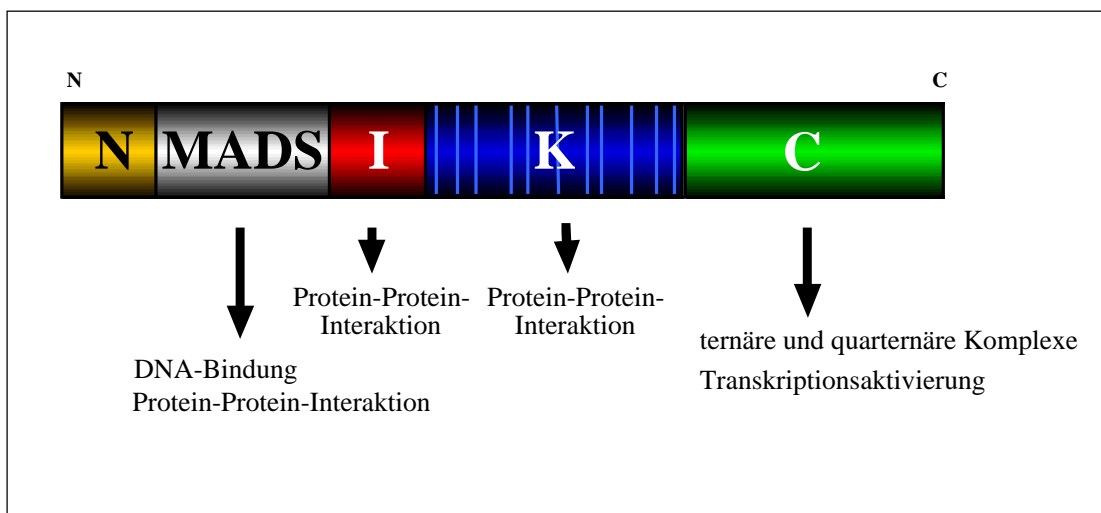


Abb. 1: Domänenstruktur der pflanzenspezifischen MIKC-Typ MADS-Domänen-Proteine. Die in nur wenigen MIKC-Typ MADS-Domänen-Proteinen vorkommende N-terminale Extension ist in gelb dargestellt, die MADS-Domäne in schwarz, die I-Region in rot, die K-Domäne in dunkelblau und die Positionen der konservierten hydrophoben AS der K-Domäne in hellblau. Die C-Region ist grün markiert. Bislang bekannte Funktionen der einzelnen Domänen sind ausgewiesen.

Neben einer ausführlichen Untersuchung der Funktion ist auch die Struktur vieler pflanzlicher MADS-Domänen-Proteine umfassend analysiert worden. Dabei ist festgestellt worden, daß sich die MADS-Domänen-Proteine durch eine modulartige Organisation auszeichnen, wie sie auch bei vielen anderen eukaryotischen Transkriptionsfaktoren zu finden ist. Fast alle gut charakterisierten pflanzlichen MADS-Domänen-Proteine entsprechen dem MIKC-Typ (Münster et al., 1997), da sie in vier definierte Bereiche unterteilt werden können, die MADS (M-), Intervening (I-), Keratin-ähnliche (K-) und C-terminale (C-) Domäne (siehe Abb. 1) (Ma et al., 1991; Purugganan et al., 1995; Theißen et al., 1996). In den meisten Fällen befindet sich die MADS-Domäne am N-terminalen Ende der putativen Proteine, obgleich bei einigen dieser pflanzlichen Proteine zusätzliche Bereiche N-terminal der MADS-Domäne liegen (siehe Abb. 1) (Yanofsky et al., 1990; Hasebe et al., 1998). Die MADS-Domäne besteht aus ca. 60 Aminosäuren und ist der am stärksten konservierte Bereich dieser Proteine (Purugganan et al., 1995). Über die MADS-Domäne erfolgt die DNA-Bindung und Protein-Dimerisierung (Shore und Sharrocks, 1995), wobei die DNA-Bindung an der sogenannten „CArG-Box“ stattfindet, die die Konsensus-Sequenz $CC(A/T)_6GG$ besitzt (Schwarz-Sommer et al., 1992; Davies und Schwarz-Sommer, 1994). Die der MADS-Domäne stromabwärts direkt folgende I-Region hat meistens eine Länge von etwa 30 Aminosäuren (siehe Abb. 1) und erstreckt sich in fast allen bislang bekannten MIKC-Typ MADS-Box-Genen über ein Exon. Innerhalb der pflanzlichen MADS-Domänen-Proteine sind sowohl Länge, als auch Primärstruktur dieser Region wenig konserviert (Purugganan et al., 1995; Ma et

al., 1991). Der I-Region kommen wahrscheinlich wesentliche selektive Funktionen bei der Dimerisierung von MADS-Domänen-Proteinen zu (Riechmann und Meyerowitz, 1997). Die K-Domäne konnte bislang nur bei pflanzlichen MIKC-Typ MADS-Domänen-Proteinen gefunden werden (Theißen und Saedler, 1995; Theißen et al., 1996) und ist charakterisiert durch ein konserviertes Muster an hydrophoben Aminosäuren (siehe Abb. 1). Die Positionen dieser Aminosäuren bedingen wahrscheinlich die Bildung einer amphipatischen Helix und über diese Helix-Strukturen wird die Dimerisierung gleichartiger Proteine ermöglicht (Davies und Schwarz-Sommer, 1994; Ma, 1994; Shore und Sharrocks, 1995). Der in Struktur und Länge am wenigsten konservierte Bereich ist die C-Region am C-terminalen Protein-Ende (siehe Abb. 1). Diese Region ist involviert in die Transkriptions-Aktivierung, sowie in die Ausbildung ternärer und quarternärer Proteinkomplexe (Riechmann und Meyerowitz, 1997; Egea-Cortines et al., 1999; Honma und Goto, 2001; Theißen et al., 2000; Theißen und Saedler, 2001; Theißen, 2001b).

Da wesentliche Aspekte der Pflanzenentwicklung durch die Funktionen der MADS-Domänen-Proteine gesteuert werden, könnte auch die Evolution der Pflanzen-Morphologie deutlich besser verstanden werden, wenn die Phylogenie der MADS-Box-Gene aufgeklärt ist. So kann z.B. der Ursprung der Blüte sicher nur im Kontext mit der MADS-Box-Gen Phylogenie verstanden werden, da die Blütenorgan-Identität vollkommen von der Aktivität einiger weniger MADS-Domänen-Proteine abhängt (Winter et al., 1999; Theißen et al., 2000). Entsprechendes gilt auch für mehr ursprüngliche Strukturen, wie z.B. Mega- oder Mikrosporophylle, oder aber auch für vegetative Organe. Um die Phylogenie der Landpflanzen zu verstehen, müssen MADS-Box-Gene aus allen Gruppen der Landpflanzen (Embryophyten) isoliert und hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion verglichen werden. Darunter sollten Vertreter phylogenetisch informativer Arten sein, z.B. Vertreter der Algen, Moose, Farne und Gymnospermen. Durch eine Rekonstruktion der Phylogenie der MADS-Box-Gene könnte dann möglicherweise die Frage beantwortet werden, zu welchem Zeitpunkt und wie die Entwicklungs-Kontrollgene der Samenpflanzen während der Evolution entstanden sind. Ferner könnte so auch die Evolution der Blütenorgane besser verstanden werden (Theißen und Saedler, 1995).

Im Rahmen der bisherigen Phylogenierekonstruktion der MADS-Box-Gene wurden die Sequenzen der bislang isolierten MADS-Box-Gene und -Genprodukte verglichen und anhand dessen mehrere Subfamilien definiert (Doyle, 1994; Purugganan et al., 1995; Theißen et al., 1996; Münster et al., 1997). Dabei konnte festgestellt werden, daß die meisten Mitglieder einer Subfamilie hochverwandte Funktionen innehaben, sowie ähnliche Expressionsmuster besitzen (Theißen et al., 1996; Theißen et al., 2000). Bei der Isolierung mehrerer Gene aus derselben Subfamilie wird zwischen orthologen und paralogen Genen unterschieden. Um Orthologe, die durch Speziation entstanden sind, handelt es sich zumeist, wenn die Subfamilienmitglieder aus verschiedenen Arten isoliert worden sind. Dagegen handelt es sich immer um paraloge Gene, die

erst relativ rezent durch Genduplikation entstanden sind, wenn Subfamilienmitglieder aus derselben Spezies isoliert wurden (Theißen und Saedler, 1995).

Bislang wurde davon ausgegangen, daß zwei der MADS-Box-Gen Subfamilien (*ARG80*- und *MEF2*-ähnliche Gene) nur in Tieren und Pilzen vorkommen (Übersicht in: Theißen et al., 1996), wobei die MIKC-Typ MADS-Box-Gene der Pflanzen und die *MEF2*-ähnlichen Gene wahrscheinlich von einem gemeinsamen Vorläufer-Gen abstammen (Theißen et al., 1996; Alvarez-Buylla et al., 2000b). Die MIKC-Typ Gene bilden zusammen mit den *MEF2*-ähnlichen Genen den sogenannten TypII der MADS-Box-Gene (Alvarez-Buylla et al., 2000b). Dagegen werden die *ARG80*- und *SRF*-ähnlichen Gene als TypI MADS-Box-Gene bezeichnet (Alvarez-Buylla et al., 2000b). Kürzlich berichteten Alvarez-Buylla und Mitarbeiter (2000b) vom Vorkommen *SRF*-ähnlicher Gene in *A. thaliana*. Allerdings konnten TypI-Gene, mit Ausnahme von *AGL39*, bislang nur auf Ebene der genomischen Sequenzen isoliert werden, so daß unklar ist, ob diesen Genen tatsächlich eine Funktion zukommt, oder ob es sich hierbei um Pseudogene handelt (Alvarez-Buylla et al., 2000b).

Die Familie der MADS-Box-Gene muß älter als eine Milliarde Jahre sein, da die MADS-Box-Gene der Pflanzen, Tiere und Pilze von einem gemeinsamen Vorläufer-Gen abstammen und sich zu dieser Zeit die Trennung der Pflanzen von den Tieren und Pilzen vollzog (Theißen et al., 1996). Bislang ist jedoch nicht bekannt, wann in der Evolution die MIKC-Typ Gene der Pflanzen, sowie die pflanzenspezifischen Subfamilien der MADS-Box-Gene entstanden sind, bzw. welche Funktionen sie innehatten, bevor sie in die Ausbildung der Blüten-Architektur involviert wurden (Münster et al., 1997).

Im Rahmen der bislang erfolgten evolutionären Studien von Transkriptionsfaktoren aus der Familie der MADS-Box-Gene stellte sich die Frage, ob Orthologe der aus Samenpflanzen bekannten MADS-Box-Gene auch in Nicht-Samenpflanzen vorkommen, so z.B. in den Farnen. Bei den Farnen handelt es sich um die nächsten Verwandten der Samenpflanzen, die aber noch keine Blüten-ähnlichen Organe besitzen. Daher stellen die Farne in Hinsicht auf dieses Problem eine phylogenetisch interessante Gruppe dar. Durch die Isolierung von etwa 15 MADS-Box-Genen aus den Farnen *Ceratopteris richardii*, *Ceratopteris pteridoides* und *Ophioglossum pedunculatum* (Münster et al., 1997; Kofuji und Yamaguchi, 1997; Hasebe et al., 1998; Theißen et al., 2000) konnte gezeigt werden, daß die für Pflanzen spezifischen MADS-Box-Gene vom MIKC-Typ bereits vor mehr als 400 Millionen Jahren existierten, da sich hier die Trennung der Linien, die zu Farnen und Samenpflanzen führten, vollzog (Münster et al., 1997). Allerdings handelt es sich bei allen untersuchten Genen zwar um Homologe, nicht aber um Orthologe der aus Samenpflanzen bekannten MADS-Box-Gene.

Aus der putativen Abwesenheit von Orthologen der aus Samenpflanzen isolierten MADS-Box-Gene in Farnen wurde geschlossen, daß wahrscheinlich auch der letzte gemeinsame Vorläufer der

rezenten Farne und Samenpflanzen noch keine Orthologen der floralen homöotischen Gene besessen hat (Theißen et al., 2000). Unter der Annahme, daß Orthologe der Blüten-Organidentitätsgene dennoch bereits im letzten gemeinsamen Vorläufer der Farne und Samenpflanzen vorkamen, müßten sie entweder nahe der Basis der Linie, die zu den heutigen Farnen führte, verloren gegangen sein, oder aber sie müßten in den heutigen Farnen existieren, aber bislang noch nicht gefunden worden sein (Hasebe, 1999).

Dadurch, daß bei Phylogeniekonstruktionen die MADS-Box-Gene der Farne nicht monophyletisch sind, muß vermutet werden, daß der letzte gemeinsame Vorläufer von Farnen und Samenpflanzen schon mindestens zwei verschiedene MIKC-Typ MADS-Box-Gene besessen hat (Münster et al., 1997; Hasebe et al., 1998; Theißen et al., 2000). Im Gegensatz zu den homöotischen Organidentitätsgenen der Samenpflanzen, die sich durch hochspezifische Expressionsmuster und Funktionen auszeichnen, hatten diese Gene wahrscheinlich eher ubiquitäre Expressionsmuster und Funktionen gehabt. Dies wird durch die vornehmlich ubiquitären Expressionsmuster der MADS-Box-Gene rezenter Farne nahegelegt.

Dadurch, daß keine klare Orthologie-Beziehung der MADS-Box-Gene aus Farnen zu den homöotischen Genen der Samenpflanzen existiert, ergeben sich keine Anhaltspunkte in Bezug auf die Funktionen dieser Gene. Versuche diese Genfunktionen aufzuklären scheiterten bislang, da kein System zur Transformation von Farnen existiert. Und da diese Gene darüberhinaus mehrheitlich ubiquitär exprimiert werden, war es nicht möglich, aus dem Expressionsmuster spezifische Hinweise hinsichtlich ihrer Funktionen zu erlangen.

Es ist daher interessant, welche Arten von MADS-Box-Genen in anderen Nicht-Samenpflanzen vorkommen, die die Möglichkeit zur funktionellen Analyse dieser Gene bieten. Ein solches Modellsystem zum Studium von Genfunktionen stellt das Moos *Physcomitrella patens* dar (Schaefer und Zryd, 1997; Cove, 2000; Schaefer, 2001; Schaefer und Zryd, 2001; Puchta, 2002).

1.2 Das Laubmoos *Physcomitrella patens*

Im Gegensatz zu den Farnen und Samenpflanzen, die zur Gruppe der Kormophyten gehören, handelt es sich bei den Moosen (Bryophyta), um kleine Landpflanzen aus der Gruppe der Thallophyten. Zu den rezenten Moosen gehören die Lebermoose, Hornmoose und Laubmoose, wobei die Moose wahrscheinlich keine monophyletische Gruppe darstellen. Es konnte jedoch bislang nicht geklärt werden, welche der Moos-Linien die ursprünglichste ist (Qiu und Palmer, 1999; Nickrent et al., 2000). Relativ weit verbreitet ist die Meinung, daß die Lebermoose als erste von der Linie abzweigten, die zu den Landpflanzen führt, wohingegen andere Studien die Hornmoose als älteste Landpflanzen sehen, mit Laubmoosen und Lebermoosen gemeinsam als zweitältester Linie (Kenrick und Crane, 1997; Nishiyama und Kato, 1999; Nickrent et al., 2000).

Während viele Lebermoose noch eine sehr einfache Organisation aufweisen, gehen vor allem die Laubmoose (Musci) schon erheblich über eine thallose Organisation hinaus. Viele ihrer Organisationsmerkmale, wie etwa die Gliederung in Stämmchen und Blättchen, leiten bereits zu den Kormophyten über, obwohl diese Organe noch viel einfacher gebaut sind, als z.B. Sproßachsen und Blätter der Kormophyten (Reski, 1998).

Einer der größten Unterschiede zwischen den Moosen und den höheren Pflanzen besteht darin, daß bei Moosen während der meisten Zeit des Lebenszyklus in den Zellen ein einfacher Chromosomensatz vorliegt (siehe Abb. 2a), wohingegen der haploide Gametophyt bei den Farnen und Samenpflanzen weitgehend reduziert ist. Dennoch unterliegen sowohl Moose, als auch Farne und Samenpflanzen, in ihrer Entwicklung einem Generationswechsel, der stets mit einem Kernphasenwechsel verbunden ist. Demnach wechseln sich eine haploide, gametenbildende Generation (Gametophyt) und eine diploide, sporenbildende Generation (Sporophyt) ab (siehe Abb. 2a).

Bei Anzucht von *Physcomitrella patens* unter Laborbedingungen auf Minimal-Medium erfolgt die Sporen-Keimung nach etwa ein bis drei Tagen. In der Ontogenie der Laubmoose führt das Auskeimen der haploiden Meiosporen zu einem sich verzweigenden Zellfaden, dem primären Chloronema. Dieses zeichnet sich durch apikales Spitzenwachstum, senkrechte Querwände und eine große Anzahl an Chloroplasten aus. Durch eine Zunahme an Licht und einer Erhöhung der Konzentration des Phytohormons Auxin geht das primäre Chloronema nach etwa sieben Tagen in Caulonema über, wobei dieser Übergang fließend ist. Auch das Caulonema-Wachstum erfolgt durch Spitzenwachstum. Die Zellen des Caulonemas sind länger und auch dicker als die Zellen des primären Chloronemas. Die Caulonema-Zellen haben schräggehende Querwände, wenige Chloroplasten und zeichnen sich durch eine leicht rötliche Färbung aus. Chloronema und Caulonema zusammen machen den Vorkeim aus, das Protonema (siehe Abb. 2a und b) (Ashton et al., 1979; Schumaker und Dietrich, 1997; Schumaker und Dietrich, 1998).

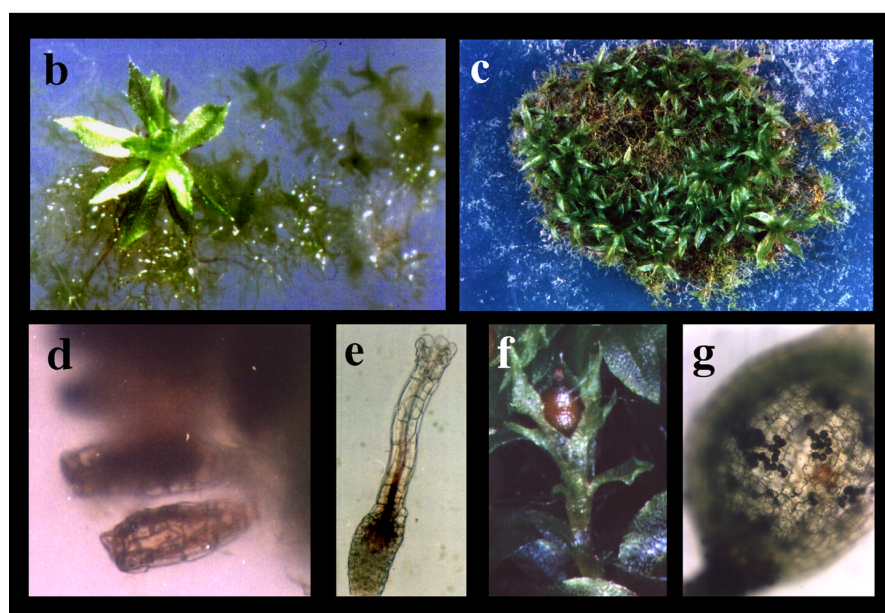
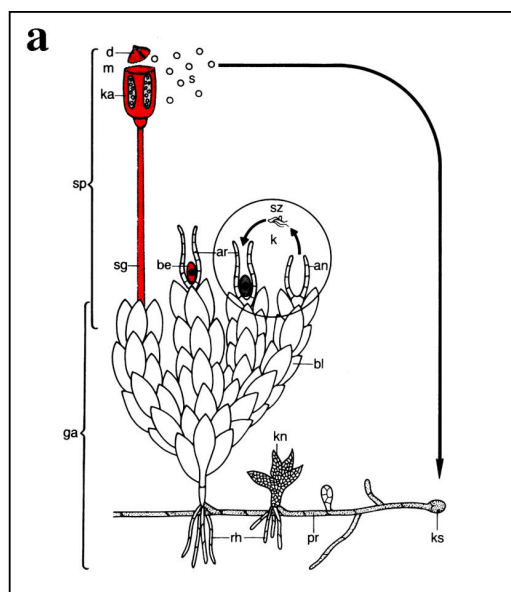


Abb. 2: (a) Schematische Darstellung des Lebenszyklus der Laubmoose nach Nultsch (1991). Haploide Phase schwarz, diploide Phase rot. Die Abkürzungen bedeuten: an, Antheridium; ar, Archegonium; be, befruchtete Eizelle (Zygote); bl, Blättchen; d, Deckel; ga, Gametophyt; k, Kopulation; ka, Sporenkapsel; kn, Knospe am Protonema; ks, keimende Meiospore; m, Meiosis; pr, Protonema; rh, Rhizoid; s, Meiospore; sg, Sporogon; sp, Sporophyt; sz, Spermatozoid; 2 (b-g) Verschiedene Stadien aus dem Lebenszyklus des Laubmooses *Physcomitrella patens*: (b) filamentöses Protonema mit einem jungen Gametophoren; (c) Gruppe haploider Gametophoren, die aus dem filamentösen Protonema herauswachsen; (d) männliche Gametangien (Antheridien); (e) weibliches Gametangium (Archegonium); (f) Gametophor mit Sporophyt; (g) nahezu leere Sporenkapsel mit einigen wenigen haploiden Meiosporen, die im Inneren zurückgeblieben sind.

An der zweiten subapikalen Zelle des Caulonema-Fadens entsteht nahe der apikalen Querwand eine Ausbuchtung, die durch eine inäquale Zellteilung zu einer eigenen Zelle wird, der Initialzelle. Aus dieser Zelle entwickelt sich in Abwesenheit des Phytohormons Cytokinin das sekundäre Chloronema, ein neuer seitlicher Zellfaden (Seitenast), durch den der filamentöse Wachstumshabitus aufrechterhalten wird und durch den es zu einer weiteren räumlichen Ausbreitung des Moores kommt (Schumaker und Dietrich, 1998). Abgesehen von ihrer Herkunft sind primäres und sekundäres Chloronema anscheinend morphologisch identisch (Ashton et al., 1979). In Anwesenheit von Cytokinin wird die Initialzelle zu einer Knospe, d.h. durch Cytokinin erfolgt das Umschalten vom filamentösen zum meristematischen Wachstum (Schumaker und Dietrich, 1998). Neben der Bedeutung von Cytokinin bei der Induktion der Knospen-Bildung, wird auch die Abhängigkeit der Initialzellen-Bildung von einem Cytokinin-Stimulus nicht ausgeschlossen (Schumaker und Dietrich, 1998). Die Knospen-Bildung wird etwa neun Tage nach Keimung der Sporen induziert und erfolgt etwa dreizehn Tage nach Sporenkeimung (Schulz et al., 2000). Es entwickelt sich ein einfaches tetraedrisches Meristem, welches sich fortlaufend in drei Ebenen teilt, wodurch eine relativ einfache, vielzellige Knospe entsteht. Die subapikalen Zellen dieser Knospe teilen sich dann öfter als die apikalen Zellen, wodurch eine größere und komplexere Knospe entsteht. Anschließend entstehen Blättchen-Primordien als Ausbuchtungen an der Seite der Knospe, sowie die in Blättchen und Stämmchen gegliederten Moospflanzen, die sogenannten Gametophoren (siehe Abb. 2a bis c) (Schumaker und Dietrich, 1998). Nach drei Wochen Wachstum hat ein einziger Gametophyt etwa 200 bis 400 Gametophoren produziert, wobei sich an der Basis jedes Gametophoren bis zu zehn Rhizoide entwickeln. Dabei ist die Morphologie der Rhizoide ähnlich der des Caulonemas (Ashton et al., 1979).

Induziert durch niedrigere Temperaturen und Feuchtigkeit werden auf den Gametophoren die Reproduktionseinheiten generiert (Bopp und Bhatla, 1990), welche erstmals in der Landpflanzen-Evolution von sterilen Strukturen umgeben sind. Bei *Physcomitrella patens* werden Antheridien (siehe Abb. 2d) (männliche Reproduktionsorgane) und Archegonien (siehe Abb. 2e) (weibliche Reproduktionsorgane) auf derselben Moospflanze gebildet. In den Reproduktionseinheiten entstehen durch Mitose die männlichen und weiblichen Gameten und durch die Befruchtung der weiblichen Eizelle im Archegonium durch die beweglichen Spermatozoiden wird die Zygote gebildet. Diese keimt dort zum diploiden Sporophyten aus, der über ein Haustorium mit dem Gametophoren verbunden bleibt und über diesen auch ernährt wird (Wiencke und Schulz, 1975; Browning und Gunning, 1979). Bei *P. patens* sind die Sporophyten im Vergleich zu anderen Laubmoosen deutlich in ihrer Größe reduziert (siehe Abb. 2f). Der Stiel (Seta), der die Sporenkapsel trägt, ist hier nur wenige Millimeter kurz und die Sporenkapsel hat einen Durchmesser von nur etwa 2 mm, wobei sie auch keine speziellen Strukturen zur Freisetzung der Sporen besitzt (Cove und Knight, 1993; Reski, 1998). In der Sporenkapsel werden bei *P. patens*

etwa 5000 haploide Meiosporen durch Meiosis gebildet (siehe Abb. 2g) (Cove und Knight, 1993; Reski, 1998), die verbreitet werden, bevor sie zur Erzeugung weiterer Gametophyten auskeimen.

Im Gegensatz zu den höheren Pflanzen, können Moose kein Wundgewebe ausbilden und daher auch keine verwundeten Organe regenerieren. Dennoch können nahezu alle Moos-Zellen, unabhängig davon, ob sie vom Gametophyten oder Sporophyten abstammen, zu kompletten Moospflanzen regeneriert werden. Entsprechende Untersuchungen erfolgten maßgeblich an *Physcomitrella patens* (Von Wettstein, 1932), welches seit langem ein Modellsystem für die Erforschung der Pflanzenentwicklung ist, da auf Grund der einfachen Morphologie Entwicklungsprozesse auf der Ebene einzelner Zellen verfolgt werden können (Von Wettstein, 1932; Cove, 1992; Schumaker und Dietrich, 1997; Reski, 1998). So wurde insbesondere der Einfluß des Phytohormons Cytokinin auf die einzelnen Entwicklungsprozesse untersucht (Reski und Abel, 1985; Wang et al., 1992; Wang, 1994; Schumaker und Dietrich, 1998; Reutter et al., 1998; Gonneau et al., 2001).

Neben der einfachen Morphologie bietet *Physcomitrella patens* einen weiteren großen Vorteil, durch den es sich von allen anderen Modellsystemen der Pflanzenmolekularbiologie und –genetik entscheidend abhebt: Bei *Physcomitrella patens* handelt es sich um die einzige Landpflanze, die ein effizientes System zum gezielten Ausschalten von Genen mittels homologer Rekombination bietet (Schaefer und Zryd, 1997; Cove et al., 1997; Reski, 1999; Cove, 2000; Schaefer, 2001; Schaefer und Zryd, 2001). Probleme mit Positionseffekten, Kosuppression oder unstabilen Phänotypen in „antisense“-Pflanzen, wie sie seit langem in der Molekularbiologie der Pflanzen bekannt sind (Leech et al., 1993; Puchta und Hohn, 1996), können in *P. patens* durch das direkte Ausschalten von Genen durch homologe Rekombination umgangen werden. In den letzten Jahren konnten verschiedenste Gene erfolgreich mittels homologer Rekombination ausgeschaltet und Genfunktionen anhand mutanter Phänotypen analysiert werden (Girke et al., 1998; Strepp et al., 1998; Fu et al., 1999; Girod et al., 1999; Hofmann et al., 1999).

1.3 MADS-Box-Gene in *Physcomitrella patens*

Um detailliertere Informationen über die Struktur und Funktion von MADS-Box-Genen außerhalb der Gefäßpflanzen zu gewinnen, wurde die Arbeit mit dem Laubmoos *Physcomitrella patens* begonnen (Henschel, 1999).

Zuvor waren drei MADS-Box-Gene aus *Physcomitrella patens* isoliert worden (Henschel, 1999). Von zweien der Gene, *PPM2* (frühere Bezeichnung *K445*) und *PPM3* (frühere Bezeichnung *K71*), waren die vollständigen cDNAs, sowie die zugehörigen genomischen Sequenzen, inklusive putativer Promotor-Bereiche isoliert worden. Von dem dritten Gen, *PPM1* (frühere Bezeichnung

KH52), waren Teile eines genomischen Fragmentes, sowie eine partielle cDNA sequenziert worden. Bis dahin konnten keine vollständigen cDNAs von *PPM1* isoliert werden, so daß unklar geblieben war, ob das Gen *PPM1* komplett transkribiert und richtig gespleißt wird (Henschel, 1999). Auch Krogan und Ashton (2000) haben *Physcomitrella patens* auf Grund der einzigartigen technischen Möglichkeiten als pflanzliches Modellsystem zur Analyse von MADS-Box-Genen ausgewählt. Die zwei von ihnen entdeckten MADS-Box-Gene sind identisch zu den bereits isolierten MADS-Box-Genen *PPM1* und *PPM2* (Henschel, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die strukturelle Charakterisierung der MADS-Box-Gene aus *Physcomitrella patens* fortgesetzt. Darüberhinaus wird die Technologie der homologen Rekombination in *Physcomitrella patens* zur Untersuchung der pflanzlichen MADS-Box-Gene angewandt. Ferner werden weitere funktionelle Studien der *P. patens* MADS-Box-Gene im homologen System durchgeführt. Schließlich erfolgt die Expression von *P. patens* MADS-Box-Genen im heterologen Blütenpflanzen-Hintergrund von *Arabidopsis thaliana*. Die hierdurch erlangten Hinweise auf die Funktion von MADS-Box-Genen in *P. patens* und anderen Nicht-Samenpflanzen werden diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Die Chemikalien wurden in der Regel mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ von den Firmen BIO-RAD (USA), Roche (Mannheim), Clontech (Heidelberg), Difco Lab. (USA), Merck (Köln und Darmstadt), Fluka (Schweiz), Gibco-BRL (Neu-Isenburg), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Qiagen (Hilden), Riedel de Hën (Hannover), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

Die eingesetzten Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Schwalmbach), Roche (Mannheim), Promega (Heidelberg) und Stratagene (Heidelberg). Die enzymatischen Reaktionen wurden nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

Das Radioisotop [^{32}P]dCTP wurde von der Firma Hartmann-Analytik (Braunschweig) bezogen und hatte eine spezifische Aktivität von etwa 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 Biologisches Material

2.3.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

Bakterienstämme:

Name	Verwendung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> JM109 HCC	Plasmidtransformation	Yanish-Perron et al., 1985
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	<i>Arabidopsis</i> -Transformation	Van Larabeke et al., 1974
<i>Atu35S::PPM2</i>	<i>Arabidopsis</i> -Transformation	W. Faigl, pers. Mitt.

Plasmidvektoren:

Name	Beschreibung	Referenz
pGEM-T	Klonierungsvektor für PCR-Produkte Markergen: Ampicillin-Resistenzgen	Summerton et al., 1983
pJR25	pBluescript-Derivat, Markergen: Kanamycin-Resistenzgen	Rushton, pers. Mitt.
pRT100	Expressionsvektor, enthält den CaMV-35S-Promotor Markergen: Ampicillin-Resistenzgen	Töpfer et al., 1993
pBAR-A	Expressionsvektor zur Transformation von Pflanzen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Markergene: BASTA-Resistenzgen, Kanamycin-Resistenzgen	Cardon, pers. Mitt.
pBSK+	pBluescript; Klonierungsvektor Markergen: Ampicillin-Resistenzgen	Short et al., 1988
pVS1	Expressionsvektor mit 35S:: <i>PPM2</i> -Kassette Markergen: Kanamycin-Resistenzgen	Schwarz, 2000
pJRK445	<i>PPM2</i> -cDNA knock-out Vektor Markergen: Kanamycin-Resistenzgen	Henschel, 1999
pJRK71	<i>PPM3</i> -cDNA knock-out Vektor Markergen: Kanamycin-Resistenzgen	Henschel, 1999

2.3.2 Pflanzliche Nukleinsäuren

Das cDNA-Gemisch aus jungen und alten Gametophyten von *Physcomitrella patens* wurde von Wolfram Faigl, MPIZ, Köln, erstellt.

2.3.3 Pflanzenmaterial

Physcomitrella patens:

Wildtyp-Material zur Etablierung der *Physcomitrella patens* Kultur wurde von I. Somssich, MPIZ, Köln, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G. Protonema aus dem Labor von D. G. Schaefer, Lausanne.

Die transgene *P. patens* Linie M26, in der *PPM2* unter dem CaMV-35S-Promotor überexprimiert wird, wurde mir von W. Faigl zur weiteren Analyse übergeben.

Arabidopsis thaliana:

Es wurden transgene *Arabidopsis thaliana* L. vom Ökotyp Columbia analysiert, die die Moosgene *PPM2*, bzw. *PPM3* unter dem CaMV-35S-Promotor exprimierten. Diese Linien waren von W. Faigl durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte *Arabidopsis*-Transformation hergestellt worden.

Ferner wurde die *agamous*-Mutante *ag-1* des Ökotyps Landsberg *erecta* verwendet. Die Samen der *ag-1* Mutante wurden mir von C. Kirchner, MPIZ, Köln, zur Verfügung gestellt.

2.4 Kultivierung von *Physcomitrella patens*

Die Kultur von *Physcomitrella patens* erfolgte entsprechend den von D. G. Schaefer (1998) beschriebenen Standardbedingungen. Die Anzucht der Gametophoren erfolgte auf Minimal-Medium in 9 cm Petrischalen bei 24°C unter Langtag-Bedingungen (16h Licht/8h Dunkel). Bei der Kultur von reinem Protonema wurde dem Minimal-Medium NH₄-Tartrat zur Unterdrückung des Übergangs von Protonema-Wachstum zu Gametophoren-Wachstum hinzugefügt. Die Induktion der Gametangien-Bildung, und damit der Sporophyten-Bildung, erfolgte durch eine Simulation von Herbst-Bedingungen, mittels Herabsenkung der Temperatur auf 17°C und Zugabe von Wasser, so daß eine vollständige Benetzung der Moose gewährleistet war. Zeitangaben in dieser Arbeit beziehen sich auf den Zeitpunkt der erfolgten Propagation.

2.5 Transformation und Selektion von *Physcomitrella patens*

Die Transformation von *Physcomitrella patens* erfolgte durch PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation, wobei lineare PCR-Amplifikate der knock-out Konstrukte verwendet wurden. Die Transformation und die Selektion wurden entsprechend dem Protokoll von D. G. Schaefer (1998) durchgeführt. Die Selektion erfolgte auf Paramomycin-haltigem Medium mit einer Konzentration von 40 µg Paramomycin pro ml Medium. Hierzu wurden die fünf Tage auf Mannit-haltigem Medium ohne Selektionsdruck gewachsenen Protoplasten mitsamt der untergelegten Cellophan-Scheiben auf Platten mit Paramomycin umgesetzt. Durch Zugabe von NH₄-Tartrat zum Medium, wurde bevorzugt leicht vermehrbares Protonema-Gewebe gebildet. Die regenerierten Protoplasten wurden acht Wochen unter selektiven Bedingungen angezogen, wobei sie alle zwei Wochen auf frische Antibiotika-haltige Platten umgesetzt wurden. Es folgte

eine zwei Wochen lange Relaxionsphase auf NH_4 -Tartrat-haltigem Medium ohne Selektionsdruck, wodurch alle nicht-stabilen Transformanten ihre Resistenz-Kassetten verlieren sollen. Anschließend wurden die Moos-Kulturen wieder auf Paramomycin-haltige Platten überführt, wodurch alle Kolonien starben, die ihre Resistenz-Kassetten in der Relaxionsphase verloren haben.

2.6 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen wurden zur Transformation in Klimakammern (Heraeus Vötsch, Balingen) unter Kurztag-Bedingungen (8h Licht/16h Dunkel) bei 20°C herangezogen. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50-60%. Die Pflanzen der nachfolgenden Generationen wurden im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen (16h Licht/8h Dunkel) angezogen.

2.7 In-planta Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurde nach einem veränderten Protokoll von Bechtold und Mitarbeitern (1993) durchgeführt.

Die Selektion erfolgte durch zweimaliges Sprühen von 0,1% BASTA auf die vier bzw. sieben Tage alten Keimlinge.

2.8 Untersuchungen mittels Lupe

Phänotypische Analysen und Dokumentation von *Physcomitrella patens* und *Arabidopsis thaliana* erfolgten mittels Binokular-Lupe (Wild, Heerbrugg) und Umkehroptik-Mikroskop (Zeiss).

2.9 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Transgene Blüten von *Arabidopsis thaliana* wurden unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskopes (Zeiss, Oberkochen) bezüglich Veränderungen der Blütenorgane analysiert. Die Präparation der Blüten erfolgte durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Goldbedampfung unter Argonatmosphäre (Cryotrans System CT1500, Oxford Instruments, Großbritannien) nach Sublimierung von Wasserkristallen.

2.10 Isolierung von Nukleinsäuren

2.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte über alkalische Lyse nach einem Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989).

2.10.2 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA aus *P. patens* zur Durchführung von Southern-Analysen erfolgte mittels einer DIECA-basierten Methode. Hierbei wurde möglichst junges, fein gemörsertes Material verwendet. Aus einer Platte mit drei Wochen altem Protonema konnten etwa 100 µg DNA gewonnen werden. Die präparierten DNAs wurden in TE pH 8,0 gelagert. Der Erhaltungsgrad wurde mittels Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen getestet.

Moos-DNA für PCR-Analysen wurde entsprechend dem Protokoll von Edwards et al. (1991) isoliert.

Wurden nur geringe Mengen von *Arabidopsis* DNA zur Durchführung von PCR benötigt, so wurde die DNA mittels des „DNeasy-Kits“ von Qiagen (Hilden) präpariert.

2.10.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus *Physcomitrella patens* und *Arabidopsis thaliana* wurde entsprechend des Protokolls von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte entsprechend dem „Clean up protocol“ über Säulen des „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen).

2.10.4 Isolierung von poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA von *Physcomitrella patens* erfolgte mit Hilfe von magnetischen „Dynabeads“ (DynaL, Norwegen) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.11 Herstellung von cDNA-Pools

Die Herstellung von cDNA-Pools zur Suche neuer cDNAs von MADS-Box-Genen erfolgte aus poly(A)⁺-RNA oder aus Gesamt-RNA. Poly(A)⁺-RNA wurde aus RNA isoliert, die aus allen Stadien des Lebenszyklus von *Physcomitrella patens* präpariert worden war. Diese poly(A)⁺-RNA wurde dann durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, wobei gleichzeitig ein Adapter am 3' Ende des poly(A)-Schwanzes eingeführt wurde. Dieser Adapter diente als Bindestelle für den Oligonukleotid-Primer P₀₁₈, der als unspezifischer Primer in RACE-PCR verwendet wird (siehe 2.12.3). Da dieser zu starken Kreuzreaktionen mit den Moos cDNAs führte, wurden bei Bedarf cDNA-Pools unter Verwendung des 5'/3'-RACE Kits der Firma Roche (Mannheim) hergestellt.

2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gestützte Verfahren

2.12.1 Oligonukleotid-Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von Life Technologies (Rockville) bezogen.

Alle in dieser Arbeit erwähnten Oligonukleotid-Primer sind im Anhang aufgeführt.

2.12.2 Standard-PCR

Die Herstellung quantitativer Mengen eines DNA-Fragmentes mittels Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgte entsprechend den Vorschriften für die jeweiligen Enzyme oder Enzym-Gemische. Wenn nicht anders vermerkt, wurden folgende Reaktionsbedingungen eingehalten: 2 min Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen aus 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 54-68°C und 0,5 min/kBp Neusynthese bei 72°C. Beendet wurde das PCR-Programm mit 10minütiger Inkubation bei 72°C, wodurch alle begonnen Synthesen zu Ende geführt werden sollten.

2.12.3 3'RACE-PCR

Die Technik der 3'RACE-PCR („Rapid amplification of cDNA ends“) (Frohman et al., 1988) diente der Isolierung von partiellen cDNA-Sequenzen. Die Template-DNA ist ein cDNA-

Gemisch, bei dessen Herstellung ein Oligo-dT-Primer mit Verlängerung verwendet worden ist (Primer P₀₁₉ oder P_{anchor-oligo-dT}). Bei der PCR wird ein Oligonukleotid-Primer eingesetzt, der sich an diese Verlängerung anlagert (Primer P₀₁₈ oder P_{anchor}). Als Gegenprimer wird ein genspezifisches Oligonukleotid verwendet.

2.12.4 5'RACE-PCR

Die Isolierung von fehlenden 5'Bereichen der unvollständigen 3'RACE-cDNAs aus Gesamt-RNA, sowie die Transkriptionsstart-Bestimmung erfolgten mittels 5'RACE-PCR (Frohman et al., 1988). Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll des 5'/3'-RACE-Kits von Roche (Mannheim). Als Template wurde 1 µg Gesamt-RNA verwendet.

2.12.5 RT-PCR zur Expressionsanalyse

Zur genspezifischen Expressionsanalyse wurde Gesamt-RNA verschieden alter Mooskulturen bzw. verschiedener *Physcomitrella*- oder *Arabidopsis*-Linien isoliert, welche mittels Reverser Transkriptase (Superscript II (GibcoBRL, Neu-Isenburg)) in cDNA umgeschrieben wurde. Anschließend wurden Standard-PCR mit genspezifischen Oligonukleotid-Primern durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Expression einer Aktin mRNA aus *P. patens* (Hara et al., 2001), bzw. *A. thaliana* (Wellesen, 2000) analog bestimmt.

2.12.6 Genomische PCR

Die Methode der genomischen PCR wurde zur Aufklärung von Exon-Intron-Strukturen verwendet, wobei die Oligonukleotid-Primer aus der cDNA-Sequenz der jeweiligen Gene abgeleitet wurden. Da das Vorliegen der genomischen DNA in hochmolekularer Form die Anlagerung der Primer erschwert, wurde die DNA vorgequollen.

Eingesetzt wurden 0,4 µg *Physcomitrella*-DNA pro 50 µl Volumen PCR-Ansatz, wobei 40 Synthese-Zyklen durchgeführt wurden.

2.12.7 Genomische Linker PCR zur Amplifizierung putativer Promotorbereiche

Die Technik der genomischen Linker PCR, auch RAGE („Rapid amplification of genomic ends“) genannt, wurde dazu verwendet, unbekannte, flankierende Bereiche einer aufgeklärten Sequenz zu amplifizieren, z.B. Bereiche eines putativen Promotors (Siebert et al., 1995; Cormack und Somssich, 1997).

Die Durchführung dieses Experiments folgte dem „Clontech Universal Genome Walker Kit“-Protokoll, wobei die genomische DNA von *Physcomitrella patens* zur Herstellung der als PCR-Template einzusetzenden Ligationsansätze mit *EcoRI*, *EcoRV*, *HindII* oder *HindIII* verdaut worden war. Die Annealing- und Neusynthese-Temperatur betrug 72°C für 4 min in den ersten sieben Zyklen und 67°C für 4 min in den folgenden 32 Zyklen.

2.12.8 Genomische Linker PCR zur Isolierung neuer MADS-Box-Gene

Die Methode der genomischen Linker PCR (siehe 2.12.7) wurde auch zur Suche nach neuen MADS-Box-Genen eingesetzt. Hierbei wurde eine Annealing-Temperatur von 54°C für 30 sek verwendet, um eine unpräzisere Anlagerung der Oligonukleotid-Primer zu ermöglichen. Die Neusynthese-Temperatur betrug in den ersten sieben Zyklen 72°C für 3 min und in den nachfolgenden 32 Zyklen betrug die Neusynthese-Temperatur 67°C.

2.13 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungsarbeiten (Sequenzierungen) wurden von der ADIS-Einheit („Automatic DNA Isolation and Sequencing“) des MPIZ durchgeführt.

2.14 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern- oder Northern-Analysen mit [³²P]dCTP erfolgte mittels „Oligoprobe-labeling“ durch die Klenow-DNA-Polymerase (Sambrook et al., 1989).

2.15 Southern- und Northern-Analysen

Southernblot- und Northernblot-Analysen wurden weitestgehend nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die zu analysierenden Nukleinsäuren wurden per Kapillarblot auf Hybond-N⁺ Nylonmembran (Amersham) transferiert.

Die Hybridisierung mit den jeweiligen radioaktiv-markierten DNA-Sonden erfolgte über Nacht bei 68°C in 5 x SSC, 5 x Denhardt's Reagenz, 0,5% SDS und 1 mg/ml Heringsperma-DNA. Anschließend wurden die Membranen 1 x 10 min mit einer Waschlösung bestehend aus 2 x SSPE, 0,1% SDS und anschließend 2 x 12 min mit einer Waschlösung bestehend aus 0,1 x SSPE, 0,5% SDS bei 68°C gewaschen (hohe Stringenz), bzw. 1 x SSPE, 0,5% SDS bei 55°C (moderate Stringenz).

2.16 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Computeranalysen erfolgten unter Benutzung der DNA-Sequenzanalyseprogramme aus GCG (Version 10.0), (Genetics Computer Group, 1999) und unter Verwendung folgender Macintosh-Computer gestützter Programme: Assembly LIGN 1.0.9c und Mac Vector 7.0. Zur Sequenzrecherche wurde die NCBI-, EMBL- oder SWISS-PROT-Datenbank benutzt. Die Phylogenierekonstruktionen wurden mit den Programmen NEIGHBOR, PROTDIST und SEQBOOT aus dem PHYLIP Programmpaket unter Verwendung der Grundeinstellungen (default parameter) durchgeführt (Felsenstein, 1993). Sequenzen der für die Stammbäume verwendeten Proteine können der „MADS-Homepage“ des MPIZ, Köln, entnommen werden (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~theissen>).

2.17 Accession-Nummern der *P. patens* MADS-Box-Gene

Die in dieser Arbeit verwendeten *P. patens* MADS-Box-Gen cDNA-Sequenzen sind unter folgenden Accession-Nummern erhältlich: AF150931 (*PPM1*; Krogan und Ashton 2000), AJ419328 (*PPM2c*), AJ419329 (*PPM3*), AJ419330 (*PPM4*), AB067688 (*PpMADS1*), AB067689 (*PpMADS2*), und AB067690 (*PpMADS3*). Die genomischen Sequenzen von *PPM1* bis *PPM4* sind unter folgenden Accession-Nummern erhältlich: AF150932 (*PPM1*; Krogan und Ashton 2000), AF150934 (*PPM2*; Krogan und Ashton 2000), AJ421637 (*PPM3*), AJ421638 (*PPM4*).

3 Ergebnisse

3.1 Strukturelle Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens*

Im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit (Henschel, 1999) waren drei MADS-Box-Gene aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* isoliert worden. Zwei dieser MADS-Box-Gene, *PPM2* und *PPM3*, waren mittels 3'RACE-PCR aus einem cDNA-Pool aus jungen und alten Gametophyten isoliert worden. Beim Screenen einer cDNA-Bibliothek aus dem Protonema-Stadium konnte eine weitere partielle MADS-Box-Gen cDNA, *PPM1*, isoliert werden. Von *PPM2* und *PPM3* waren die genomische Sequenz, sowie Bereiche putativer Promotoren aufgeklärt worden, von *PPM1* waren Bereiche eines genomischen Fragmentes sequenziert worden (Henschel, 1999). Anhand von Sequenzähnlichkeiten und Exon-Intron-Strukturen wurden die MADS-Box-Gene in einen *PPM2*- und einen *PPM3*-Typ unterteilt, wobei *PPM3* der bislang einzige Vertreter des *PPM3*-Typs war, wohingegen *PPM2* und wahrscheinlich auch *PPM1* den *PPM2*-Typ repräsentierten.

Die Isolierung der Gene *PPM1* und *PPM2* wurde unabhängig auch von Krogan und Ashton (2000) berichtet. Da Krogan und Ashton zwei andere cDNA-Isoformen von *PPM2* gefunden hatten, *PPM2* und *PPM2b*, wurde die dieser Arbeit zugrunde liegende cDNA *PPM2c* genannt. Diese Sequenz ist identisch zu der *PPM2* cDNA (*sensu* Krogan und Ashton, 2000), mit Ausnahme der Sequenz stromabwärts vom 10. Exon, wo *PPM2c* identisch zu der *PPM2b* cDNA ist (*sensu* Krogan und Ashton, 2000).

3.1.1 Isolierung einer vollständigen cDNA von *PPM1*

In dieser Arbeit wurde die Sequenzierung des genomischen Fragmentes von *PPM1* zu Ende geführt. Aus der Sequenz wurden Primer abgeleitet, durch die anschließend die komplette cDNA von *PPM1* aus dem cDNA-Pool aus jungen und alten Gametophyten amplifiziert werden konnte. Die Länge der erhaltenen cDNA betrug 1052 Bp. Ein Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz ergab, daß die resultierende Exon-Intron-Struktur von *PPM1* annähernd identisch zu der von *PPM2* ist, wie bereits auf Grund hoher Sequenzähnlichkeiten postuliert (Henschel, 1999). Unterschiedlich ist nur die Anzahl der Introns im 3'UTR, da *PPM1* dort kein Intron besitzt, im Gegensatz zu *PPM2*, welches dort ein Intron aufweist.

3.1.2 Isolierung des MADS-Box-Gens *PPM4* durch genomische Linker PCR

Da mit *PPM3* bislang nur ein Gen vom *PPM3*-Typ bekannt war, stellte sich die Frage, ob tatsächlich nur ein Gen dieser Struktur im Genom von *Physcomitrella patens* vorkommt. Da die *Physcomitrella* MADS-Box-Gene sehr schwach exprimiert sind und die Suche nach neuen MADS-Box-Genen auch durch Kreuzreaktionen des 3'RACE Primers P₀₁₈ mit den Moos cDNAs erschwert wird, wurde die Methode der genomischen Linker PCR (siehe 2.12.8) zur Suche nach neuen MADS-Box-Genen angewandt. Hierzu wurden drei weitere Oligonukleotid-Primer aus dem hochkonservierten „RQVT-Motiv“ der *P. patens* MADS-Box-Gene abgeleitet, da *PPM2* und *PPM3* beide durch Verwendung des aus MADS-Box-Genen des Farns *Ceratopteris richardii* abgeleiteten Primers P_{RQVT2} (Münster et al., 1997) gefunden worden waren. Die Primer wurden in einer PCR mit dem RAGE-Adapter Primer P_{AP1} („Adapter Primer 1“) als Gegenprimer eingesetzt. Als Template dienten die vier Adapter-Ligationsansätze *EcoRI*, *EcoRV*, *HindII* und *HindIII* (siehe 2.12.7 und 2.12.8). In sieben von zwölf PCR-Ansätzen waren Amplifikate entstanden. Diese wurden kloniert und transformiert. Die Sequenzierung von je drei Plasmiden pro Amplifikat ergab, daß 18 der 21 Sequenzen auf MADS-Box-Gene zurückzuführen sind. Dabei waren zehn Klone identisch mit *PPM2*, drei mit *PPM3* und fünf stammten von einem neuen MADS-Box-Gen und besaßen in dem isolierten Bereich eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *PPM3*. Dieses neue MADS-Box-Gen wurde *PPM4* genannt. Das genomische RAGE-Fragment von *PPM4* umfaßte den Bereich der MADS-Box stromabwärts des Primers P_{KH05}, sowie einen großen Teil des ersten Introns. Aus der MADS-Box Sequenz wurden Primer zur Amplifizierung der *PPM4*-cDNA abgeleitet. Es konnte nach einer PCR mit einem nested-Primer eine 1688 Bp lange partielle cDNA von *PPM4* isoliert werden.

Der MADS-Box Bereich stromaufwärts des 3'RAGE-Primers, sowie weitere 377 Bp stromaufwärts des Startkodons ATG konnten anschließend durch 5'RAGE isoliert werden. Aus dem 5'UTR wurde ein Primer abgeleitet, mit dem dann eine 1710 Bp lange *PPM4* cDNA amplifiziert wurde, die das gesamte offene Leseraster beinhaltet.

3.1.3 Einzelkopie-Gen-Nachweis von *PPM4* durch genomischen Southern-Blot

Um zu überprüfen, ob es sich auch bei *PPM4* um ein Einzelkopie-Gen handelt, was bereits für *PPM1* – *PPM3* gezeigt werden konnte (Henschel, 1999), wurde eine genomische Southern-Hybridisierung mit *PPM4*-spezifischer Sonde durchgeführt.

Für den Southern-Blot wurden je 10 µg *P. patens* genomische DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *EcoRV*, *HindII* oder *HindIII* verdaut. Nach Auftrennung der Ansätze im Agarosegel und Blotten des Gels auf Nylonmembran wurde mit radioaktiv-markierter

Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen (siehe 2.15). Die Sonde enthielt nicht den Bereich der hochkonservierten MADS-Box, um Kreuzreaktionen zwischen ähnlichen Genen zu vermeiden. Nach der Entwicklung der Autoradiographie trat in drei Spuren nur eine Bande auf, während in der Spur des *HindII*-Verdau keine Bande erhalten wurde (siehe Abb. 3). Da im Falle des *HindIII*-Verdau die erhaltene Bande nur eine Größe von ca. 2 kBp hatte, handelt es sich bei *PPM4* um ein Gen, das mit großer Wahrscheinlichkeit in nur einer Kopie im Genom von *P. patens* vorliegt. Darüberhinaus zeigte ein Vergleich des Bandenmusters von *PPM4* mit den Hybridisierungssignalen der Gene *PPM1* – *PPM3*, daß alle vier MADS-Box-Gene vollständig unterschiedliche Hybridisierungsmuster aufweisen (siehe Abb. 3).

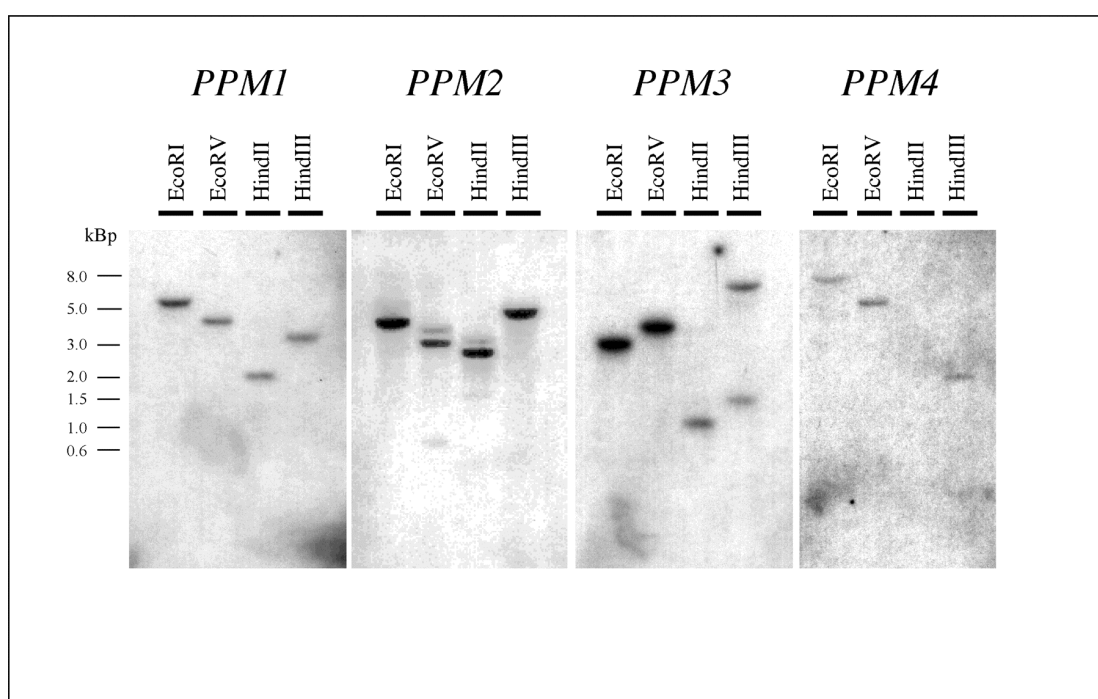


Abb. 3: Genomische Southern-Hybridisierungen zur Bestimmung der Kopienzahl der *P. patens* MADS-Box-Gene. Je 10 µg *P. patens* DNA, die mit den Enzymen *EcoRI*, *EcoRV*, *HindII* oder *HindIII* verdaut worden waren, wurden in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung des Filters mit genspezifischen Sonden, die den Bereich der MADS-Box nicht enthielten, erfolgte stets bei 68°C und das anschließende Waschen mit hoher Stringenz.

3.1.4 Sequenz- und Strukturvergleiche der *P. patens* MADS-Box-Gene

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Mitsuyasu Hasebe (Okazaki, Japan) sind mir Sequenzen von drei weiteren MADS-Box-Genen, *PpMADS1*, *PpMADS2* und *PpMADS3*, aus *Physcomitrella patens* zur Verfügung gestellt worden. *PpMADS1* ist ein Vertreter des zuvor definierten *PPM2*-Typs (frühere Bezeichnung *K445*-Typ) (Henschel, 1999). Dagegen weisen *PpMADS2* und *PpMADS3* große Ähnlichkeiten zu *PPM3* und *PPM4* auf.

Die Übersetzung der vollständigen cDNA-Sequenzen von *PPM1* - *PPM4* und *PpMADS1* - *PpMADS3* in die Aminosäuresequenzen ergab die Längen der konzeptionellen Proteine. Die resultierenden Proteine haben eine Länge von 283 AS (*PPM1*), 284 AS (*PPM2*), 372 AS (*PPM3*), 380 AS (*PPM4*), 281 AS (*PpMADS1*), 306 AS (*PpMADS2*) und 320 AS (*PpMADS3*) (siehe Abb. 4).

Es wurden multiple Sequenzvergleiche mit allen bislang bekannten *P. patens* MADS-Box-Genen und verschiedenen pflanzlichen MADS-Box-Genen durchgeführt. Diese zeigten, daß alle MADS-Domänen-Proteine von *P. patens* erkennbare MADS- (M-) und K-Domänen haben, die durch eine Intervening- (I-) Domäne miteinander verbunden sind, und von einer C-terminalen Domäne gefolgt werden (siehe Abb. 4). Das bedeutet, alle *P. patens* MADS-Domänen-Proteine weisen die charakteristische MIKC-Struktur auf.

Abb. 4: Sequenzvergleich von pflanzlichen MADS-Domänen-Proteinen aus verschiedenen Subfamilien mit den Genprodukten der *P. patens* MADS-Box-Gene *PPM1* – *PPM4* und *PpMADS1* – *PpMADS3*. Ein „<“ Zeichen bedeutet, daß die Sequenz von *AGL17* am N-terminalen Ende unvollständig ist. Die MADS-Domäne ist schwarz markiert, die N-terminale Extension der MADS-Domäne gelb. Die I-Region ist rot hervorgehoben, die K-Domäne blau und die hydrophoben AS (L, I, V und M) der K-Domäne sind fett gedruckt. Die C-Region ist in grün dargestellt. Die Positionen der Introns sind mit zwei Klammern gekennzeichnet, wenn sie zwischen zwei AS-Kodons (Phase 0 Introns) liegen, und mit einem Dreieck, wenn sie innerhalb eines AS-Kodons liegen.

DEF, GLO, PLE und SQUA stammen aus *Antirrhinum majus*, **AGL2, AGL6, AGL12 und AGL17** aus *Arabidopsis thaliana*, **AGL15-1** aus *Brassica napus*, **TM8** aus *Lycopersicon esculentum*, **TOBMADS1** aus *Nicotiana tabacum*, **CRM1 und CRM6** aus *Ceratopteris richardii*, **LAMB1** aus *Lycopodium annotinum* und **GGM13** aus *Gnetum gnemon*.

Accession-Nummern der *P. patens* MADS-Box-Gen cDNAs von *PPM1* – *PPM4* und *PpMADS1* – *PpMADS3*: AF150931 (*PPM1*; Krogan und Ashton 2000), AJ419328 (*PPM2c*), AJ419329 (*PPM3*), AJ419330 (*PPM4*), AB067688 (*PpMADS1*), AB067689 (*PpMADS2*), und AB067690 (*PpMADS3*). Accession-Nummern der genomischen Sequenzen von *PPM1* bis *PPM4*: AF150932 (*PPM1*; Krogan und Ashton 2000), AF150934 (*PPM2*; Krogan und Ashton 2000), AJ421637 (*PPM3*), AJ421638 (*PPM4*).

Die hier durchgeführten Sequenz- und Strukturvergleiche mit sieben *P. patens* MADS-Box-Genen bestätigten, daß zwei Typen von MADS-Box-Genen in *P. patens* vorkommen (Henschel, 1999). Dabei ist die Struktur des zuvor definierten *PPM2*-Typs, repräsentiert durch *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1*, vergleichbar mit der Struktur der bislang bekannten pflanzenspezifischen MADS-Box-Gene vom MIKC-Typ. Diese Gene weisen MADS-, I- und K-Domänen vergleichbarer Längen auf. Darüberhinaus ist das Vorkommen einer K-Domäne mit einem hochkonservierten regelmäßigen Muster hydrophober Aminosäuren charakteristisch (siehe Abb. 4).

MADS-Box-Gene, die die beschriebenen Struktureigenschaften besitzen, werden im folgenden als MADS-Box-Gene vom MIKC^c-Typ zusammengefaßt („c“ für „classic“).

Von den MIKC^c-Typ MADS-Box-Genen werden MADS-Box-Gene vom MIKC^{*}-Typ unterschieden. Als MIKC^{*}-Typ werden alle MADS-Box-Gene zusammengefaßt, die die Struktureigenschaften des zuvor beschriebenen *PPM3*-Typs, repräsentiert durch *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* und *PpMADS3*, besitzen.

Nach der im folgenden Kapitel (siehe 3.1.5) erläuterten „längere I-Domänen Hypothese“ ist die I-Domäne der MIKC^{*}-Typ Proteine signifikant länger als die der MIKC^c-Typ Proteine. Die I-Domäne von *PPM3* umfaßt 62 AS, und die von *PpMADS3* sogar 87 AS, wohingegen die I-Domäne des typischen MIKC^c-Typ Proteins *SQUAMOSA* aus *Antirrhinum majus* eine Länge von nur 35 AS aufweist (Huijser et al., 1992) (siehe Abb. 4). Desweiteren ist die K-Domäne der MIKC^c-Typ Proteine typischerweise durch ein regelmäßiges Muster aus hydrophoben Aminosäuren gekennzeichnet. Die Position der hydrophoben Aminosäuren resultiert wahrscheinlich in der Ausbildung einer amphipatisch-helikalen Sekundärstruktur der K-Domäne. Auch die K-Domänen der MIKC^{*}-Typ Proteine weisen ein regelmäßiges Muster aus hydrophoben

Aminosäuren auf, allerdings sind einige der hydrophoben AS um eine oder zwei Positionen verschoben oder weniger konserviert (siehe Abb. 4). Zusätzlich treten drei Indels auf (in Abb. 4 AS-Positionen 184, 191 und 218), wodurch die K-Domänen der MIKC^{*}-Typ Proteine länger als die K-Domänen der MIKC^c-Typ Proteine sind. Die Indels sind sehr kurz, zwei umfassen zwei AS (AS-Positionen 184 und 218) und eines eine AS (AS-Position 191).

Mittels Sequenzvergleichen konnten bislang zwei weitere MIKC^c-Typ Proteine gefunden werden, in denen auch eines der Indels vorkommt. Hierbei handelt es sich um die nahe miteinander verwandten Proteine CRM3 und CRM9 aus dem Farn *Ceratopteris*, die ein zwei AS langes Indel an der Position 184 besitzen (CRM3 siehe Abb. 4). Um zu überprüfen, ob die MIKC^{*}-Typ Proteine trotz ihrer abweichenden K-Domänen Struktur in der Lage sind, die für Protein-Dimerisierungen wahrscheinlich benötigten helikalen Strukturen auszubilden, wurden Computergestützte Vorhersagen der Sekundärstruktur durchgeführt. Es wurden die beiden Protein-Sekundärstruktur Vorhersage Programme nach Robson-Garnier und nach Chou-Fasman aus dem Mac Vektor Sequenzanalyse Programmpaket verwendet. Diese zeigten für alle *P. patens* MIKC^{*}-Typ Proteine, daß eine Ausbildung helikaler Strukturen möglich ist.

Da es sich bei den MIKC^{*}-Typ Proteinen um eine neue Klasse von MIKC-Typ MADS-Box-Genen handelt, wurde versucht, derartige Gene auch in anderen Spezies zu finden. Diese Suche erfolgte mittels BLAST-basierten Gen- und Protein-Datenbank-Recherchen, bei denen die einzelnen Domänen separat zur Suche verwendet wurden. Auf diese Weise konnte bislang ein MADS-Domänen-Protein gefunden werden, LAMB1 aus dem Bärlapp *Lycopodium annotinum* (Svensson et al., 2000), das ebenfalls eine signifikant längere I-Domäne als die MIKC^c-Typ Proteine aufweist (siehe Abb. 4). Im Gegensatz zu den *P. patens* MIKC^{*}-Typ Proteinen fehlen LAMB1 allerdings die drei Indels der K-Domäne (siehe Abb. 4). Darüberhinaus besitzt LAMB1 eine außergewöhnlich lange C-Domäne, die aus drei unvollständigen Sequenz-Wiederholungen zusammengesetzt ist (Svensson et al., 2000).

3.1.5 „Längere I-Domänen Hypothese“ versus „K-Domänen Insertions Hypothese“

Um die strukturellen Unterschiede zwischen den MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Proteinen zu interpretieren, bedarf es einer richtigen Zuordnung der verschiedenen Proteindomänen, und damit auch der Annahme über Homologie-Beziehungen. Die Domänen-Struktur der MIKC^{*}-Typ Proteine, wie sie der Abb. 4 zu Grunde gelegt worden war (fortan „längere I-Domänen Hypothese“ genannt), beruhte auf den Resultaten zahlreicher Sequenzvergleiche. Alternativ zu dieser Hypothese wurde ein weiteres Szenario entwickelt, die „K-Domänen Insertions Hypothese“. Nach dieser Hypothese ist der Längenunterschied zwischen MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ

Proteinen stromaufwärts der C-Domäne eher auf eine Insertion in der K-Domäne zurückzuführen, als auf eine Verlängerung der I-Domäne. Gestützt wird die „K-Domänen Insertions Hypothese“ durch das Auftreten des Dipeptids „GE“ bei PPM3 und PpMADS2 (in Abb. 4 AS-Position 135) bzw. in abgewandelter Form „GD“ bei PPM4 und „EE“ bei PpMADS3. Viele der MIKC^c-Typ Proteine besitzen ein hochkonserviertes „GE“ an AS-Position 182 und 183 des Alignments in Abb. 4, welches den MIKC^{*}-Typ Proteinen nach der „längere I-Domänen Hypothese“ an dieser Stelle fehlt. Unter der Annahme, daß die „GE“-Motive der MIKC^c-Typ und MIKC^{*}-Typ Proteine homolog sind, würden die MIKC^{*}-Typ Proteine nach der „K-Domänen Insertions Hypothese“ zwischen dem „GE“-Motiv und dem C-terminalen Teil der K-Domäne eine Insertion von 42 AS besitzen. Unterstützt wird eine solche Homologie durch das Vorkommen K-Domänen typischer hydrophober AS-Positionen oberhalb des „GE“-Motivs in den MIKC^{*}-Typ Proteinen. Gegen die „K-Domänen Insertions Hypothese“ spricht jedoch, daß die resultierenden I-Domänen von PPM3 und PPM4 mit 14 AS extrem kurz wären, im Vergleich zu den 35 AS der I-Domäne von SQUAMOSA.

Betrachtet man dagegen PpMADS2 und PpMADS3 mit ihren deutlich längeren I-Domänen nach der „K-Domänen Insertions Hypothese“, so verblieben 38 AS in der I-Domäne, was eine typische I-Domänen Länge darstellt. Da sich jedoch die längeren I-Domänen von PpMADS2 und PpMADS3 anhand einer Suche nach Sequenz-internen Wiederholungen als Sequenzduplikation herausstellten und so PPM3 und PPM4 die ursprüngliche I-Domänen-Länge haben, spricht die resultierende Kürze der I-Region gegen die „K-Domänen Insertions Hypothese“.

Sequenzvergleiche zwischen beiden Formen putativer K-Domänen der MIKC^{*}-Typ Proteine und den K-Domänen der MIKC^c-Typ Proteine, sowie ein Vergleich der Muster konservierter AS bevorzugten in moderatem Maße die „längere I-Domänen Hypothese“, wie es auch schon aus paarweisen und multiplen Sequenzvergleichen zwischen MIKC^c-Typ und MIKC^{*}-Typ Proteinen hervorgegangen war. Dennoch konnten diese Analysen nicht komplett ausschließen, daß die „K-Domänen Insertions Hypothese“ zutreffend sein könnte.

3.1.6 Vergleich der Exon-Intron-Strukturen von MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Genen

Um die Unterschiede zwischen den beiden Klassen von MIKC-Typ Genen besser charakterisieren zu können, wurden die Sequenzen und Exon-Intron-Strukturen der genomischen Loci der *P. patens* MADS-Box-Gene analysiert. Hierbei zeigte sich, daß alle Exon-Intron-Übergänge durch die Intron-Grenzen-Konsensussequenz („GT“-„AG“) gekennzeichnet sind (Luehrsen et al., 1994), mit Ausnahme der 5'Spleißsequenz des 4. Introns von *PPM1* und *PPM2*, die durch das

Dinukleotid „GC“ gebildet wird. Diese alternative Introngrenze konnte bereits zuvor in *P. patens* (Girke et al., 1998) und anderen Pflanzenarten gefunden werden (Xue und Rask, 1995).

Die Positionen aller Introns im Bezug auf die Proteinsequenz sind in Abb. 4 dargestellt. Dabei sind die Intron-Positionen mit zwei Klammern markiert, wenn sie zwischen zwei AS-Kodons (Phase 0 Introns) liegen, und durch ein Dreieck, wenn sie innerhalb eines AS-Kodons liegen. Außer dem letzten Intron von *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1* sind alle innerhalb eines Kodons liegenden Introns Phase zwei Introns, d.h. sie liegen zwischen der zweiten und dritten Position des Kodons.

Außerdem werden die Exon-Intron-Strukturen von *PPM1* - *PPM4* in Abb. 5 mit denen von *SQUA* und *LAMBI* verglichen. Unter Annahme der favorisierten „längere I-Domänen Hypothese“ zeigten sich in diesem Vergleich der Exon-Intron-Strukturen von MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Genen für die I-Region der *P. patens* MIKC^{*}-Typ Gene und für *LAMBI* große Abweichungen von der konservierten Exon-Intron-Organisation der MIKC^c-Typ Gene.

So liegen bei den MIKC^c-Typ MADS-Box-Genen im typischen Fall der 5'UTR und die MADS-Box im ersten Exon, die I-Region im zweiten, die K-Box in den Exons 3, 4 und 5 und die C-Region in den Exons 6, 7 und eventuell 8 (siehe Abb. 4 und 5). Auch bei *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2*, *PpMADS3* und *LAMBI* befinden sich der 5'UTR und die MADS-Box im ersten Exon. Die bei diesen Genen um etwa 30 bis 50 Aminosäuren verlängerte I-Region erstreckt sich über die Exons 2, 3, 4 und 5, bei *PpMADS2* und *PpMADS3* auch über Exon 6, so daß sich die K-Region in den Exons 6, 7 und 8, bzw. bei *PpMADS2* und *PpMADS3* in den Exons 7, 8 und 9 befindet (siehe Abb. 4 und 5). Damit ist die typische Verteilung der K-Domäne auf drei Exons konserviert.

Bei den *P. patens* MADS-Box-Genen vom MIKC^c-Typ, *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1*, dagegen entspricht die Position aller Introns genau der konservierten Struktur und auch die diagnostische Größe des 5. und 6. Exons von 42 Bp ist bei diesen Genen vorhanden (siehe Abb. 4 und 5). Der einzige Unterschied zwischen den *P. patens* MIKC^c-Typ Genen und denen anderer Pflanzen besteht darin, daß diese *P. patens* Gene eine längere C-Domäne haben, deren kodierender Bereich auf insgesamt 4 statt 3 Exons liegt (siehe Abb. 4 und 5).

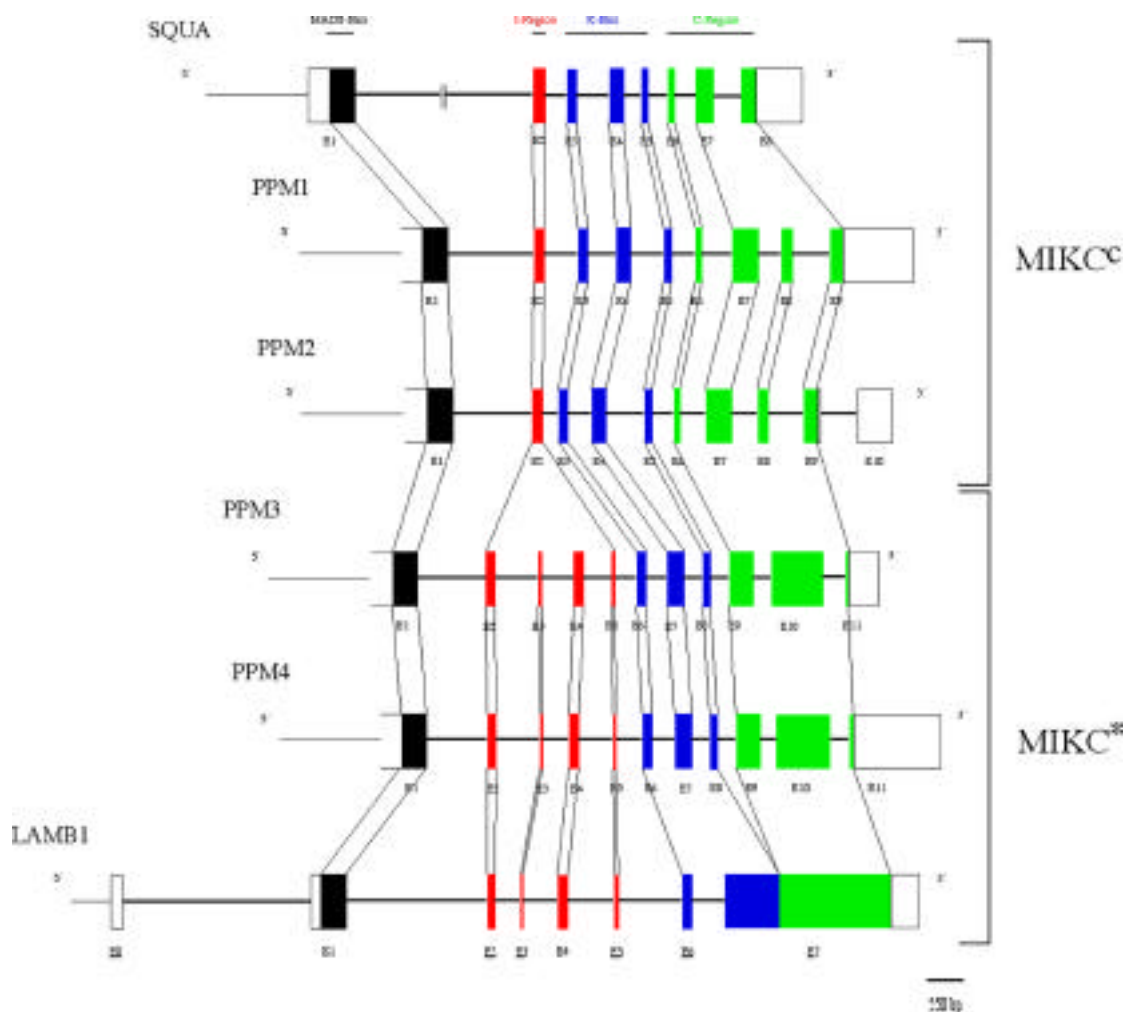


Abb. 5: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Strukturen der *P. patens* MADS-Box-Gene *PPM1* – *PPM4* und der Gene *SQUAMOSA* (Huijser et al., 1992) und *LAMB1* (Svensson et al., 2000). Die Exons sind als farbige Kästen dargestellt, die 5' und 3'UTRs als weiße Kästen und die Introns als dicke schwarze Linien. Bereiche putativer Promotoren sind durch dünne horizontale Linien gekennzeichnet. Exons der MADS-Box sind schwarz markiert. Die I-Region ist in rot dargestellt, die K-Box in blau und die C-Region in grün. Homologe Exons sind durch dünne vertikale Linien miteinander verbunden. Die Zugehörigkeit der Gene zum MIKC^c- oder MIKC^{*}-Typ ist durch Klammern am rechten Rand gekennzeichnet.

Hinsichtlich der beiden oben beschriebenen Hypothesen zur Domänenstruktur der MIKC^{*}-Typ Gene ist nur unter der „längere I-Domänen Hypothese“ die Lage der Introns der K-Domäne zwischen beiden Klassen von MIKC-Typ Genen konserviert, außer daß bei *LAMB1* nach dem ersten Intron der K-Box keine weiteren Introns vorhanden sind (siehe Abb. 4 und 5). Dagegen weichen die Intron-Positionen der K-Box von MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Genen unter Annahme der „K-Domänen Insertions Hypothese“ stark voneinander ab (Daten nicht gezeigt). Außerdem

erfordert die „K-Domänen Insertions Hypothese“ die Spaltung der K-Domäne, der wichtige Aufgaben bei Protein-Protein-Interaktionen zukommen (Davies und Schwarz-Sommer, 1994).

Unter der „längere I-Domänen Hypothese“ ist der Hauptunterschied zwischen den beiden Subtypen von MIKC-Typ Genen der folgende: während die I-Domäne der MIKC^c-Typ Proteine im allgemeinen von einem Exon kodiert wird, wird die I-Domäne der MIKC^{*}-Typ Proteine von vier (PPM3, PPM4, LAMB1), bzw. fünf (PpMADS2, PpMADS3) Exons kodiert, wodurch auch die Zunahme der I-Domänen Länge in den MIKC^{*}-Typ Proteinen erklärt wird (siehe Abb. 4 und 5). Wie bereits für LAMB1 beschrieben (Svensson et al., 2000), sind jedoch das letzte und drittletzte der I-Domänen Exons der MIKC^{*}-Typ Gene sehr kurz und kodieren nur für wenige AS (siehe Abb. 4 und 5).

Anhand der längeren I-Domänen und gemeinsamer Exon-Intron-Strukturmerkmale der *P. patens* MIKC^{*}-Typ Gene und *LAMB1* konnte *LAMB1* als MIKC^{*}-Typ MADS-Box-Gen identifiziert werden. Dies weist demnach auf eine relativ nahe Verwandtschaft zwischen den *P. patens* MIKC^{*}-Typ Genen und *LAMB1* hin. Allerdings ist die Sequenzähnlichkeit zwischen den *P. patens* MIKC^{*}-Typ Genen und *LAMB1* in paarweisen Sequenzvergleichen sehr gering. So weisen trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den *P. patens* MIKC^{*} Proteinen und *LAMB1*, z.B. PPM3 und *LAMB1* nur eine Identität von 26,9% auf (Ähnlichkeit 37,3%). Dagegen liegt die Ähnlichkeit innerhalb der *P. patens* MIKC^{*}-Typ Gene deutlich höher, z.B. zwischen PPM3 und PPM4 liegt die Identität bei 78% (Ähnlichkeit 82,7%).

3.1.7 Phylogenierekonstruktion der *P. patens* MADS-Box-Gene

Um die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den *P. patens* MADS-Box-Genen und den anderen bekannten MIKC-Typ MADS-Box-Genen zu bestimmen, wurden Phylogenierekonstruktionen durchgeführt. Es wurden verschiedene Datensätze von MIKC-Typ Proteinen der Gefäßpflanzen, inklusive *LAMB1*, und die abgeleiteten Genprodukte aller *P. patens* MADS-Box-Gene einbezogen. Der hierbei verwendete Satz von MIKC^c Proteinen der Samenpflanzen enthielt Vertreter aller bislang bekannten großen Subfamilien pflanzlicher MADS-Domänen-Proteine (Theißen et al., 1996; Becker et al., 2000; Theißen et al., 2000). Es wurden die Sequenzen der MADS- und K-Domänen für diese Art von Studien verwendet, da diese die am besten gesicherten Alignments ermöglichen. Eine Einbeziehung der I-Domäne in die Stammbaumberechnungen war auf Grund der extremen Längenheterogenitäten zwischen MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Proteinen nicht möglich. Bei einer Verwendung der MADS-Domäne alleine standen zu wenige informative Positionen für die Phylogenierekonstruktion zur Verfügung. Die Proteinsequenzen wurden vor Erstellung des zu Grunde liegenden Alignments so zurecht

geschnitten, daß nur eindeutig homologe Bereiche verglichen wurden und auch keine großen Längenunterschiede die Topologie des Baums beeinflussen konnten. Es wurden, bezogen auf Abb. 4 die Sequenzen der Positionen 14 - 74 und der Positionen 162 - 230 miteinander fusioniert und für die Phylogenierekonstruktion verwendet (Alignment siehe Anhang, 8.3). Entsprechend wurde mit allen übrigen Sequenzen verfahren. Desweiteren wurde von LAMB1 die Position 64 der MADS-Box entfernt (bezogen auf Abb. 4), um Längenunterschiede zu vermeiden. Das Alignment wurde unter Verwendung der Vorgabe Parameter 8 und 2 des PILEUP-Programmes errechnet und nachträglich an wenigen Stellen verschoben.

Ein repräsentatives Beispiel der erhaltenen phylogenetischen Rekonstruktionen ist in Abb. 6 dargestellt. Es zeigt, daß sowohl die MIKC^c-Typ Gene, als auch die MIKC^{*}-Typ Gene, mit hoher Bootstrap-Unterstützung jeweils zusammen gruppieren. Der Bootstrap-Wert beträgt 88%. Außerdem wird offensichtlich, daß die *P. patens* MIKC Proteine zwei gut unterstützte Kladen bilden, eine mit MIKC^c Proteinen, die andere mit MIKC^{*} Proteinen (siehe Abb. 6). Die hier gemachten Beobachtungen konnten durch unabhängige „Maximum likelihood“-Analysen bestätigt werden (Hasebe, persönliche Mitteilung).

In diesen Phylogenierekonstruktionen konnte keine Zugehörigkeit der *P. patens* MIKC^c-Typ Proteine zu einer der definierten Subfamilien der Farn- oder Samenpflanzen-MADS-Domänen-Proteine festgestellt werden (siehe Abb. 6). Allerdings bilden die *P. patens* MIKC^c Proteine häufig eine Schwester-Klade der GGM13-ähnlichen Proteine, den „B_{sister}-Proteinen“ (Becker et al., 2002). In den durchgeführten Phylogenierekonstruktionen lagen die MIKC^{*}-Typ Proteine häufig in der Nachbarschaft der CRM3-Genfamilie (siehe Abb. 6). Beide Topologien wurden jedoch nicht durch Bootstrap-Berechnungen unterstützt.

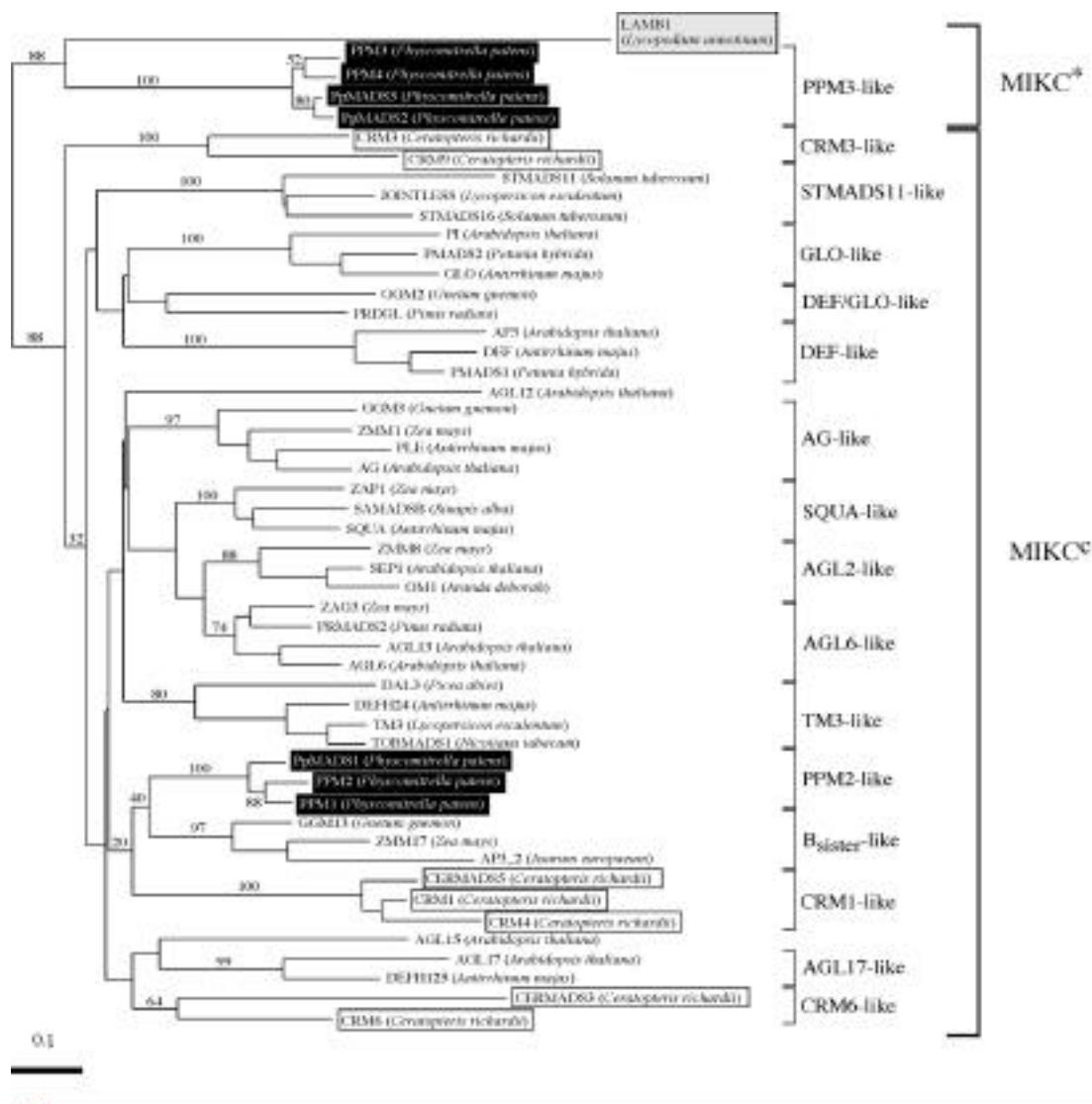


Abb. 6: Phylogenierekonstruktion einiger pflanzlicher MADS-Domänen-Proteine vom MIKC^c-Typ, sowie aller bekannter MADS-Domänen-Proteine vom MIKC⁺-Typ. Zur Erstellung des zugrunde liegenden Alignments wurden hauptsächlich die Sequenzen der MADS- und K-Domänen der Proteine verwendet. Die Namen der Arten aus denen die jeweiligen Gene stammen, sind in Klammern hinter den Proteinnamen aufgeführt. Proteine von *P. patens* sind durch schwarze Kästen hervorgehoben, das Protein LAMB1 aus *Lycopodium annotinum* ist durch einen grauen Kasten hervorgehoben, die der Farne durch weiße Kästen. Die Bootstrap-Werte von Verzweigungen, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, wurden angegeben. Die definierten Subfamilien, sowie die Klassen der MIKC^c- und MIKC⁺-Typ Gene sind durch Klammern am rechten Rand ausgewiesen.

3.1.8 Strukturanalyse der *P. patens* MIKC^c-Typ Proteine

Auf Grund des nicht aufgelösten „deep branchings“ der Genstammbäume konnten nur schwache Hinweise auf die verwandtschaftliche Zugehörigkeit der *P. patens* MIKC^c-Typ Gene zu den definierten MADS-Box-Genfamilien gewonnen werden. Daher wurden die *P. patens* MIKC^c-Typ Proteine weiteren Analysen unterzogen, um eventuell vorhandene Sequenzmotive, Indels im Alignment oder andere gemeinsame Struktureigenschaften zwischen den *P. patens* Proteinen und den MIKC^c-Typ Proteinen aus höheren Pflanzen zu identifizieren.

Ein bekanntes Subfamilien-spezifisches Kriterium ist die Länge der I-Domäne (Riechmann und Meyerowitz, 1997), der eine Funktion bei der Bestimmung der Dimerisierungseigenschaften von MADS-Domänen-Proteinen zugeschrieben wird. Daher wurde die durchschnittliche Länge der I-Domäne verschiedener Subfamilien (errechnet aus drei zufällig gewählten Mitgliedern) mit der Länge der I-Domäne der *P. patens* MIKC^c-Typ Proteine verglichen (siehe Abb. 7a). Es zeigte sich, daß die *P. patens* MIKC^c-Typ Proteine mit einer durchschnittlichen I-Domänenlänge von 30,75 AS zur Gruppe der Subfamilien mit relativ kurzer I-Domäne gehörten. Kurze I-Domänen sind ebenfalls charakteristisch für CRM1-, GLOBOSA-, DEFICIENS- und DEF/GLO-ähnliche Proteine, sowie für Proteine aus der B_{sister}-Subfamilie.

Weiterhin wurde das Auftreten von bekannten AS-Sequenz-Motiven aus den MADS-Domänen-Proteinen höherer Pflanzen und Farne in den *P. patens* MIKC^c-Typ Proteinen untersucht. Hierbei zeigte sich, daß das C-terminale „sieben AS-Motiv“ zahlreicher AGAMOUS-ähnlicher Proteine auch in den *P. patens* MIKC^c-Typ Proteinen vorhanden ist. Im Gegensatz zu den AGAMOUS-ähnlichen Proteinen befindet sich dieses Motiv bei den *P. patens* Proteinen nicht am Terminus der C-Domäne, wobei allerdings die relative Entfernung des Motivs zum C-terminalen Ende der K-Domäne bei den *P. patens* Proteinen und bei den AGAMOUS-ähnlichen Proteinen gleich ist. Ein sieben AS-Motiv gleicher Position wie in den *P. patens* Proteinen wurde darüberhinaus auch im CRM6-Protein aus dem Farn *Ceratopteris* identifiziert (siehe Abb. 7b).

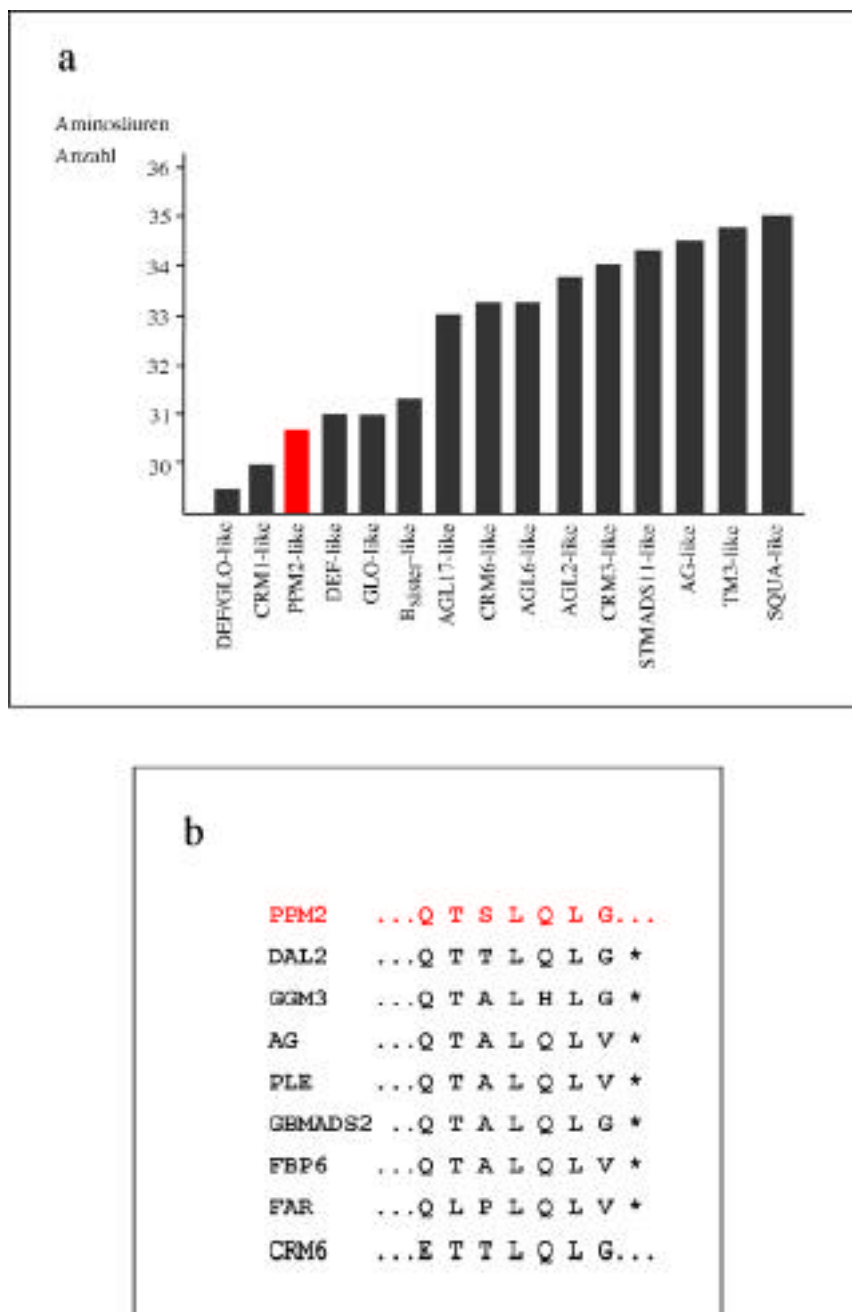


Abb. 7: (a) Vergleich der durchschnittlichen Aminosäure-Anzahl der I-Region einiger bislang definierter MIKC^c-Typ MADS-Domänen-Protein-Subfamilien. Die Länge der I-Region der PPM2-ähnlichen Proteine ist rot hervorgehoben. (b) Sequenzvergleich eines sieben Aminosäure-Motivs in der C-Region von PPM2, CRM6 und den C-Funktionsproteinen der AGAMOUS-Subfamilie. Stopkodons sind durch Sternchen dargestellt.

3.1.9 Abschätzung der MADS-Box-Gen-Anzahl im Genom von *P. patens*

Zur Abschätzung der MADS-Box-Gen Anzahl im Genom von *P. patens* wurde ein genomischer Southern-Filter von *P. patens* mit genspezifischen Sonden, die den Bereich der MADS-Box enthielten, unter Bedingungen moderater Stringenz hybridisiert (siehe 2.15). Da die zwei Typen von MADS-Box-Genen, die im Genom von *P. patens* vorkommen, sich nicht nur strukturell, sondern auch hinsichtlich ihrer Sequenzen stark unterscheiden, wurde je eine MIKC^c-Typ- und eine MIKC^{*}-Typ-Sonde in getrennten Hybridisierungen eingesetzt. Nach Hybridisierung des Filters mit *PPM2*-, bzw. *PPM3*-spezifischen Sonden, entstanden in den entsprechenden Autoradiographien mindestens fünf bis acht Signale pro Spur (siehe Abb. 8). Durch Vergleich der Signale konnte gezeigt werden, daß die Bandenmuster aus beiden Hybridisierungen nicht überlappend sind (siehe Abb. 8). Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß jeweils mindestens fünf Gene vom MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ im Genom von *P. patens* vorkommen.

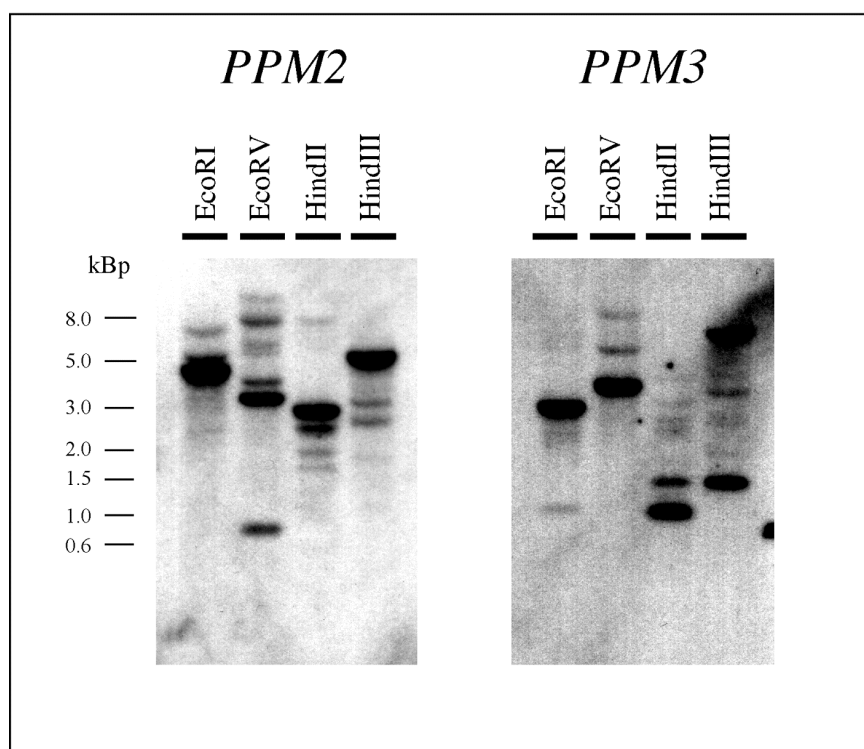


Abb. 8: Autoradiographie einer genomischen Southern-Hybridisierung zur Abschätzung der Anzahl von MADS-Box-Genen in *Physcomitrella patens*. Je 10 µg *P. patens* DNA, die mit den Enzymen *EcoRI*, *EcoRV*, *HindII* oder *HindIII* verdaut worden waren, wurden in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten *PPM2*-spezifischen und *PPM3*-spezifischen Sonden, die den Bereich der MADS-Box enthielten, erfolgte bei 55°C und das anschließende Waschen des Filters mit moderater Stringenz.

3.1.10 Vorläufige Bestimmung der putativen Transkriptionsstarts von *PPM2* und *PPM3*

Die Bestimmung der putativen Transkriptionsstarts von *PPM2* und *PPM3* erfolgte mittels 5'RACE-PCR (siehe 2.12.4). Hierzu wurde RNA aus jungen und alten Gametophyten in getrennten Ansätzen verwendet, so daß je zwei unabhängige Bestimmungen pro Gen erfolgten. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in pGEM-T kloniert. Die Sequenzierung von sieben Klonen pro Ansatz ergab, daß der putative Transkriptionsstart von *PPM3* 381 Bp stromaufwärts des Startkodons ATG liegt. Desweiteren konnten zwei putative Transkriptionsstarts von *PPM2* gefunden werden. Einer liegt 219 Bp stromaufwärts des Startkodons ATG, der andere 555 Bp (siehe Abb. 9). Das Vorkommen von zwei putativen Transkriptionsstarts bei *PPM2* wird durch Northern-Hybridisierungen nahegelegt, in denen zwei Fragmente im WT von *P. patens* mit einer *PPM2*-spezifischen Sonde unter stringenten Bedingungen detektiert wurden (siehe Abb. 13).

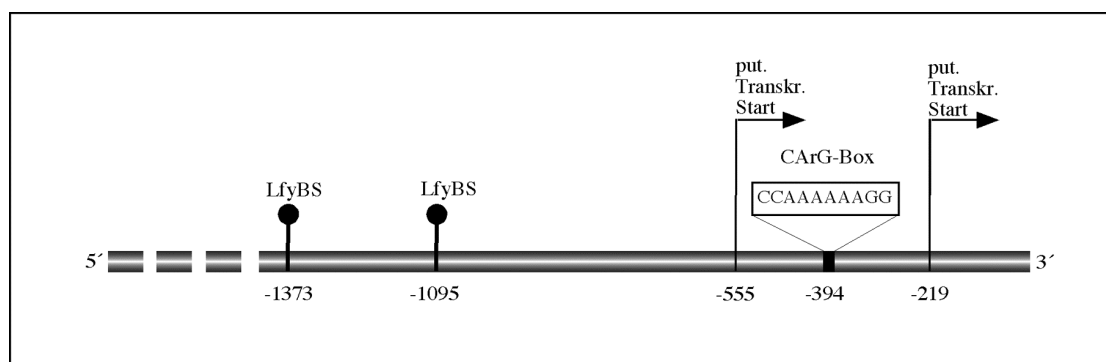


Abb. 9: Schematische Darstellung des putativen Promotorbereichs von *PPM2*. Die beiden putativen Transkriptionsstarts von *PPM2* sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Ein CArG-Box Motiv und putative LEAFY-Bindungsstellen sind ausgewiesen. Die Positionen innerhalb der Sequenz sind relativ zum Translationsstartpunkt ATG=+1 angegeben.

3.1.11 Analyse putativer Promotor-Bereiche von *PPM1* - *PPM4*

Es konnten durch die Methode der genomischen Linker PCR Bereiche stromaufwärts des Startkodons ATG (5'UTR und putative Promotor-Bereiche) von *PPM1* - *PPM4* isoliert werden (siehe 2.12.7). Die 378 Bp (*PPM1*), 1915 Bp (*PPM2*), 1072 Bp (*PPM3*) und 377 Bp (*PPM4*) großen Fragmente wurden mit Hilfe der „TFMATRIX transcription factor binding site profile database“ (Heinemeyer et al., 1998, GBF-Braunschweig) und der Nukleinsäure-Motivsuche Analyse-Anwendungen des MacVektor-Programmpaketes auf Sequenzmotive hin untersucht, die typisch für pflanzliche Promotorbereiche sind. Diese Sequenzanalyse brachte für *PPM1* - *PPM4* zahlreiche verschiedene Bindestellen, darunter z.B. LEAFY-Bindestellen (Konsensus-Sequenz

CCANTG) (Busch et al., 1999) in den putativen Promotoren von *PPM1*, *PPM2* und *PPM3*, wie für *PPM2* in Abb. 9 dargestellt.

Desweiteren befindet sich im putativen Promotor-Bereich von *PPM2* eine „CArG-Box“ (CCAAAAAAGG) 394 Bp stromaufwärts des Startkodons ATG (siehe Abb. 9). Die CArG-Box ist ein typisches Promotorelement der MADS-Box-Gene, wobei hier MADS-Domänen-Transkriptionsfaktoren selbst binden (Schwarz-Sommer et al., 1992). Dieses CArG-Box Motiv liegt zwischen den beiden putativen Transkriptionstarts von *PPM2* (siehe 3.1.10 und Abb. 9).

3.2 Funktionelle Charakterisierung der *Physcomitrella patens* MADS-Box-Gene

3.2.1 Untersuchungen zum Expressionsmuster von *PPM1* - *PPM4* im Wildtyp von *P. patens*

Um das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der einzelnen *P. patens* MADS-Box-Gene zu analysieren wurden RT-PCR Analysen durchgeführt (siehe 2.12.5), wobei RNA aus repräsentativen Stadien des Lebenszyklus von *P. patens* verwendet wurde (siehe 2.10.3). Unter den Stadien waren eine Woche altes Protonema, acht Wochen alte Gametophoren, dreizehn Wochen alte Gametophoren zwei Wochen nach Induktion der Sporophyten-Bildung, sowie 24 Wochen alte Gametophoren mit männlichen und weiblichen Gametangien, als auch verschieden alten diploiden Sporophyten ausgewählt worden. Es wurden Standard-PCR mit genspezifischen Primern auf die in cDNA umgeschriebene RNA durchgeführt, wobei 40 PCR-Zyklen benötigt wurden, da die *P. patens* MADS-Box-Gene sehr schwach exprimiert sind. Die Expressionsanalyse ergab, daß drei der *P. patens* MADS-Box-Gene, *PPM1*, *PPM2* und *PPM3*, ubiquitär exprimiert sind, wobei die Expression von *PPM1* in 24 Wochen alten Gametophoren etwas geringer ist, als in den übrigen Stadien (siehe Abb. 10). Dagegen nimmt die Expression von *PPM4* schrittweise in den älteren Stadien des Lebenszyklus von *P. patens* ab. Während im Protonema-Stadium ein hohes Expressionsniveau nachgewiesen wurde, nimmt dieses in der achten und dreizehnten Woche ab und bei 24 Wochen alten Gametophoren waren keine *PPM4* Transkripte mehr vorhanden (siehe Abb. 10).

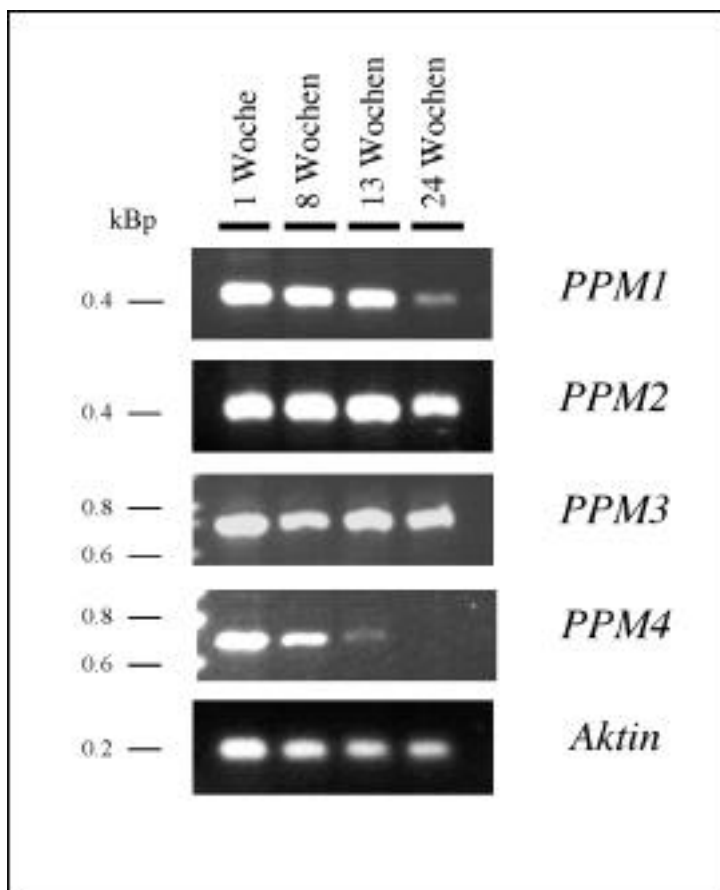


Abb. 10: Expressionsanalyse der *P. patens* MADS-Box-Gene *PPM1* – *PPM4* mittels RT-PCR. Als PCR-Primer wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet; es wurden 40 Zyklen einer Standard-PCR durchgeführt; 1/10 Volumen der PCR-Produkte wurde in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Reaktionskontrolle wurden PCR mit Aktin-spezifischen Primern durchgeführt.

1 Woche: Protonema, sieben Tage nach Propagation.

8 Wochen: Gametophoren, acht Wochen nach Propagation.

13 Wochen: Gametophoren, dreizehn Wochen nach Propagation, zwei Wochen nach Induktion der Sporophyten-Bildung.

24 Wochen: Gametophoren mit Gametangien und Sporophyten verschiedenen Reifegrades, 24 Wochen nach Propagation.

3.2.2 Herstellung von *PPM2* und *PPM3* knock-out Linien von *P. patens*

Zur Aufklärung der Funktion von *PPM2* und *PPM3* durch gezieltes Ausschalten der Gene wurden genspezifische knock-out Vektoren auf Ebene der cDNA-Sequenzen hergestellt (Henschel, 1999). Diese knock-out Vektoren (pJRK445 für *PPM2* und pJRK71 für *PPM3*) enthielten etwa 500 Bp lange cDNA-Fragmente stromauf- und stromabwärts einer NPTII-Selektionskassette, entsprechend der Orientierung im Gen selbst. Die Konstrukte wurden als lineare Fragmente zur PEG-vermittelten Transformation der *P. patens* Protoplasten eingesetzt (siehe 2.5). Nach der

Selektion auf Paramomycin-haltigem Medium wurden ca. 100 Linien pro knock-out Konstrukt erhalten, von denen jeweils 40 in eine dauerhafte Kultur überführt wurden.

Ein PCR-Test auf zufällig ausgewählte Linien ergab, daß in beiden Fällen über 90% der Linien das knock-out Konstrukt enthielten. Als nächstes sollte überprüft werden, ob bei den transgenen Moos-Linien tatsächlich auch der genspezifische Locus getroffen ist. Zunächst wurde versucht, die Insertion der knock-out Konstrukte in die spezifischen genomischen Loci mittels PCR-Analysen nachzuweisen. Hierbei wurden Primern aus den flankierenden genomischen Bereichen, die gegeneinander oder gegen knock-out Konstrukt interne Primer gerichtet waren, verwendet. Es konnten jedoch keine interpretierbaren Signale erhalten werden. Um dennoch zu zeigen, daß es sich bei den transgenen Linien um knock-out Linien handelt, wurden genomische Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Im Fall einer Integration des knock-out Konstruktes in den genomischen Locus sollte das genspezifische Signal im Southern-Blot eine veränderte Größe haben. Die molekulare und phänotypische Analyse der *PPM2* und *PPM3* knock-out Linien wird im folgenden getrennt dargestellt.

3.2.3 Molekulare Analyse der putativen *PPM3* knock-out Linien

Von *PPM3* wurden die putativen knock-out Linien A, D, E, G, I, L, Q und W exemplarisch ausgewählt, da bislang keine phänotypischen Unterschiede zwischen den transgenen Linien und Wildtyp festgestellt werden konnten.

Zunächst wurde die DNA der transgenen *P. patens* Linien mit *EcoRV* verdaut. *EcoRV* schneidet im genomischen Locus von *PPM3* an Position 1732, bzw. zweimal im knock-out Konstrukt. Zur Southern-Hybridisierung wurde eine *PPM3*-spezifische Sonde verwendet, die den Bereich der MADS-Box nicht enthielt.

Nach Entwicklung der Autoradiographie wurde in der Wildtyp-Spur (WT) ein Signal erwarteter Größe detektiert, welches mit einem Pfeil gekennzeichnet ist (siehe Abb. 11b), sowie ein zweites, welches in vergleichbaren Experimenten nicht auftrat (siehe Abb. 3) und eventuell auf einen unvollständigen Verdau zurückzuführen ist.

In den Linien E und Q trat jeweils nur ein Signal auf, welches die Größe des WT-Fragmentes hatte (siehe Abb. 11b). Dagegen traten in den Spuren A, D, G, I, L und W zahlreiche Banden unterschiedlicher Größen auf (siehe Abb. 11a und b). Diese gehen wahrscheinlich auf eine komplexe Insertion zahlreicher knock-out Konstrukte in der genomischen DNA der putativen *PPM3* knock-out Linien zurück. Bei kurzer Exposition der Autoradiographie war der *PPM3* WT-Lokus nicht sichtbar, so daß nicht beurteilt werden konnte, ob der WT-Lokus in den putativen *PPM3* knock-out Linien tatsächlich getroffen ist. Dagegen war nach längerer Expositionsdauer der Bereich des erwarteten WT-Signals durch die hohe Signaldichte nicht sichtbar, so daß eine

Aussage darüber, ob der *PPM3* WT-Lokus getroffen ist, mit Ausnahme von Linie W, nicht möglich ist (siehe Abb. 11b). Nur in der Spur W ist ein Signal auf Höhe des WT-Signals sichtbar, so daß hieraus geschlossen werden kann, daß der durch diese Sonde detektierte Bereich des *PPM3* WT-Lokus nicht getroffen ist (siehe Abb. 11b).

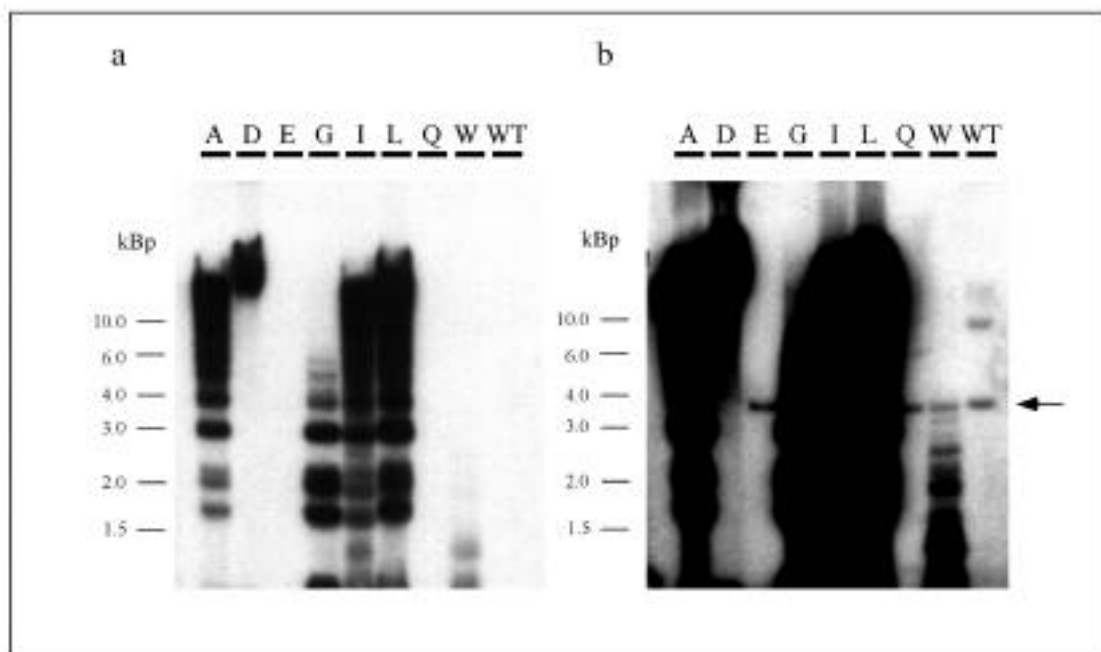


Abb. 11: Autoradiographien einer genomischen Southern-Analyse der putativen *PPM3* knock-out Linien. Die genomische DNA wurde mit dem Enzym *EcoRV* verdaut und in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt, welches auf eine Nylonmembran geblottet wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *PPM3*-spezifischen Sonde, die den Bereich der MADS-Box nicht enthielt bei 68°C und das anschließende Waschen mit hoher Stringenz. (a) kurze Expositionsdauer der Autoradiographie; (b) lange Expositionsdauer der Autoradiographie. Der erwartete WT-Lokus von *PPM3* ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Um zu zeigen, daß der genomische Lokus von *PPM3* getroffen ist, und um den Bereich von *PPM3* eingrenzen zu können, der durch das knock-out Konstrukt verändert ist, wurde die DNA der putativen knock-out Linien mit dem Enzym *SfiI* verdaut. *SfiI* schneidet im genomischen Lokus von *PPM3* dreimal, an Position 171, 2678 und 4064, wodurch zwei Fragmente bekannter Größe entstehen. Das 5' Fragment, welches den Bereich vom Promotor bis zum fünften Intron enthält, hat eine Größe von 2500 Bp, das 3' Fragment, das den Bereich stromabwärts des fünften Introns bis zum neunten Intron enthält, ist 1386 Bp lang. *SfiI* schneidet nicht im knock-out Konstrukt.

Bei einer Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Promotor, die das knock-out Konstrukt nicht erkennt, entstanden nur Signale des 5' Fragmentes von 2500 Bp, sowohl in WT, als auch in den

putativen knock-out Linien. Die Hybridisierung mit einer Sonde aus dem sechsten Intron von *PPM3* dagegen zeigte, daß das 3' Fragment von etwa 1,4 kBp in den Linien A, D, G, I, L und W durch ein Signal einer Größe von mindestens 20 kBp ersetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Molekulare Analyse der putativen *PPM2* knock-out Linien

Auch die Analyse der *PPM2* knock-out Linien erfolgte in mehreren Schritten. Es war die DNA der Linien E, F, H, I, K, L, O, P, Q, R, S, T, V, Y und Z präpariert worden. Die DNA dieser putativen *PPM2* knock-out Linien wurde mit *EcoRV* verdaut. *EcoRV* führt im Fall des WT-Lokus zu einem 3484 Bp großen 5' Fragment, welches den Bereich Promotor Position 606 bis siebtes Intron Position 4089 umfaßt. Daneben entsteht ein 873 Bp großes 3' Fragment, Position 4090 bis 4962. Darüberhinaus befinden sich zwei *EcoRV*-Schnittstellen im *PPM2* knock-out Konstrukt, davon eine in der Selektionskassette an Position 496 und eine am 3' Ende des 3' cDNA Fragmentes. Diese entspricht der Schnittstelle von Position 4962 des genomischen Fragments. Unter Annahme von homologer Rekombination mittels „Allele Replacement“ fällt die *EcoRV*-Schnittstelle im siebten Intron weg und der genomische Locus von *PPM2* wird nun auf Grund der Schnittstelle in der Selektionskassette in zwei Fragmente geschnitten, ein 5' Fragment von 3599 Bp und ein 3' Fragment von 2312 Bp, wobei entweder die Schnittstelle des 3' cDNA Fragmentes oder die des genomischen Fragmentes erkannt wird.

Nach Hybridisierung mit einer *PPM2* cDNA-Sonde ohne MADS-Box wurde im WT und in allen untersuchten Linien das 3' Fragment des genomischen Locus von 873 Bp detektiert (Daten nicht gezeigt). Das 5' Fragment von 3,48 kBp wurde im WT und in den Linien F, H, I, K, L, O, Q, S, V, Y und Z nachgewiesen (siehe Abb. 12). In den Linien E, P, R und T trat dieses 3,48 kBp Fragment nicht auf. Stattdessen entstand in den Linien E, P und T ein Signal von etwa 10 kBp und in der Linie R von etwa 6 kBp.

Hieraus wurde geschlossen, daß die Linien E, P, R und T *PPM2* knock-out Linien sind, bei denen eine oder wenige Kopien des knock-out Konstruktes im 5' Bereich des genomischen Locus inseriert sind.

Aus der Größenzunahme des 5' Fragmentes und der Erhaltung des 3' Fragmentes kann geschlossen werden, daß kein „Allele Replacement“ mittels „Doppel-Crossing-over“ stattgefunden hat.

Weiterhin kann aus der Größenzunahme des 5' Fragmentes der Linie R um etwa 2,7 kBp, was einer einfachen knock-out Konstrukt Länge entspricht, geschlossen werden, daß wahrscheinlich eine Kopie des knock-out Konstruktes in das 5' Fragment inseriert wurde. Demgegenüber wurden in den Linien E, P und T wahrscheinlich mindestens drei Kopien des knock-out Konstruktes ins

5'Fragment inseriert. Das Fehlen eines Konstrukt-internen Fragmentes von 2312 Bp nach *EcoRV*-Verdau zeigte, daß die *EcoRV*-Schnittstellen im knock-out Konstrukt nicht erkannt worden sind.

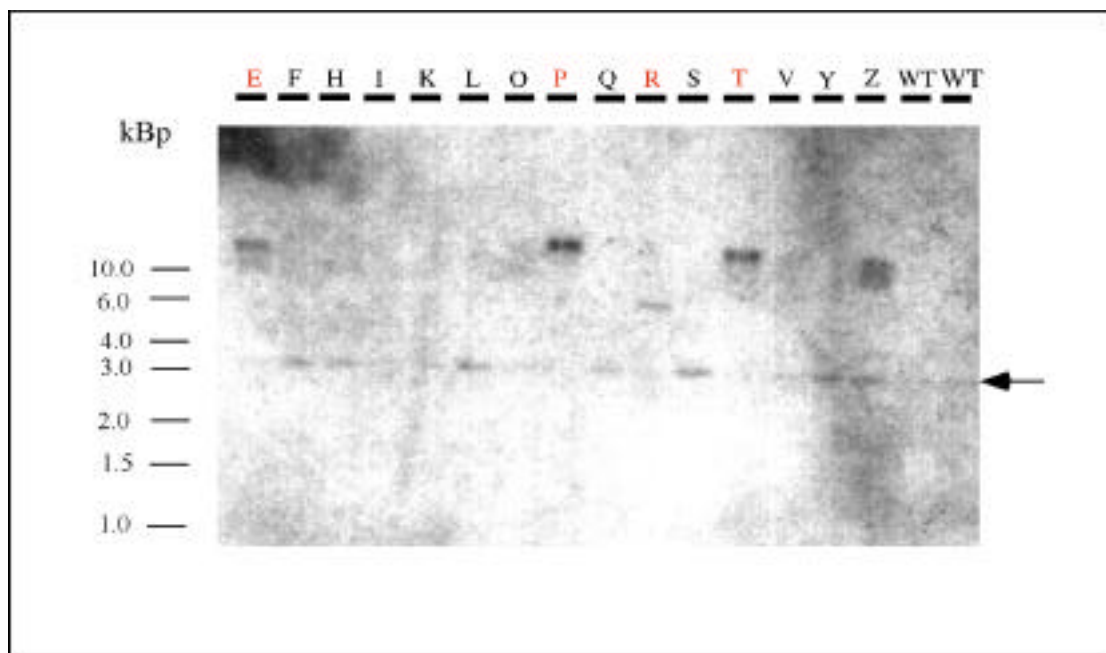


Abb. 12: Autoradiographie der molekularen Analyse putativer *PPM2* knock-out Linien mittels genomischer Southern-Hybridisierung. Die genomische DNA war mit dem Enzym *EcoRV* verdaut worden. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *PPM2*-spezifischen Sonde ohne MADS-Box bei 68°C und das anschließende Waschen erfolgte mit hoher Stringenz. Das detektierte 5'Fragment des *PPM2* WT-Lokus ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Spuren der transgenen Linien E, P, R und T sind rot markiert, da bei ihnen das 5'Fragment des *PPM2*-Lokus auf einem größeren Fragment liegt.

3.2.5 Untersuchung der *PPM2*-Expression in den *PPM2* knock-out Linien

Um nachzuweisen, daß in den putativen *PPM2* knock-out Linien kein *PPM2* Transkript mehr gebildet wird, wurden Expressionsanalysen mittels Northern-Hybridisierungen durchgeführt. Für die Expressionsanalysen wurde etwa fünf Wochen altes Moosmaterial von WT und den Linien E, P, R und T geerntet, was unter gleichen Bedingungen (24°C; NH₄-Tartrat haltige Platten) angezogen worden war. Zu diesem Zeitpunkt lagen bei E und P große Gametophoren vor, bei WT und den Linien R und T war Protonema mit kleinen Gametophoren enthalten. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *PPM2* cDNA-Sonde, die den Bereich der MADS-Box enthielt, um auch eventuell vorkommende partielle *PPM2*-Transkripte in den knock-out Linien nachweisen zu können.

Nach Entwicklung der Autoradiographie konnten in der WT-Spur zwei Signale von etwa 1,4 kB und 1,7 kB detektiert werden (siehe Abb. 13). Dagegen konnte in den *PPM2* knock-out Linien E und P kein *PPM2*-Transkript nachgewiesen werden. In den Linien R und T wurde ein Signal nachgewiesen, das jedoch eine leicht veränderte Größe gegenüber dem 1,7 kB Signal aus WT aufweist und dessen Signalstärke um das 10 bis 20fache gegenüber dem *PPM2*-Signal aus WT reduziert ist. Hinweise auf partielle *PPM2*-Transkripte ergaben sich in keiner der untersuchten Linien (siehe Abb. 13).

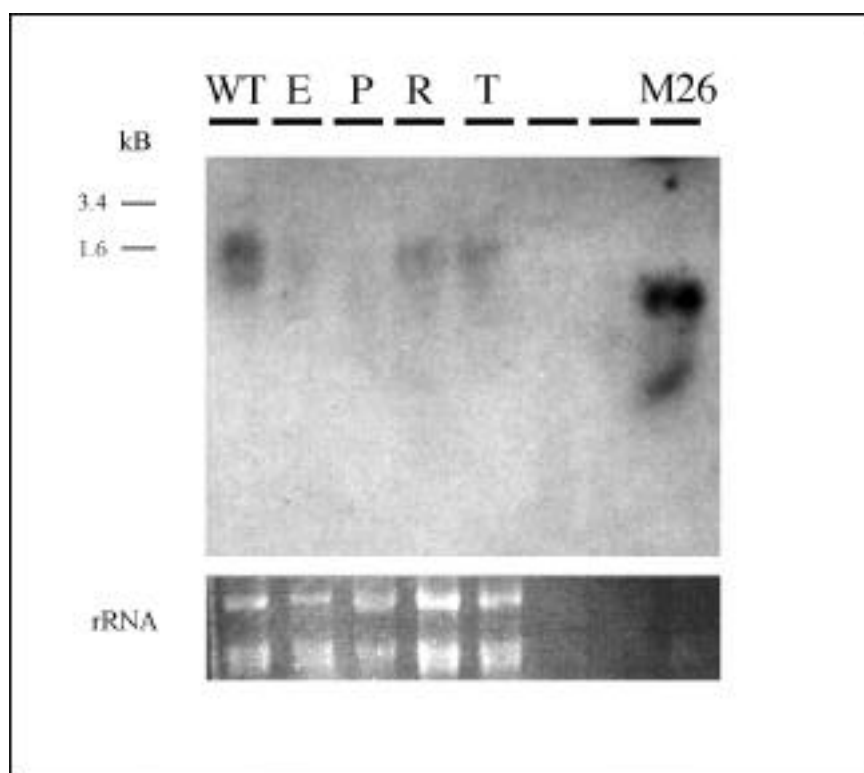


Abb. 13: Autoradiographie einer Northern-Hybridisierung mit *PPM2*-spezifischer Sonde unter Bedingungen hoher Stringenz. Aufgetragen ist RNA aus Pflanzenmaterial fünf Wochen nach Propagation von *P. patens* WT, von den putativen *PPM2* knock-out Linien E, P, R und T, sowie von der 35S::*PPM2* Überexpressionslinie M26. Es wurde zehnmal weniger M26 RNA auf das Gel aufgetragen. Als Beladungskontrolle dienen die Ethidiumbromid gefärbten rRNA-Banden.

3.2.6 Phänotypische Analyse der *PPM2* knock-out Linien

Die *PPM2* knock-out Linien E, P, R und T wurden zur phänotypischen Analyse unter verschiedenen Bedingungen angezogen. Dies geschah stets im Vergleich zum WT, um Umweltbedingungen als Ursache möglicher Veränderungen auszuschließen. Die *P. patens* Linien wurden parallel auf Minimal-Medium und auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium bei unterschiedlichen Temperaturen (17°C und 24°C) und an verschiedenen Standorten (geringe und hohe Lichtdosis) angezogen. Material von den NH₄-Tartrat-haltigen Platten wurde alle zwei bis vier Wochen durch Fragmentierung vermehrt. Auf Minimal-Medium gewachsene Gametophoren wurden zur Vollendung des Lebenszyklus unter induktiven Bedingungen bei 17°C gehalten. Hierbei konnte festgestellt werden, daß sich die *PPM2* knock-out Linien hinsichtlich der Morphologie der Gametophoren, der Ausbildung von männlichen und weiblichen Gametangien, der sich anschließenden Entstehung und Entwicklung von Sporophyten, sowie deren Reifung, unter allen gewählten Kulturbedingungen nicht vom WT unterscheiden.

Allerdings zeigte sich, daß die *PPM2* knock-out Linien E und P sich vom WT und den *PPM2* knock-out Linien R und T dadurch unterscheiden, daß sie unmittelbar nach dem Propagieren mit der Gametophoren-Bildung beginnen. Dies ist unabhängig davon, ob sie auf Minimal-Medium oder auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium, wo die Ausbildung von Gametophoren verzögert ist, ausgebracht werden. Dagegen werden bei WT auf Minimal-Medium nach etwa 13 Tagen die ersten Knospen der Gametophoren gebildet, auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium dagegen nach etwa vier Wochen.

Nach 22 Tagen auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium ist im WT und in den *PPM2* knock-out Linien R und T nur Protonema vorhanden. Dagegen sind in den Linien E und P bereits große Gametophoren gebildet worden (siehe Abb. 14).

Nach 42 bis 44 Tagen ist kaum noch ein Unterschied zwischen WT, R, T und den Linien E, P sichtbar, da auch im WT und den *PPM2* knock-out Linien R und T Gametophoren gebildet worden waren. Ein Unterschied besteht allerdings darin, daß bei WT, R und T zusätzlich deutliches Protonema vorliegt, welches in E und P nicht in dem Maße gebildet wurde (siehe Abb. 15).

Nach 6 Monaten wurden in WT und allen *PPM2* knock-out Linien dichte Gametophoren-Polster gebildet. Dabei ist in WT und den Linien R und T weiterhin sichtbares Protonema vorhanden (siehe Abb. 16).

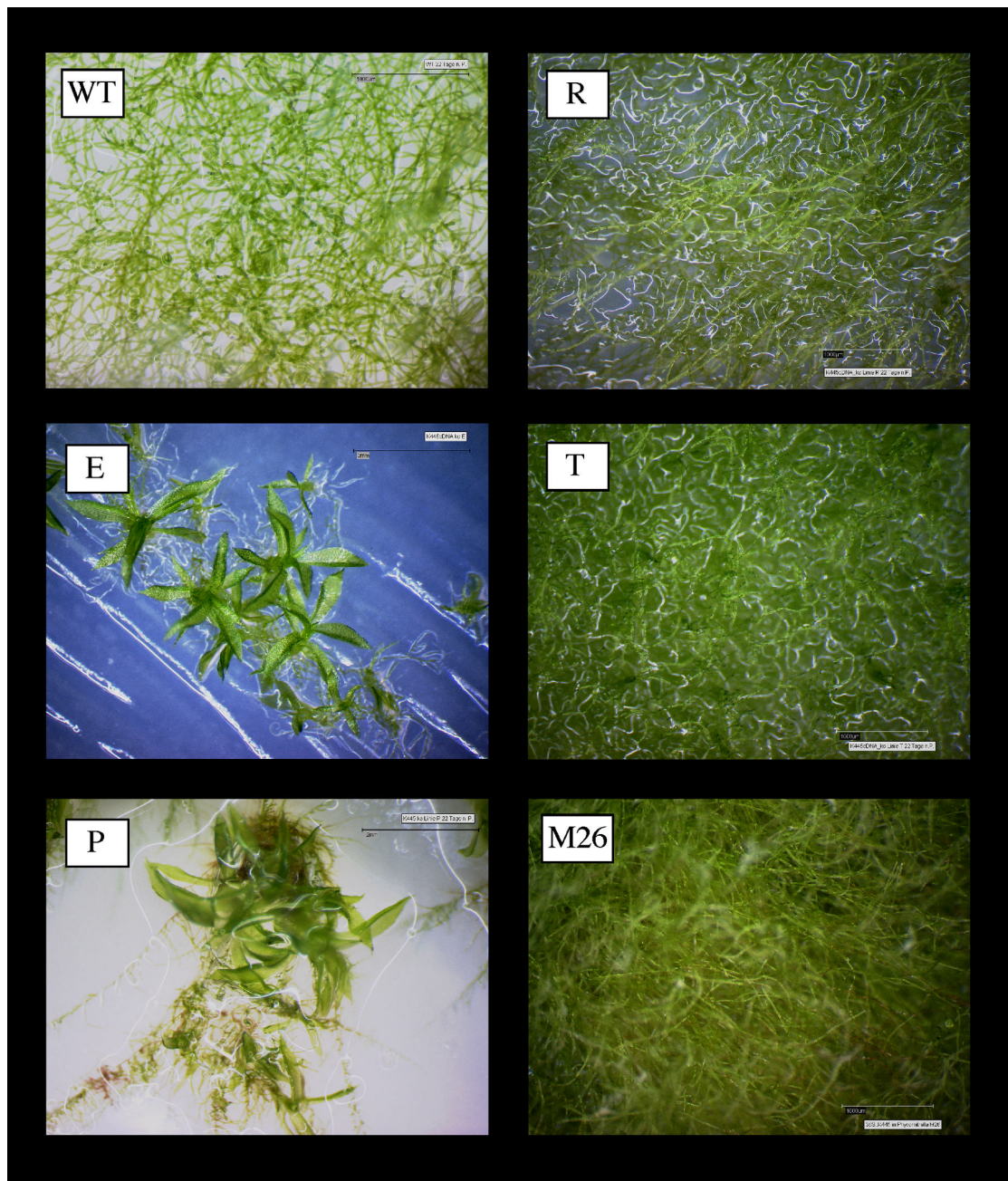


Abb. 14: Lupenaufnahmen 22 Tage nach Propagation von *P. patens* WT, von den *PPM2* knock-out Linien E, P, R und T, sowie der *35S::PPM2* Überexpressionslinie M26. Bei WT und den Linien R, T und M26 wurde nur Protonema gebildet, die *PPM2* knock-out Linien E und P haben bereits größere Gametophoren ausgebildet. In diesen beiden Linien ist kein flächiges Protonema gewachsen.

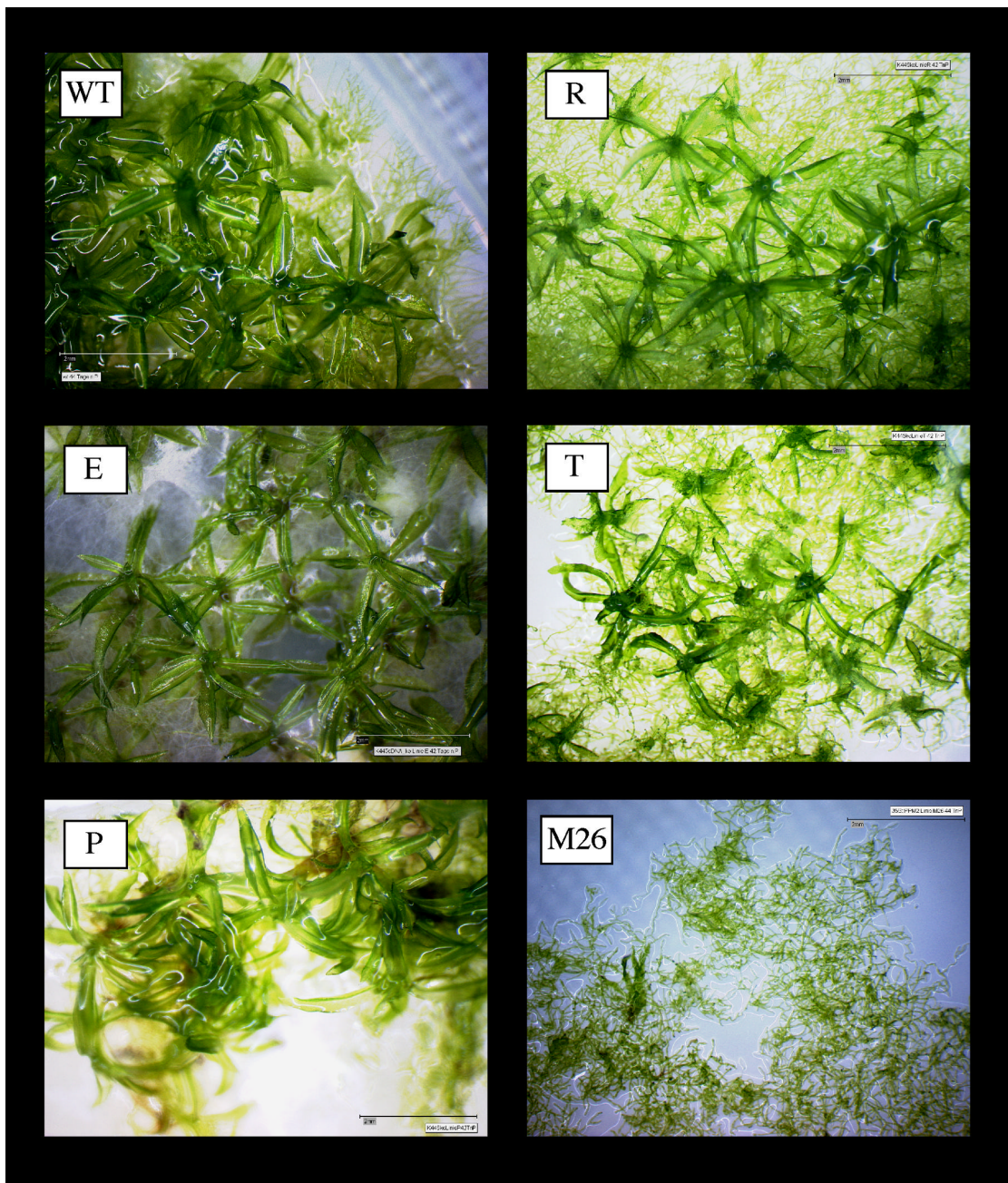


Abb. 15: Lupenaufnahmen 44 Tage nach Propagation von *P. patens* WT, im Vergleich zu den *PPM2* knock-out Linien E, P, R und T, sowie der *35S::PPM2* Überexpressionslinie M26. Bei WT und den Linien E, P, R und T sind Gametophoren gebildet worden, die Überexpressionslinie M26 liegt im Protonema-Stadium vor.

Abb. 16: Lupenaufnahmen 6 Monate nach Propagation von *P. patens* WT und den *PPM2* knock-out Linien E, P, R und T, sowie der *35S::PPM2* Überexpressionslinie M26. Bei WT und den Linien E, P, R und T sind Gametophoren-Polster gebildet worden. Bei M26 wurde fast ausschließlich Protonema gebildet, sehr vereinzelt auch Gametophoren.

3.2.7 Überexpression von *PPM2* in *P. patens*

Das *P. patens* MADS-Box-Gen *PPM2* wurde unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors in *P. patens* ektopisch überexprimiert. Aus der PEG-vermittelten Protoplasten-Transformation konnte nach abgeschlossener Selektion nur eine 35S::*PPM2* transgene Linie, M26, in eine dauerhafte Kultur überführt werden. Daß es sich bei M26 um eine starke Überexpressionslinie handelt, konnte durch Northern-Analysen gezeigt werden (siehe Abb. 13). Das *PPM2*-Expressionsniveau war einer computergestützten Auswertung der Signalintensität zufolge in M26 gegenüber dem WT um das hundertfache erhöht (siehe Abb. 13).

Die Überexpressions-Linie M26 wurde parallel zu den *PPM2* knock-out Linien und dem WT unter verschiedenen Bedingungen angezogen, sowohl auf Minimal-Medium, als auch auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium. Dem Medium wurde das Antibiotikum Paramomycin zugefügt, da es sich bei M26 um eine un stabile Linie handelt, die das Konstrukt bei Nachlassen des Selektionsdruckes verliert (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu WT, der nach der Propagation, auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium, nach vier Wochen filamentösen Protonema-Wachstums mit der Gametophoren-Bildung begann, verharrte die Überexpressions-Linie M26 im Protonema-Stadium (siehe Abb. 14-16). Dieses Verharren im Protonema-Stadium war nicht nur auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium der Fall, welches bevorzugt zu Protonema-Wachstum führt, sondern auch auf Minimal-Medium. Auch die Temperatur hatte hierauf keinen Einfluß. Es entstanden nach Kulturzeiten von 44 Tagen vereinzelt Gametophoren (siehe Abb. 15 und 16), die bislang jedoch trotz induktiver Bedingungen über einen Zeitraum von vier Monaten noch keine Gametangien bildeten.

3.2.8 Expression von *PPM2* und *PPM3* im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*

Die beiden *P. patens* MADS-Box-Gene *PPM2* und *PPM3* wurden im Rahmen der Funktionsanalysen in Wildtyppflanzen von *A. thaliana* unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors exprimiert. Diese Expression von *P. patens* MADS-Box-Genen im heterologen System wurde durchgeführt, da Untersuchungen der Proteinstruktur von *P. patens* MIKC^c-Typ Genen Ähnlichkeiten sowohl zu AGAMOUS-ähnlichen Proteinen, den DEFICIENS- und GLOBOSA-ähnlichen Proteinen und zu den B_{sister}-Proteinen aufgezeigt hatten (siehe 3.1.8).

Die phänotypische Analyse der 35S::*PPM2* und 35S::*PPM3* transgenen Pflanzen, sowie die molekulare Analyse der 35S::*PPM2* transgenen Pflanzen erfolgten in der T2-Generation.

Aus der Transformation von *A. thaliana* (Ökotyp Col-0) mit 35S::*PPM3* sind in der T1-Generation 50 Basta-resistente Pflanzen hervorgegangen, von denen 23 in der T2-Generation analysiert wurden. Die Samen wurden parallel zu den Wildtyp-Samen ausgebracht und parallel zu

diesen angezogen. In der T2-Generation erfolgte keine Basta-Selektion. Die heranwachsenden Pflanzen wurden wöchentlich miteinander verglichen, um eventuelle Abweichungen bei den Transformanten festzustellen. Hierbei erfolgte die Analyse sowohl hinsichtlich zeitlicher Aspekte, wie z.B. Keimung und Blühzeitpunkt, als auch hinsichtlich morphologischer Aspekte, wie z.B. Blatt- oder Blütenmorphologie. Bei dem Vergleich der 35S::*PPM3* Pflanzen mit dem WT fielen keine Unterschiede auf. So setzte z.B. die Blütenbildung zur gleichen Zeit ein, die Blüten wiesen denselben Phänotyp auf und der Samenansatz erfolgte zur gleichen Zeit, wobei die Schoten identischer Gestalt waren. Es wurden keine molekularen Analysen der 35S::*PPM3* Pflanzen durchgeführt, unter der Annahme, daß die Selektion mit Basta einen guten Hinweis auf die Anwesenheit des Transgens gibt.

Die Transformation von *A. thaliana* (Ökotyp Col-0) mit 35S::*PPM2* dagegen führte zu deutlich veränderten Phänotypen in 24 von 48 transgenen Pflanzen der T1-Generation. Diese 24 transgenen Pflanzen stammten aus neun unabhängigen Transformationen. Es wurden die Samen der 24 Linien in der T2-Generation zur genauen Analyse ausgebracht. In acht der 24 Linien traten keine Phänotypen auf. Aus den übrigen 16 Linien, aus sechs unabhängigen Transformationsereignissen, resultierten 48 transgene Pflanzen, die weiter analysiert wurden.

Die Expression von *PPM2* in *A. thaliana* führte zu einer Phänokopie der „*curly leaf*“ Mutante von *A. thaliana* (Goodrich et al., 1997; Kim et al., 1998). Dies wurde in Bezug auf zahlreiche der bislang beschriebenen Charakteristika der *curly leaf* Mutante überprüft. So wiesen die Blätter der 35S::*PPM2* Pflanzen eine veränderte Morphologie auf. Anstelle der ovalen, glatten Blätter des WT (siehe Abb. 17a) hatten diese Pflanzen Blätter, die an den Rändern zur Mitte hin aufgerollt waren (siehe Abb. 17b bis d). Dagegen entstanden, wie für die *curly leaf* Mutante beschrieben, auch bei den *PPM2* transgenen Pflanzen bei Temperaturen unter 20°C glatte Blätter, die sich zwei Tage nach Umstellen der Temperatur auf 20°C auch wieder aufrollten. Auch waren die 35S::*PPM2* Pflanzen deutlich kleiner als der WT. Unter Kurztag-Bedingungen blühten diese Pflanzen drei Wochen vor dem WT. Die Blütenknospen der transgenen Pflanzen waren vorzeitig geöffnet (siehe Abb. 17c bis e), so daß die Karpelle schon aus den Blüten herausragten, bevor die Petalen herausgewachsen waren. Dadurch traten die definierten Entwicklungs-Stadien der Wildtyp-Blüten nicht auf.

Abb. 17: Darstellung von *A. thaliana* (Ökotyp Col-0) WT (a) und von 35S::*PPM2* Expressionslinien im WT Hintergrund von *A. thaliana* (b-f); (a) Zwei Wochen alte WT Pflanze von *A. thaliana*; (b) gleichaltrige 35S::*PPM2* transgene Pflanze mit „*curly leaf*“ Blatt-Phänotyp; (c) 35S::*PPM2* transgene Pflanze mit *curly leaf* Blatt-Phänotyp und bereits ausgebildeten Blütenknospen; frühzeitig geöffnete Knospen; (d) 35S::*PPM2* transgene Pflanze mit *curly leaf* Blatt-Phänotyp; Zwergenwuchs; frühzeitig geöffnete Knospen; (e) Frühzeitig geöffnete Knospen; Hochblätter mit *curly leaf* Phänotyp; (f) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ovulum-Primordiums am Sepalenrand.

Außer in den Blättern traten bei allen oberirdischen vegetativen Organen keine Unterschiede auf. Es wurden im weiteren die Blüten mittels Lupe und Rasterelektronenmikroskop untersucht. Bei 39 der 48 in der T2-Generation untersuchten Pflanzen öffneten sich die Blütenknospen frühzeitig, wie in Abb. 17c bis e zu sehen. Darüberhinaus standen die Sepalen weit auf, so daß sie nicht wie im WT einen engen Kranz um die Petalen bildeten. Die Petalen, die in adulten WT-Blüten doppelt so lang sind wie die Sepalen, waren in den Linien mit stark ausgeprägten Phänotypen nur wenig bis gar nicht größer als diese. Desweiteren entstanden bei zwei Linien mit besonders stark ausgeprägtem *curly leaf* Blatt-Phänotyp und extremem Zwergen-Wuchs Auswüchse an den Sepalenrändern. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Strukturen zeigten, daß es sich hierbei wahrscheinlich um Ovula-Primordien-ähnliche Strukturen handelt (siehe Abb. 17f) (Alvarez und Smyth, 1999; Western und Haughn, 1999; Kirchner, 2001).

Es sollte überprüft werden, ob die Expression von *PPM2* direkt zu diesen morphologischen Veränderungen führt, oder ob die Ausbildung vom *curly leaf* Blatt-Phänotyp, frühgeöffneten Knospen und Auswüchsen an den Sepalen durch eine Hochregulierung der endogenen B- oder C-Funktionsgene infolge der *PPM2*-Expression bewirkt wird. Mittels RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, daß in den untersuchten 35S::*PPM2* Pflanzen weder das endogene *AGAMOUS*-, noch das endogene *PISTILLATA*-Gen ektopisch in den Blättern, die den *curly leaf* Phänotyp besaßen, exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt).

3.2.9 Komplementationsversuch der *Arabidopsis thaliana* Mutante *agamous* durch 35S::*PPM2*

Um auszuschließen, daß die bei der Expression von *PPM2* unter dem konstitutiven 35S-Promotor in *A. thaliana* entstandenen Phänotypen auf eine Hochregulierung des endogenen C-Funktionsgens zurückzuführen ist, und um zu überprüfen, ob und wie weit *PPM2* Teilfunktionen eines C-Funktionsgens in einer höheren Pflanze ersetzen kann, wurde die C-Funktionsmutante *agamous* von *A. thaliana* (Ökotyp Landsberg *erecta*) mit dem 35S::*PPM2* Konstrukt transformiert.

Die *agamous* Mutante zeichnet sich dadurch aus, daß sie im homozygoten Zustand nicht fertil ist. Bei den Blüten der *agamous* Mutante befinden sich Sepalen im ersten Wirtel, Petalen im zweiten Wirtel und die Stamina des dritten Wirtels werden auf Grund des C-Funktionsverlustes in Petalen umgewandelt. Es folgen im Inneren des dritten Wirtels acht bis zehn Wiederholungen von einem Kreis Sepalen und zwei Kreisen mit Petalen (Sieburth et al., 1995), da ein Ausfall der *AGAMOUS*-Funktion zu einer Aufhebung der Determinierung der Blüte führt (Yanofsky et al., 1990; Bowman et al., 1991).

Da die homozygoten *agamous* Mutanten auf Grund der Abwesenheit von Reproduktionseinheiten steril sind, wurden zur *Agrobacterium*-vermittelten *Arabidopsis*-Transformation morphologisch identische *ag*-heterozygote- (*ag/AG*) und WT- (*AG/AG*) Pflanzen verwendet. Es wurde die Mutante *ag-1* verwendet, eine *Splicing*-Mutante, bei der das Nukleotid „G“ der 3'Spleißakzeptorstelle des vierten Introns gegen ein „A“ ausgetauscht ist (Yanofsky et al., 1990).

Aus der Transformation der heterozygoten *ag*- und WT-Pflanzen (*ag/AG* und *AG/AG*) mit 35S::*PPM2* gingen in der T1-Generation 73 Basta-resistente Pflanzen aus neun unabhängigen Transformationen hervor. Davon waren nach morphologischer Analyse 19 Pflanzen *ag*-homozygot (*ag/ag*) und 54 entweder *ag*-heterozygot (*ag/AG*) oder WT (*AG/AG*). Von diesen 54 Pflanzen stammten 31 aus vier Pools, in denen keine homozygote *ag*-Pflanze (*ag/ag*) auftrat, das heißt sie waren wahrscheinlich homozygot WT (*AG/AG*). Diese Pflanzen wurden nicht in die T2-Generation überführt, aber dennoch in der T1-Generation phänotypisch analysiert.

Alle 73 Pflanzen besaßen den *curly leaf* Blatt-Phänotyp (siehe Abb. 18a und 19a), und waren kleiner als gleichaltrige WT-Pflanzen. Auch wurden die Knospen frühzeitig geöffnet (siehe Abb. 18a und b, sowie 19a). Die Ausprägung der vom WT abweichenden Blütenphänotypen war bei diesem Transformationsexperiment deutlich stärker, als bei der Expression von *PPM2* im Col-0 WT von *A. thaliana*. So zeigten 25 der 35S::*PPM2* *ag*-heterozygoten-, bzw. WT-Pflanzen (*ag/AG* und *AG/AG*) vor allem an den Spitzen der Sepalen stigmatesches Gewebe (siehe Abb. 18c, d und f) und an den Rändern der Sepalen waren Ovula-Primordien-ähnliche Auswüchse, sowie vollständige Ovula entstanden (siehe Abb. 18c-f) (Alvarez und Smyth, 1999; Western und Haughn, 1999; Kirchner, 2001). Ausgebildete Ovula im ersten Wirtel traten im vorangegangenen Experiment nicht auf. Weiterhin entstanden terminale Strukturen an den Spitzen der sonst nicht determinierten Infloreszenzen (siehe Abb. 18c), sowie in den Blüten fusionierte Sepalen im ersten Wirtel (siehe schwarze Pfeilspitze in Abb. 18c).

Abb. 18: Lupenaufnahmen von 35S::*PPM2* Expressionslinien im heterozygoten *agamous* Hintergrund von *A. thaliana* (*ag/AG*), bzw. im WT Hintergrund von *A. thaliana* (*AG/AG*); (a) Drei Wochen alte Pflanze mit *curly leaf* Blatt-Phänotyp und bereits geöffneten Blütenknospen; (b) Frühzeitig geöffnete Knospe aus a in stärkerer Vergrößerung. Petalen und Stamina sind noch grün und kleiner als die Sepalen, während die Karpelle schon aus der Blüte herausragen; (c) Terminale Struktur an der Infloreszenzspitze. Blüten mit fusionierten Sepalen (schwarze Pfeilspitze) und stigmatischem Gewebe an Sepalenspitzen (weiße Pfeilspitzen); (d) Vergrößerung einer Sepale aus c mit stigmatischem Gewebe (weiße Pfeilspitze) und Ovula (schwarze Pfeile); (e) und (f) Ovula an Sepalenrändern in starker Vergrößerung.

Auch die nach morphologischer Analyse identifizierten putativen *ag*-homozygoten transgenen Pflanzen zeigten Abweichungen vom *ag*-Mutanten-Phänotyp. So trat in den 35S::*PPM2 ag*-Homozygoten (*ag/ag*) stigmatisches Gewebe an der Spitze von Sepalen auf (siehe Abb. 19c und d). Dieses papillöse Gewebe ist im WT auf das Narben-Gewebe der Karpelle beschränkt und geht auf die Ausprägung der C-Funktion zurück. Auch traten filamentöse Organe auf, deren Morphologie der der Filamente der Stamina entsprach. Es wurde aber kein Antheren-Gewebe ausgebildet. Diese filamentösen Organe traten entweder als Fusionsorgane mit Petalen auf oder wuchsen direkt aus dem Grund der Blüten-Wirtel heraus (Daten nicht gezeigt).

Auch die Undeterminiertheit der Blüten war infolge der *PPM2*-Expression in den homozygoten *agamous* Pflanzen (*ag/ag*) beeinflusst worden. Anstelle von acht bis zehn Kreisen mit ausschließlich Blütenorganmeristemen (Sieburth et al., 1995), entstanden in der bereits auf Blütenorganmeristeme determinierten Blüte zusätzlich neue Blütenmeristeme, oder auch neue Infloreszenzmeristeme. Dies zeigte sich darin, daß neue Blüten oder Infloreszenzen zwischen den Blütenorganen entstanden (siehe Abb. 19b). Darüberhinaus kam es zur Fusion benachbarter Sepalen in den *ag/ag* Pflanzen. Eine Expressionsanalyse der transgenen Pflanzen mittels RT-PCR ergab, daß *PPM2* in den untersuchten Pflanzen stark exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

Abb. 19: Darstellung von 35S::PPM2 Expressionslinien im homozygoten *agamous* Hintergrund von *A. thaliana* (*ag/ag*). (a) Drei Wochen alte Pflanze mit *curly leaf* Blatt-Phänotyp und frühzeitig geöffneten Blütenknospen; (b) Blütenknospe, die aus dem bereits auf Blütenorgane determinierten Blütenmeristem auswächst. In der Blütenknospe befindet sich eine weitere Knospe (weißer Pfeil), so daß es sich wahrscheinlich um eine neue Infloreszenz handelt, die aus der Blüte auswächst. Fast alle Blütenorgane wurden entfernt, um die Herkunft dieser Struktur lokalisieren zu können; (c) Lupenaufnahme von stigamatischem Gewebe an der Spitze einer Sepale (weiße Pfeilspitze); (d) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme stigamatischen Gewebes aus c; (e) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer filamentösen Struktur die aus dem Blütengrund herauswächst und stigamatisches Gewebe an der Spitze aufweist; (f) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ovulum-Primordiums am Sepalenrand; (g) Lupenaufnahme von Ovula (schwarze Pfeile), die aus Sepalenrändern herauswachsen; (h) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ovulum, das aus dem Sepalenrand herauswächst. Einige Zellen sind auf Grund eines Präparationsartefaktes implodiert.

Je 10 Samen von 18 der 35S::PPM2 *ag*-heterozygoten-, bzw. WT-Pflanzen (*ag/AG* oder *AG/AG*) wurden in der T2-Generation ausgebracht. Daraus gingen 145 Pflanzen hervor, von denen 67 Pflanzen aus 9 Pools stammten, in denen keine homozygote *agamous* Pflanze auftrat. Diese Pflanzen wurden nicht analysiert. Von den übrigen 78 Pflanzen waren nach morphologischer Analyse 19 homozygot *agamous* (*ag/ag*) und 59 *ag*-heterozygot, bzw. WT (*ag/AG* oder *AG/AG*). Sämtliche mutante Phänotypen der 35S::PPM2 *ag/ag* Pflanzen der T1-Generation traten auch in der T2-Generation auf, z.B. stigamatisches Gewebe an den Sepalenspitzen, filamentöse Organe und neue Blütenknospen und Infloreszenzen, die sich aus den Blüten entwickelten (siehe Abb. 19). Darüberhinaus entstand eine Struktur, die auf einem filamentösen Stiel stigamatisches Gewebe ausbildete (siehe Abb. 19e). Eventuell handelt es sich hierbei um ein karpelloides Organ. Desweiteren traten in der T2-Generation auch in vier Linien aus zwei unabhängigen Transformationen Ovula-Primordien an den Sepalenrändern auf (siehe Abb. 19f), sowie in einer Linie Ovula (siehe Abb. 19g und h).

Zur molekularen Analyse dieser Pflanzen wurde genomische DNA als PCR-Template verwendet, mit dem zum einen der Nachweis geführt wurde, daß die Pflanzen homozygot für die *agamous* Mutation waren. Hierzu wurde der Bereich des vierten Introns mit den *AGAMOUS*-spezifischen Primern P_{AGIn4fw} und P_{AGIn5bw} amplifiziert und anschließend mit dem stromaufwärts-gerichteten Primer P_{AGIn5bw} sequenziert. (Auf Grund einer Sequenzwiederholung im vierten Intron ist der stromabwärts-gerichtete Primer P_{AGIn4fw} nicht als Sequenzierprimer geeignet.) Da in allen Fällen in der Sequenzierung nur ein eindeutiges Signal von einem „A“ an der 3'Spleißakzeptorstelle auftrat und kein Mischsignal aus „G“ und „A“ wie in heterozygoten *agamous* Pflanzen oder nur „G“ in WT-Pflanzen, war gezeigt worden, daß es sich bei diesen Pflanzen um homozygote *agamous* Mutanten (*ag/ag*) handelt, wie es auch die phänotypische Analyse vorgab (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurde mittels PCR mit *PPM2*-spezifischen Primern nachgewiesen, daß das Transgen *PPM2* im Genom der untersuchten Pflanzen vorhanden war.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MADS-Box-Gene aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* strukturell charakterisiert, ihre evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse aufgeklärt, sowie Analysen zur Funktion dieser Gene durchgeführt. MADS-Box-Gene spielen in Angiospermen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Blütenstruktur, sowie in Gymnospermen bei der Entwicklung reproduktiver Organe. Auch aus Farnen wurden zahlreiche MADS-Box-Gene isoliert, wobei deren Funktion jedoch vollständig unbekannt ist. Durch die Analyse der Struktur und Funktion von *P. patens* MADS-Box-Genen sollen die Evolution der MADS-Box-Gene besser verstanden, sowie Hinweise auf die Funktion von MADS-Box-Genen in Nicht-Samenpflanzen erlangt werden.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden drei MADS-Box-Gene aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* isoliert (Henschel, 1999). Diese *P. patens* MADS-Box-Gene wurden auf Grund von Sequenz- und Strukturähnlichkeiten in zwei Typen unterteilt, den *PPM2-* (*K445-*) Typ und den *PPM3-* (*K71-*) Typ. Vom *PPM2*-Typ konnten bislang zwei Gene vollständig (*PPM2*) oder partiell isoliert werden (*PPM1*), vom *PPM3*-Typ war *PPM3* selbst der bislang einzige Vertreter (Henschel, 1999). Diese anfängliche Analyse der *P. patens* MADS-Box-Gene wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit fortgesetzt. Hierzu wurde zunächst die Sequenz des Gens *PPM1* vollständig aufgeklärt, sowie ein weiteres, dem *PPM3*-Typ entsprechendes Gen in *P. patens* gesucht.

4.1 Isolierung der *Physcomitrella patens* MADS-Box-Gene *PPM1* und *PPM4*

Nach der Isolierung einer cDNA von *PPM1*, die das vollständige offene Leseraster enthält, sowie der Aufklärung des genomischen Lokus, konnte ein *PPM1*-Genprodukt abgeleitet werden, das sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu *PPM2* besitzt. Desweiteren zeigte sich, daß die Exon-Intron-Strukturen der Genloci von *PPM1* und *PPM2* annähernd identisch sind, wie bereits auf Grund hoher Sequenzähnlichkeiten vermutet worden war (Henschel, 1999).

Darüberhinaus wurde versucht, ein zweites MADS-Box-Gen vom *PPM3*-Typ aus dem Genom von *P. patens* zu isolieren. Da die *P. patens* MADS-Box-Gene sehr schwach exprimiert sind und die Suche nach neuen MADS-Box-Genen auch durch Kreuzreaktionen des 3'RACE Primers P₀₁₈ mit den Moos cDNAs erschwert wurde, wurde die Methode der genomischen Linker PCR (siehe 2.12.8) zur Suche nach neuen MADS-Box-Genen angewandt. Mit *PPM4* wurde ein neues

MADS-Box-Gen isoliert, dessen Genprodukt 82,7% Sequenzähnlichkeit mit PPM3 aufweist. Auf Grund der hohen Effizienz (über 85 % der genomischen Fragmente stammten von verschiedenen MADS-Box-Gen Loci), wurde durch Anwendung der genomischen Linker PCR zur Suche nach neuen MADS-Box-Genen in *P. patens* eine effiziente Methode zur Klonierung schwach exprimierter Gene gefunden, die daraufhin auch im Rahmen eines anderen Projektes erfolgreich angewandt wurde (P. Huijser, persönliche Mitteilung).

Wie für *PPM1*, *PPM2* und *PPM3* bereits gezeigt werden konnte (Henschel, 1999), handelt es sich auch bei *PPM4* wahrscheinlich um ein Einzelkopie-Gen. Nach Hybridisierung mit jeder der vier genspezifischen Sonden wurde in mindestens einer Spur nur eine Bande nachgewiesen und diese war kleiner als etwa 4 kBp. Da sehr wahrscheinlich nur ein einziges Gen auf einem DNA-Fragment dieser Größe liegt, ist voraussichtlich jeweils nur ein der Sonde homologer Locus im Genom von *P. patens* vorhanden, d.h. es handelt sich bei allen vier Genen wahrscheinlich um Einzelkopie-Gene. Unter der Annahme, daß sich die Gene erst vor sehr kurzer Zeit dupliziert haben, könnten aber auch je zwei Gene mit identischen Schnittstellen und identischen resultierenden Fragmentgrößen im Genom von *P. patens* vorkommen.

Auf Grund der vollständig unterschiedlichen Bandenmuster von *PPM4* und den anderen drei *P. patens* MADS-Box-Genen, läßt sich für *PPM4* keine dichte Klusterung feststellen, wie auch für die drei anderen *P. patens* MADS-Box-Gene bereits gefolgert wurde (Henschel, 1999). Demzufolge liegen die MADS-Box-Gene von *P. patens* sehr wahrscheinlich nicht geklustert im Genom vor, was auch für monokotyle (Fischer et al., 1995) und dikotyle (Ma et al., 1991; Pnueli et al., 1991; Hauge et al., 1993; Kempin et al., 1995; Riechmann et al., 2000) Blütenpflanzen, sowie für Farne (Münster et al., 1997) gezeigt worden ist. Im Falle einer dichten Klusterung wären in den meisten Fällen wenigstens einzelne Banden der genspezifischen Hybridisierungsmuster identisch.

4.2 In *P. patens* kommen zwei Klassen von MIKC-Typ MADS-Box-Genen vor

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genprodukte und die genomischen Loci von *PPM1* bis *PPM4* strukturell charakterisiert. Zur Unterstützung der Analyse konnten Sequenzinformationen für drei weitere *P. patens* MADS-Box-Gene, *PpMADS1* - *PpMADS3*, verwendet werden, die von Mitsuyasu Hasebe und Mitarbeitern zur Verfügung gestellt wurden.

Die Sequenzen und Strukturen der abgeleiteten Genprodukte der *P. patens* MADS-Box-Gene wurden mit verschiedenen MIKC-Typ MADS-Domänen-Proteinen von Farnen und Samenpflanzen verglichen. Hierbei zeigte sich, daß alle sieben MADS-Domänen-Proteine von *P. patens* vom für Pflanzen diagnostischen MIKC-Typ der MADS-Domänen-Proteine sind. Auf

Grund der hohen Konservierung der Domänen-Struktur handelt es sich bei allen MIKC-Typ Gene sehr wahrscheinlich um homologe Gene, die aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen entstanden sind. Demzufolge sind die *P. patens* MADS-Box-Gene echte Homologe der vielen gut charakterisierten MADS-Box-Gene aus Blütenpflanzen.

Allerdings weichen vier der *P. patens* MADS-Domänen-Proteine - PPM3, PPM4, PpMADS2 und PpMADS3 – in manchen Bereichen von dieser hochkonservierten Domänen-Struktur ab, indem sie einige besondere Merkmale besitzen. So weisen diese Proteine z.B. deutlich längere I-Domänen und eine geringere Konservierung der Länge (auf Grund von drei kurzen Indels) und der hydrophoben Aminosäuren der K-Domäne auf.

Die nachfolgende Analyse der Exon-Intron-Strukturen der *P. patens* MADS-Box-Gene ergab, daß *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1* eine vergleichbare Exon-Intron-Struktur wie die MIKC-Typ MADS-Box-Gene der höheren Pflanzen besitzen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß bei diesen Genen dieselben Domänen in denselben Exons liegen, wie bislang von den höheren Pflanzen bekannt. Bei *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1* sind die Positionen der ersten sechs Introns konserviert und zusätzlich befinden sich bei diesen Genen zwei weitere Introns im 3' Bereich der C-Region, sowie bei *PPM2* ein zusätzliches Intron im 3'UTR. Allerdings sind die C-Region und der 3'UTR nicht nur in Hinblick auf Länge und Sequenz, sondern auch hinsichtlich der Exon-Anzahl am schwächsten konserviert (Gassen, 1999).

In einer Rekonstruktion der Evolution von Exon-Intron-Strukturen einer Anzahl von MIKC-Typ Genen postulierte Gassen (1999) ein hypothetisches Vorläufergen, das sieben Introns besaß. Dieser Struktur entsprechen *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1*, wobei im C-terminalen Bereich ein, bzw. zwei zusätzliche Introns vorhanden sind. Demgegenüber zeigten die meisten MIKC-Typ Gene aus höheren Pflanzen und Farnen einen Verlust des siebten Introns, Ausnahmen hiervon sind z.B. *SQUAMOSA*, *API*, *SEPI* und *SEP2*. Auch die Länge der diagnostischen Exons fünf und sechs entspricht bei *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1* mit jeweils 42 Bp der für das MIKC-Typ Vorläufergen vorausgesagten Größe (Gassen, 1999; Winter, 2001).

Dagegen weichen die Exon-Intron-Strukturen von *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* und *PpMADS3* deutlich von der Struktur des von Gassen postulierten Vorläufergens ab. So liegen die MADS-, I- und K-Region bei *PPM2* und *PPM3* auf insgesamt acht Exons, bei *PpMADS2* und *PpMADS3* auf insgesamt neun Exons, wohingegen die entsprechenden Domänen des postulierten Vorläufergens auf fünf Exons liegen. Dabei liegt die I-Region von *PPM3* und *PPM4* auf vier Exons und die von *PpMADS2* und *PpMADS3* auf fünf Exons, anstelle von einem beim hypothetischen Vorläufergen. Allerdings ist auch bei *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* und *PpMADS3* die typische Verteilung der K-Domäne auf drei Exons konserviert, sowie die Lage des 5'UTR und der MADS-Domäne im ersten Exon.

Auf Grund der strukturellen Besonderheiten der Genprodukte und der genomischen Loci von *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* und *PpMADS3* wird für diese bislang unbekannte Klasse von MIKC-Typ MADS-Box-Genen die Bezeichnung „MIKC*-Typ Gene“ vorgeschlagen. Sie werden dadurch vom herkömmlichen Typ, repräsentiert von den bislang bekannten pflanzlichen MIKC-Typ MADS-Box-Genen und *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1*, abgegrenzt, welcher als „MIKC^c-Typ“ bezeichnet wird. Eine längere I-Domäne bestehend aus vier, bzw. fünf Exons, anstelle von einem wie im Falle der MIKC^c-Typ Gene, stellt das Hauptcharakteristikum der MIKC*-Typ Gene dar, wohingegen eine sowohl in Länge, als auch Sequenz abweichende K-Domäne zwar typisch, aber weniger diagnostisch ist.

Mit *LAMB1* aus dem Bärlapp *Lycopodium annotinum* (Svensson et al., 2000), konnte ein MADS-Domänen-Protein gefunden werden, das ebenfalls eine deutlich längere I-Domäne als die MIKC^c-Typ Proteine besitzt. Da diese I-Region auf vier Exons verteilt liegt, weist *LAMB1* damit das Hauptcharakteristikum von *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* und *PpMADS3* auf (vier oder fünf I-Domänen Exons). Es stellte sich daher die Frage, ob zwischen den *P. patens* MIKC*-Typ Proteinen und *LAMB1* eine enge evolutionäre Verwandtschaft besteht oder ob die Ähnlichkeit auf paralleler Evolution beruht.

Neben der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den *P. patens* MIKC* Proteinen und *LAMB1* treten jedoch auch deutliche Unterschiede auf: so ist zum einen die Sequenzähnlichkeit zwischen diesen Proteinen sehr gering (26,9% Identität zwischen *LAMB1* und *PPM3*), zum anderen fehlen bei *LAMB1* die drei Indels der K-Domäne der *P. patens* MIKC*-Typ Proteine, desweiteren sind stromabwärts des ersten Introns der K-Domäne bei *LAMB1* keine weiteren Introns zu finden und *LAMB1* besitzt eine lange aus drei unvollständigen Wiederholungseinheiten zusammengesetzte C-Domäne (Svensson et al., 2000). Diese Unterschiede reflektieren allerdings womöglich die seit 450 Millionen Jahren getrennt verlaufende Evolution von *LAMB1* und den *P. patens* MIKC*-Typ Proteinen, da sich zu dieser Zeit die Trennung der Linien, die zu den heutigen Moosen und Gefäßpflanzen (inklusive Bärlappen) führten, vollzog. Auf Grund der längeren I-Domäne und einer gleichen Exon-Intron-Struktur, in dem Bereich, in dem bei *LAMB1* Introns vorkommen, ist *LAMB1* ein putatives MIKC*-Typ Gen.

4.3 Verwandtschaftsverhältnisse der *P. patens* MADS-Box-Gene

Um die Ähnlichkeiten zwischen den *P. patens* MIKC*-Typ Genen und *LAMB1* weiter zu analysieren, sowie um die phylogenetische Stellung der *P. patens* MIKC^c-Typ Gene zu bestimmen, wurden die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse durch Phylogenierekonstruktionen ermittelt. Es wurden wegen starker Längenheterogenitäten und

großer Sequenzunterschiede in den anderen Domänen, nur Sequenzen der MADS- und K-Domäne für diese Art von Studien verwendet, da nur diese gesicherte Sequenzvergleiche ermöglichen. Es wurden verschiedene Sätze von MIKC-Typ Proteinen von Gefäßpflanzen und die abgeleiteten Genprodukte aller *P. patens* MADS-Box-Gene einbezogen.

Phylogenierekonstruktionen mit Vertretern aller bislang bekannten großen Subfamilien pflanzlicher MADS-Domänen-Proteine (Theißen et al., 1996; Becker et al., 2000; Theißen et al., 2000) zeigten, daß die *P. patens* MIKC*-Typ Gene mit LAMB1 näher verwandt sind, als mit einem anderen der bisher isolierten MIKC-Typ MADS-Box-Gene. Desweiteren fallen sowohl die MIKC*-Typ Gene, als auch die MIKC^c-Typ Gene, jeweils mit guter Bootstrap-Unterstützung zusammen, so daß, unter der Voraussetzung, daß dieser Baum nicht gewurzelt ist, mindestens einer der beiden Gen-Typen, eine eigene Klade darstellt.

Darüberhinaus konnte in den Phylogenierekonstruktionen festgestellt werden, daß die beiden Typen von *P. patens* MIKC Proteinen zwei gut unterstützte Kladen bilden, eine mit MIKC^c, die andere mit MIKC* Proteinen. Das bedeutet, daß die jeweiligen Gene innerhalb einer Klade wahrscheinlich durch Gen-, Chromosomen- oder Genom-Duplikationen entstanden sind und zwar innerhalb der Linie, die zu den rezenten Moosen führte. Allerdings könnten auch Gen-Konversions-Ereignisse dazu geführt haben, daß die Gene innerhalb einer Klade ähnlich geblieben sind, und daher die verschiedenen Loci älter sind, als es scheint.

Durch die Phylogenierekonstruktionen konnte keine Zugehörigkeit der *P. patens* MIKC^c-Typ Genklade zu einer der definierten Subfamilien der MADS-Box-Gene der Farne oder Samenpflanzen festgestellt werden (siehe Abb. 6). Jedoch bildeten die *P. patens* MIKC^c Proteine häufig eine Schwester-Klade zu den B_{sister}-ähnlichen Proteinen. Diese Topologie wurde in zahlreichen Phylogenierekonstruktionen mit unterschiedlichen Datensätzen erhalten, jedoch nicht durch Bootstrap-Berechnungen unterstützt (siehe Abb. 6). Es konnten daher keine eindeutigen Orthologie-Beziehungen zwischen den MIKC^c-Typ MADS-Box-Genen aus dem Moos *P. patens* und denen der Samenpflanzen und Farne ermittelt werden.

In Phylogenierekonstruktionen wird ein Schwesterkladen-Verhältnis der MIKC*-Typ Genklade und der CRM3-Subfamilie nicht durch Bootstrap-Berechnungen unterstützt (siehe Abb. 6). Trotzdem existiert in den Sequenzalignments eine auffällige strukturelle Gemeinsamkeit zwischen *P. patens* MIKC* Proteinen und CRM3-ähnlichen Proteinen: in der K-Domäne der *P. patens* MIKC* Proteine treten drei Indels auf, von denen eines von zwei AS Länge auch in den nahe miteinander verwandten MIKC^c-Typ Proteinen CRM3 und CRM9 aus dem Farn *Ceratopteris* vorkommt (siehe Abb. 4; Münster et al., 1997; Di Rosa, 1998). Da diese Indels nicht in LAMB1 vorkommen, stellt sich die Frage, ob die Indels in der Linie, die nach der Abspaltung der Farne und Samenpflanzen zu den Bärlappen führte, verloren wurden. Es ist allerdings ebenso möglich,

daß das Indel in der CRM3-Subfamilie und den MIKC*-Typ Genen aus *P. patens* unabhängig entstanden ist. Ob aus der Lage in Phylogeniekonstruktionen und dem gemeinsamen Auftreten dieses Strukturmerkmals auf ein gemeinsames Vorläufergen der CRM3-Subfamilie und der MIKC*-Typ Gene geschlossen werden kann, bleibt demzufolge unklar.

4.4 Verbreitung der MIKC*-Typ Gene

Ein Versuch, weitere MIKC*-Typ Gene auch in den isolierten MADS-Box-Genen aus Farnen oder Samenpflanzen zu finden, blieb erfolglos, so daß MIKC*-Typ Gene bislang erst aus Moosen und Bärlappen isoliert worden sind (siehe Abb. 20). Hierbei war versucht worden, die einzelnen Domänen der MIKC*-Typ Gene getrennt zur Suche nach weiteren Genen dieses Typs in Gen- und Protein-Datenbank-Recherchen zu verwenden. Es bieten sich mehrere mögliche Erklärungen hierfür an: zum einen könnten MIKC*-Typ Gene wirklich nicht in Farnen oder Samenpflanzen vorkommen; zum anderen könnten sie bislang nur nicht entdeckt worden sein. Es scheint jedoch eher unwahrscheinlich, daß MIKC*-Typ Gene in diesen Arten vorkommen und bislang nicht isoliert oder erkannt worden sind, da MADS-Box-Genfamilien aus einigen Farnen, Gymnospermen und Blütenpflanzen sehr umfassend analysiert worden sind (Übersicht in: Theissen et al., 2000). Da die meisten MADS-Box-Gene zuerst in Form von cDNAs gefunden wurden, könnte ein geringes Expressionsniveau ursächlich sein, daß die MIKC*-Typ Gene bislang unentdeckt blieben.

Eine weitere Möglichkeit zur Suche nach MIKC*-Typ Genen in anderen Spezies, bietet die Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana*, da das Genom von *A. thaliana* vollständig sequenziert ist (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Voraussetzung für eine Identifizierung der MIKC*-Typ Gene ist allerdings, daß die Exon-Intron- und Domänen-Struktur dieser Gene exakt bekannt ist, da MIKC*-Typ Gene nur durch ihre Position in Phylogeniekonstruktionen oder durch die Anzahl von Exons in der I-Domäne erkannt werden können. Diese Struktur ist jedoch bei weitem noch nicht für alle MADS-Box-Gene aus *A. thaliana* bekannt, und häufig schlägt eine Vorhersage der kurzen Exons der I- und K-Regionen von MIKC-Typ Genen mittels ORF-Suchprogrammen fehl, so daß die Isolierung einer cDNA-Sequenz zur genauen Festlegung der Exon-Intron-Struktur unumgänglich ist.

Im Genom von *A. thaliana* kommen mindestens 82 MADS-Box-Gene vor (Riechmann et al., 2000), von denen mindestens 32 Gene vom MIKC-Typ sind und daher bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen berücksichtigt wurden. Die abgeleiteten AS-Sequenzen der MADS- und K-Domänen wurden für Phylogeniekonstruktionen verwendet. Es wurde hierdurch allerdings kein Hinweis auf das Vorkommen von MIKC*-Typ Genen im Genom von *A. thaliana* erhalten. Solange jedoch nicht die Exon-Intron-Struktur aller MADS-Box-Gene aus *A.*

thaliana aufgeklärt und mit der der MIKC^{*}-Typ Gene verglichen worden ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Gen-Typ in *A. thaliana* vorkommt.

Unter der Annahme, daß MIKC^{*}-Typ Gene tatsächlich nicht in den rezenten Farnen und Samenpflanzen vorkommen, muß diese Klasse von Genen vor der Trennung der Linien, die zu den heutigen Farnen und Samenpflanzen führen, verloren gegangen sein. Darüberhinaus, könnten die MIKC^{*}-Typ Gene auch mehrfach unabhängig verloren worden sein, z.B. jeweils an der Basis der rezenten Farne und Samenpflanzen. Schließlich besteht auch noch die Möglichkeit, daß MIKC^{*}-Typ Gene nur in einzelnen Klassen der Samenpflanzen verloren wurden. Daher sind ähnliche Untersuchungen wie die in *Arabidopsis* begonnenen auch für eine entfernt verwandte Blütenpflanze, z.B. die Monokotyle Reis, und für eine Modell-Gymnosperme bedeutsam.

Wenn MIKC^{*}-Typ Gene tatsächlich in den höheren Gefäßpflanzen verloren wurden, so muß angenommen werden, daß nur ein MIKC^{*}-Typ Gen in der entsprechenden Linie vorkam, um einen Verlust einer ganzen Gen-Klasse ungeklusterter Gene zu einem wahrscheinlicheren Ereignis zu machen. Es stellt sich die Frage, welche Funktion die MIKC^{*}-Typ Gene im gemeinsamen Vorläufer gehabt haben, so daß dieser Gen-Typ in den „höheren“ Gefäßpflanzen verzichtbar wurde. Im Genom der Moose und Bärlappe sind MIKC^{*}-Typ Gene schließlich für etwa 450 Millionen Jahre bewahrt worden.

Darüberhinaus hat die Isolierung von MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Genen sowohl aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens*, als auch aus dem Bärlapp *Lycopodium annotinum* (Svensson et al., 2000; Svensson, 2000) gezeigt, daß der letzte gemeinsame Vorläufer der Moose und Bärlappe wahrscheinlich bereits zwei Typen von MADS-Box-Genen besessen hat, ein MIKC^c- und ein MIKC^{*}-Typ Gen (siehe Abb. 20). Auf Grund der Homologie der MIKC-Typ MADS-Box-Gene würde dies bedeuten, daß es zu einer ancestralen Duplikation eines MIKC-Typ Gens kam, bevor sich die Linien, die zu den rezenten Moosen und Gefäßpflanzen führten, getrennt haben. Es stellt sich die Frage, welche Struktur das Vorläufer MIKC-Typ Gen besessen hatte, welches in der gemeinsamen Vorläufer-Pflanze verdoppelt wurde.

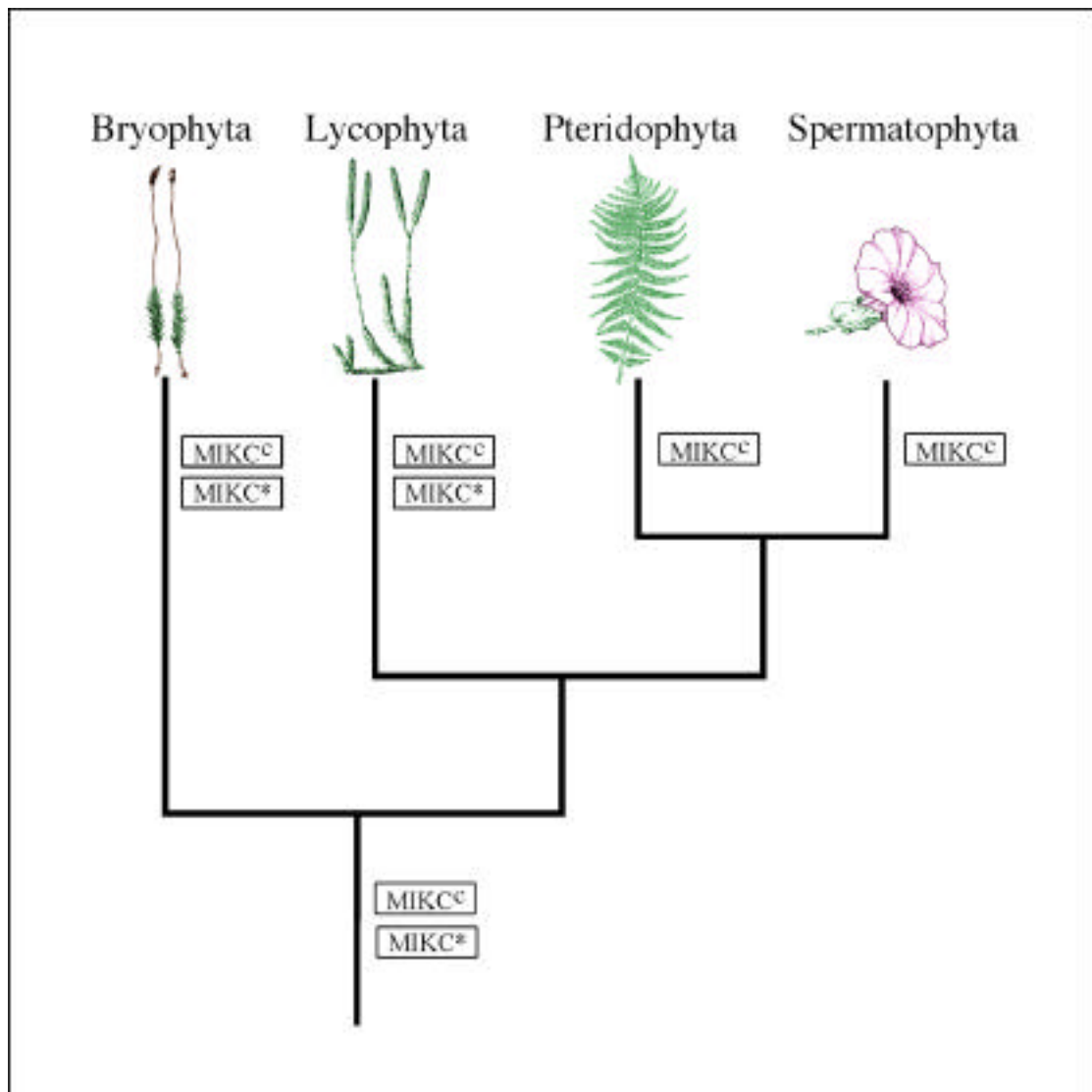


Abb. 20: Abstammung der MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ MADS-Box-Gene in der Evolution der Landpflanzen. Eine phylogenetische Rekonstruktion einiger Hauptgruppen der Landpflanzen ist dargestellt. An den Enden der Äste ist das bis dato bekannte Vorkommen von MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ MADS-Box-Genen in den entsprechenden Arten aufgezeigt. An der Wurzel des Baumes ist ein minimaler Satz an MADS-Box-Genen dargestellt, der wahrscheinlich im letzten gemeinsamen Vorfahren von Moosen und Gefäßpflanzen vorkam. Die Äste sind nicht zeitlich skaliert. Die Trennung der Linien, die zu den heutigen Moosen und den Gefäßpflanzen führte, vollzog sich vor etwa 450 Millionen Jahren. Die Trennung der Linie, die zu den rezenten Farnen führt, von den anderen Gefäßpflanzen, fand vor etwa 400 Millionen Jahren statt.

4.5 Struktur des Vorläufer MIKC-Typ Gens

Es ist nur schwer vorauszusagen, ob MIKC^c- oder MIKC^{*}-Typ Gene den ursprünglichen Typ der MIKC-Typ Gene darstellen, da beide sowohl aus Moosen, als auch aus Gefäßpflanzen isoliert wurden.

So haben Svensson und Mitarbeiter (2000) postuliert, daß *LAMB1* und damit die MIKC^{*}-Typ Gene den ursprünglicheren Typ darstellen, aus dem dann die MIKC^c-Typ Gene unter Verlust von drei Exons der I-Region hervorgegangen sind. Allerdings könnten auch die MIKC^{*}-Typ Gene aus den MIKC^c-Typ Genen entstanden sein, oder beide Gen-Typen sind aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen, welcher weder ein eindeutiges MIKC^c- noch MIKC^{*}-Typ Gen war.

Da aus den Grünalgen als basalster Pflanzengruppe bislang nur MIKC^c-Typ Gene isoliert werden konnten, und nicht MIKC^{*}-Typ Gene (Tanabe, Hasebe und Ito, persönliche Mitteilung), ist es wahrscheinlicher, daß die MIKC^c-Typ Gene der Struktur des Vorläufergens entsprechen. Allerdings gilt wie schon bei der Frage nach dem Vorkommen der MIKC^{*}-Typ Gene in höheren Gefäßpflanzen, daß, so lange das Genom verschiedener Arten von Grünalgen nicht sequenziert und die Exon-Intron-Strukturen aller MADS-Box-Gene mittels der entsprechenden cDNAs abgeleitet worden sind, auch nicht ausgeschlossen werden kann, daß MIKC^{*}-Typ Gene bereits in Algen vorkommen. Wenn jedoch tatsächlich die MIKC^c-Typ Gene den ursprünglichen Typ der MIKC-Gene darstellen, so muß eine Zunahme der Exons der I-Region von eins auf vier bis fünf angenommen werden.

Es könnten jedoch auch MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Gene aus einem gemeinsamen Vorläufergen hervorgegangen sein, welches weder dem einen, noch dem anderen Gen-Typ entsprach, sondern in seiner Struktur zwischen den beiden Typen lag. Dieses Vorläufergen hätte ein langes und ein kurzes Exon in der I-Region besessen. Bei der Entstehung des MIKC^c-Typs wäre das kurze Exon verloren gegangen, wohingegen die beiden Exons bei der Entstehung der MIKC^{*}-Typ Gene verdoppelt worden wären. Eine mögliche Exon-Verdopplung wird jedoch nicht durch das Auftreten von Sequenz-Wiederholungen in der I-Region nahegelegt.

4.6 Komplexität der MADS-Box-Genfamilie in *P. patens*

Aus einer Abschätzung der Genanzahl mittels genomischer Southern-Hybridisierung konnte gefolgert werden, daß im Genom von *P. patens* jeweils mindestens fünf, wahrscheinlich aber eher acht oder mehr MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Gene vorhanden sind, wobei dieses Experiment nur einen groben Eindruck zuläßt. Der Southern-Filter wurde mit *PPM2*- und *PPM3*-spezifischen Sonden unabhängig hybridisiert, da die MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Gene große Sequenzdifferenzen aufweisen und Gene derart starker Sequenzverschiedenheit selbst unter den gewählten

Bedingungen moderater Stringenz nicht von einer anderen Sonden detektiert werden können. Die resultierenden Bandenmuster nach *PPM2*- und *PPM3*-Hybridisierung waren nicht deckungsgleich. Die Sonde von *PPM2* erkannte von den bislang bekannten Loci nur den von *PPM1* zusätzlich, nicht aber einen der MIKC^{*}-Typ Gene *PPM3* oder *PPM4*. Die *PPM3*-Sonde erkannte *PPM4*, nicht aber einen Locus der MIKC^c-Typ Gene. Aussagen darüber, ob *PpMADS1* - *PpMADS3* von den *PPM2*- und *PPM3*-spezifischen Sonden detektiert wurden, sind hier nicht möglich, da das Bandenmuster dieser Loci nicht bekannt ist.

Daß noch weitere Familien von MADS-Box-Genen in *P. patens* vorkommen, die durch die verwendeten Sonden nicht erkannt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zu anderen Pflanzen scheint die MADS-Box-Genfamilie in *P. patens* eher klein zu sein. Für den Farn *Ceratopteris richardii* sowie für die Gymnosperme *Gnetum gnemon* wurde eine Anzahl von mindestens 30 (Becker et al., 2002; T. Münster, K.-U. Winter, persönliche Mitteilung) und für die dikotyle Modellpflanze *A. thaliana* von ca. 80 MADS-Box-Genen (Riechmann et al., 2000) im Genom berichtet. Ob diese vermutlich geringere Gen-Anzahl einhergeht mit einer geringeren funktionellen Spezialisierung der einzelnen MADS-Domänen-Proteine von *P. patens*, bleibt aufzuklären. Falls dies auf der Organisationshöhe eines Mooses überhaupt benötigt würde, könnte durch eine solche geringere Spezialisierung auch mit einer relativ geringen Anzahl von MADS-Box-Genen eine große funktionelle Vielfalt erreicht werden.

Eine weitere Fragestellung ist, ob MADS-Box-Gen-Netzwerke, wie sie z.B. aus Blütenpflanzen bekannt sind (Übersicht in: Theißen, 2001a; Soltis et al., 2002), auch in Moosen vorkommen. Eine Analyse des putativen Promotor-Bereichs von *PPM2* als Vertreter der MIKC^c-Typ Gene zeigte, daß dieser Bereich ein CArG-Box Motiv (Schwarz-Sommer et al., 1992) enthält. Die CArG-Box ist ein typisches Promotorelement der MADS-Box-Gene, wobei hier MADS-Domänen-Transkriptionsfaktoren selbst in Form von Dimeren binden. Von höheren Pflanzen ist bekannt, daß die CArG-Box wichtig zur Ausbildung von Gen-Netzwerken ist (Schwarz-Sommer et al., 1992).

Neben der CArG-Box finden sich weitere, aus Samenpflanzen bekannte, regulatorische Sequenzen im putativen Promotor von *PPM2*, so z.B. Konsensus-Bindestellen (CCANTG) für FLORICAULA/LEAFY-ähnliche Proteine (Busch et al., 1999). Demnach könnte das Vorkommen von aus höheren Pflanzen bekannten regulatorischen Sequenzen darauf hinweisen, daß auch die Transkription von *PPM2* durch MADS-Domänen-Proteine und FLORICAULA/LEAFY-ähnliche Proteine kontrolliert wird. Zwei Homologe der LEAFY-Gene höherer Pflanzen konnten aus *P. patens* isoliert werden (Himi et al., 2001). Da diese LEAFY-ähnlichen Gene, *PpLFY1* und *PpLFY2*, ein ubiquitäres Expressionsmuster aufweisen, im Gegensatz zu *PpMADS1*, welches ausschließlich in den Gametangien und im Sporophyten exprimiert ist, schloß Hasebe eine Regulation von *PpMADS1* durch LEAFY aus (Hasebe,

persönliche Mitteilung). Da die ubiquitäre Expression von *PpLFY1* und *PpLFY2* (Hasebe, persönliche Mitteilung) jedoch im Einklang mit der Expression von *PPM1*, *PPM2* und *PPM3* steht, in deren Promotoren *LEAFY*-Bindestellen vorkommen, kann eine Regulation von *PPM1* – *PPM3* durch *LEAFY* durchaus vermutet werden.

Eine weitere Ebene eines Gen-Netzwerkes stellt die Protein-Interaktion dar. Aus dem Vorhandensein von K-Domänen in den *P. patens* MADS-Domänen-Proteinen kann abgeleitet werden, daß auch in Moosen Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Proteinen mit K-Domänen vermitteln werden könnten. Auch die Bildung ternärer und quarternärer Proteinkomplexe, wie sie für MADS-Domänen-Proteine aus Samenpflanzen beschrieben ist (Egea-Cortines et al., 1999; Theißen und Saedler, 2001; Theißen, 2001b), ist auf Grund der in den *P. patens* MADS-Domänen-Proteinen vorhandenen C-Domänen prinzipiell ermöglicht.

Darüberhinaus ist zur Ausbildung von Gen-Netzwerken sicher eine minimale Anzahl an MADS-Box-Genen nötig. Daher weist auch die Anzahl von fünf oder mehr *P. patens* MADS-Box-Genen sowohl vom MIKC^c- als auch vom MIKC^{*}-Typ darauf hin, daß MADS-Box-Gene in Moosen in komplexe Gen-regulatorische Netzwerke, ähnlich denen in Blütenpflanzen und Gymnospermen, involviert sein könnten. Ob Gen-Netzwerke auch in Farnen vorkommen, ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bekannt.

4.7 Untersuchungen zum Expressionsmuster von *PPM1* - *PPM4*

Bei der Untersuchung der Expression der vier MADS-Box-Gene *PPM1* - *PPM4* aus *P. patens* ergaben sich sowohl Hinweise auf ubiquitäre, als auch auf räumlich oder zeitlich differentielle Expressionsmuster. *PPM1* - *PPM3* zeigten in allen Stadien des *P. patens* Lebenszyklus ein etwa gleich starkes Expressionsniveau. Dagegen nahm die Expression von *PPM4* mit zunehmendem Alter der Moos-Kultur ab. In einer Woche altem Protonema war eine mit den anderen drei Genen vergleichbar starke *PPM4*-Expression zu beobachten, die aber mit Fortschreiten der Entwicklung der Moose abnahm. Daher könnte die Expression von *PPM4* z.B. auf das Protonema-Stadium beschränkt sein. Da auf Grund der Entwicklung von Gametophoren, und anschließend auch Gametangien und Sporophyten, zum einen das Protonema-Gewebe zurückgeht und zum anderen der bei der Materialernte enthaltene Protonema-Anteil proportional geringer ist, wird das Expressions-Signal schwächer.

Ein ubiquitäres Expressionsmuster wie von *PPM1* - *PPM3* findet sich auch bei vielen MADS-Box-Genen aus dem leptosporangiaten Farn *Ceratopteris richardii* (Münster et al., 1997; Di Rosa, 1998; Hasebe et al., 1998). Die mRNA der Gene *CRM3* und *CRM6* konnte von Di Rosa (1998) in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden, darunter gametophytische und sporophytische Gewebe. Auch Hasebe und Mitarbeiter (1998) berichteten von einer ubiquitären

Expression bei *Ceratopteris* MADS-Box-Genen. In beiden Untersuchungen konnte jedoch auf Grund von Northern- und *in-situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, daß das Expressionsniveau in den verschiedenen Geweben unterschiedlich hoch ist. Auch bei dem eusporangiaten Farn *Ophioglossum pedunculatum* findet sich häufig eine ubiquitäre Expression der MADS-Box-Gene (T. Münster, persönliche Mitteilung).

Auf Grund der Ergebnisse aus der Untersuchung von *Ceratopteris* wurde bislang vermutet, daß bei Nicht-Samenpflanzen ein ubiquitäres Expressionsmuster im Gegensatz zu der räumlich und zeitlich stark begrenzten Expression von MADS-Box-Genen in Samenpflanzen, die z.B. Funktionen bei der Blütenentwicklung innehaben, besteht. Hasebe entwarf ein Szenario, nach dem ursprüngliche MADS-Box-Gene in allen sich entwickelnden Organen einer Pflanze exprimiert wurden und die MADS-Domänen-Proteine der Nicht-Samenpflanzen auch funktionell weniger spezialisiert waren, und daß, als sich spezialisierte Blütenorgane entwickelten, die Anzahl der MADS-Box-Gene durch Genduplikationen erhöht und deren Expression und Funktion räumlich und zeitlich begrenzt wurde (Hasebe et al., 1998).

4.8 Alternatives Spleißen und alternative Transkriptionsstarts von *PPM2*

Die dieser Arbeit zugrunde liegende cDNA-Sequenz von *PPM2* (*PPM2c*) (Henschel, 1999) weicht von den beiden von Krogan und Ashton (2000) klonierten Formen - *PPM2* und *PPM2b* – ab. Im kodierenden Bereich ist die Sequenz von *PPM2c* identisch mit *PPM2*, während im stromabwärts gelegenen Teil des 3'UTR *PPM2c* identisch mit *PPM2b* ist. Diese Sequenz-Diversität im 3' Bereich kann durch zwei elementare Ereignisse erklärt werden: 1) ein alternatives Spleißen vom Spleißen-/Nicht-Spleißen-Typ, das zehnte Intron betreffend (entsprechend der beschriebenen Numerierung; Krogan und Ashton, 2000); 2) als Folge einer Retention des zehnten Introns wird ein alternatives 3' Prozessierungs- und Polyadenylierungs-Signal verwendet. Die Isolierung von drei verschiedenen cDNA-Isoformen die dem *PPM2*-Genlocus zugehörig sind, dokumentiert so das Vorkommen alternativen Spleißens und differentiellen Prozessierens von MADS-Box-Genen in *P. patens*. Umfassendes alternatives Spleißen ist gut bekannt von *MEF*-ähnlichen MADS-Box-Genen der Tiere (Black und Olson, 1998), wurde jedoch erst selten für pflanzliche MIKC-Typ MADS-Box-Gene beschrieben. Daß die Arten, in denen alternatives Spleißen beobachtet wurde, sowohl Farne und Samenpflanzen (Kyojuka et al., 1997; Gassen, 1999; Theißen et al., 2000; Gocal et al., 2001), als auch Moose umfassen (Krogan und Ashton, 2000; diese Arbeit), deutet darauf hin, daß dieses alternative Spleißen ein phylogenetisch ursprüngliches und möglicherweise wichtiges Phänomen ist.

Wie die vorläufige Bestimmung des putativen Transkriptionsstarts von *PPM2* zeigte, kommen zwei putative Startpunkte stromaufwärts des Translationsstarts ATG vor (einer bei -219 Bp und der andere bei -555 Bp). Zwischen diesen beiden putativen Transkriptionsstarts liegt das CAR-Box Motiv von *PPM2* bei -394 Bp. Ob dieser Anordnung eine regulatorische Bedeutung zukommt, bleibt zu analysieren. Das Vorkommen von zwei unterschiedlich großen Transkripten wurde auch durch Northern-Analysen mit einer *PPM2*-spezifischen Sonde in Wildtyp-Protonema-RNA bestätigt. Die Differenz der Transkriptgrößen entspräche der Entfernung der beiden putativen Transkriptionsstarts. Demnach könnte das Vorhandensein zweier Transkriptionsstarts ursächlich für das Auftreten zweier Transkriptlängen sein.

Jedoch führt auch das alternative Spleißen zur Erzeugung von *PPM2*-Transkripten unterschiedlicher Länge. Daher kann nicht entschieden werden, auf welchen molekularen Prozeß das Auftreten der unterschiedlichen *PPM2*-Transkripte zurückgeht. Sowohl durch die Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstarts, als auch durch das alternative Spleißen besitzt *PPM2* das Potential zur Erzeugung mehrerer unterschiedlicher Transkripte. Eine funktionelle Relevanz hiervon bleibt jedoch noch aufzuklären.

4.9 Funktionelle Charakterisierung der *P. patens* MADS-Box-Gene in *Physcomitrella*

Zur Analyse der Funktionen von *P. patens* MADS-Box-Genen sollten zunächst die Gene *PPM2* und *PPM3* mittels homologer Rekombination ausgeschaltet werden. Hierzu wurden knock-out Konstrukte verwendet, die über 500 Bp lange cDNA-homologe Bereiche zu beiden Seiten eines Selektionsmarkers verfügten (Henschel, 1999). Bei der molekularen Untersuchung der erhaltenen transformierten *P. patens* Linien sollten mögliche Veränderungen am genomischen Lokus der MADS-Box-Gene durch genomische Southern-Hybridisierungen nachgewiesen werden.

Analyse der putativen PPM3 knock-out Linien

Bei der molekularen Analyse der *PPM3* knock-out Linien zeigte sich, daß bei sechs der acht untersuchten *PPM3* knock-out Linien der genomische Lokus von *PPM3* verändert worden ist. Die Integration des Konstrukts erfolgte in zahlreichen Kopien ins Genom von *P. patens*, was durch Southern-Hybridisierung von *EcoRV* verdauter DNA unter Verwendung einer gesamt cDNA-Sonde von *PPM3* gezeigt worden war. Der Ort der Integration der knock-out Konstrukte konnte durch Verwendung des Restriktionsenzym *SfiI* und mittels spezifischer Sonden gegen den 5'- und 3'-Bereich des Gens eingegrenzt werden. Hierbei wurde der Einbau von mindestens zehn

Kopien des Konstruktes, wahrscheinlich aber auch deutlich mehr, was nicht mehr aufgelöst werden konnte, in den 3'-Bereich des Gens nachgewiesen.

Eine Erklärung für die Integration des Konstruktes in den 3'-Bereich bietet die Exon-Intron-Struktur von *PPM3*. Entgegen der bislang bekannten Exon-Intron-Struktur der MIKC^c-Typ Gene, mit einer über das gesamte Gen relativ einheitlichen Verteilung der Introns, weicht die Exon-Intron-Struktur der MIKC^{*}-Typ Gene hiervon durch eine deutlich höhere Intron-Anzahl in der I-Region, und damit im 5'-Bereich des Gens, ab. Da bei einer Verwendung von cDNA knock-out Konstrukten die Homologie-Bereiche auf die Exons beschränkt sind, loopen die Introns bei einer Anlagerung des knock-out Konstruktes an das homologe Gen heraus. Es ergeben sich auf Grund der größeren Intron-Anzahl im 5'-Bereich deutlich längere Homologie-Bereiche im 3'-Bereich, so daß dieser Bereich bei einer Anlagerung bevorzugt ist.

Eine Integration vieler Kopien des knock-out Konstruktes ins Gen, wie sie am *PPM3* Locus stattgefunden hat, ist meiotisch meist nicht stabil, da durch mögliche Sequenz-Wiederholungen eine Anlagerung der Einzelstränge nicht präzise erfolgen kann (Schäfer und Zryd, 1997). Durch meiotische Reduktion der Konstrukt-Kopien Anzahl verändert sich der untersuchte Locus kontinuierlich, wodurch mutante Phänotypen eventuell nicht erhalten bleiben. Sowohl eine einseitige Integration, als auch die mehrfache Integration des knock-out Konstruktes kann durch Verwendung von genomischen knock-out Vektoren umgangen werden, da hierbei ein Austausch zwischen Konstrukt und Gen auf ± 2 Bp des Homologiebereiches genau erfolgt (Schaefer, persönliche Mitteilung), und für gewöhnlich nur eine Kopie des Konstrukts den homologen Bereich des Gens ersetzt, wodurch meiotisch stabile Transformanten entstehen.

Die molekulare Analyse der putativen *PPM3* knock-out Linien hatte gezeigt, daß in sechs unabhängigen Linien der 3'-Bereich des *PPM3*-Locus verändert ist. Dieser Bereich umfaßt die K- und C-Region, welchen wichtige Aufgaben bei der Dimerisierung und der Entstehung von ternären und quarternären Proteinkomplexen zukommen. Allerdings ist bislang nicht bekannt, inwieweit durch eine Veränderung dieser Regionen die gesamte Funktion von MIKC^{*}-Typ MADS-Domänen-Proteinen ausfällt.

Die erhaltenen *PPM3* knock-out Linien wiesen keine im Vergleich zum Wildtyp veränderten Phänotypen auf. So erfolgte bei ihnen das Umschalten vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium gleichzeitig mit dem Wildtyp. Darüberhinaus war die Gametophoren-Morphologie bei ihnen identisch mit der vom Wildtyp. Desweiteren erfolgten die Ausbildung von Gametangien, die Befruchtung dieser und die Reifung der Sporophyten parallel in den *PPM3* knock-out Linien und im WT. Da in diesen Linien demzufolge keine Hinweise auf mögliche Funktionen von *PPM3* erlangt werden konnten, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit keine weitergehende Analyse. Um sicherzustellen, daß nach der Integration des knock-out Konstruktes keine möglicherweise funktionellen Teil-Proteine von *PPM3* gebildet werden können, sollen zukünftig *PPM3* knock-out

Linien durch die Verwendung eines auf dem genomischen Lokus basierenden knock-out Konstruktes erzeugt werden. Treten hierbei auch keine veränderten Phänotypen auf, so bliebe noch das Vorkommen funktioneller Redundanz als mögliche Erklärung für unveränderte Phänotypen. Ein mögliches Auftreten funktioneller Redundanz in *P. patens* wird durch eine eventuelle Genomduplikation nahegelegt. Allerdings liegen hierzu bislang nur Hypothesen und kein direkter Nachweis vor.

Analyse der PPM2 knock-out Linien

Bei der molekularen Analyse der *PPM2* knock-out Linien bestand das Problem, daß nur wenige Restriktionsenzyme zur Verfügung standen, die gezielt den genomischen Bereich von *PPM2* in zwei Fragmente definierter Größe schneiden. Dies war jedoch erforderlich, da überprüft werden sollte, in welcher Form das Gene-Targeting stattgefunden hat, ob als Allel-Replacement mittels „Doppel-Crossing-over“ oder als „Konstrukt-Insertion“ (Schaefer, 2001). Im Fall von einfacher Konstrukt-Insertion sollte gezeigt werden, ob der funktionell wichtige 5´Bereich des Gens mit der MADS-Domäne betroffen war, so daß ein Funktionsverlust erwartet werden konnte, oder der 3´Bereich, wodurch eventuell noch funktionelle Teil-Proteine, die die MADS-, I- und K-Domäne enthalten, gebildet werden könnten.

Die Analyse der putativen *PPM2* knock-out Linien erfolgte mittels *EcoRV* verdauter DNA, die mit einer gesamt cDNA-Sonde von *PPM2* hybridisiert wurde. *EcoRV* besitzt zwei Schnittstellen im knock-out Konstrukt, so daß bei Integration zahlreicher Kopien am Gen-Lokus mehrere Banden zu erwarten wären, wie es auch in der Analyse der *PPM3* knock-out Linien zutraf. Dies war jedoch bei den *PPM2* knock-out Linien nicht der Fall. Stattdessen wurde in den Linien E, P, R und T ein deutlich vergrößerter 5´Bereich des *PPM2* Gen-Lokus nachgewiesen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die beiden *EcoRV*-Schnittstellen im knock-out Konstrukt durch das Restriktionsenzym nicht erkannt worden sind. Ähnliches wurde schon von Schäfer und Zryd (1997) beschrieben, die daraufhin einen Verlust oder eine Methylierung der Schnittstelle vermuteten.

Durch die Entstehung eines deutlich vergrößerten 5´Bereichs des *PPM2* Gen-Lokus in den Linien E, P, R und T war gezeigt worden, daß in diesen vier *PPM2* knock-out Linien der genomische Lokus von *PPM2* verändert worden war, und daß das Gene-Targeting mittels Konstrukt-Insertion im 5´Bereich des Gens stattgefunden hat. Hierbei war in den 5´Bereich von *PPM2* im Fall der Linie R wahrscheinlich eine Kopie des knock-out Konstruktes integriert worden. Dies geht daraus hervor, daß die Größe des 5´Fragments um 2,7 kBp zugenommen hat, was der Fragment-Größe des knock-out Konstruktes entspricht. Bei den Linien E, P und T waren wahrscheinlich zwei bis drei Kopien des knock-out Konstruktes in den 5´Bereich von *PPM2* inseriert worden. Demzufolge

war bei allen vier cDNA knock-out Linien der funktionell wichtige Bereich des Gens verändert worden.

Die phänotypische Analyse der *PPM2* knock-out Linien E, P, R und T ergab, daß zwei der Linien, E und P, unmittelbar nach der Propagation mit der Gametophoren-Bildung beginnen. Durch Southern-Analysen, in denen nur ein Locus detektiert wurde, konnte ausgeschlossen werden, daß neben *PPM2* noch ein zweites Gen ausgeschaltet worden war, so daß ein Doppel-knock-out als mögliche Ursache von veränderten Phänotypen in den Linien E und P gegenüber R und T ausscheidet. Durch Northern-Analysen war gezeigt worden, daß in den Linien E und P kein *PPM2*-Transkript gebildet wird. Dagegen werden womöglich in den Linien R und T noch geringe Mengen funktionelles *PPM2* gebildet, die zur Ausübung der Funktion hinreichen. Dies wird durch Northern-Analysen mit *PPM2*-spezifischen Sonden nahegelegt, in denen in diesen beiden knock-out Linien wenig Transkript nachgewiesen worden war, obwohl der *PPM2*-Genlocus verändert ist. Allerdings ist nicht klar, ob aus diesem Transkript auch funktionelles Protein gebildet werden kann.

Eine detaillierte phänotypische Analyse der *PPM2* knock-out Linien E und P zeigte, daß in diesen Linien wenig Protonema gebildet wird und sowohl auf Minimal-Medium, als auch auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium innerhalb der ersten Woche nach Propagation die Ausbildung von Gametophoren erfolgt. Dagegen werden in parallel angezogenem WT auf Minimal-Medium nach zwei Wochen, auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium erst nach vier Wochen Gametophoren gebildet. Allerdings weisen die Gametophoren, Gametangien und Sporophyten von WT und den *PPM2* knock-out Linien E und P eine übereinstimmende Morphologie auf. Auch werden in WT und den Linien E und P die Gametangien und Sporophyten nach gleicher Induktionsdauer gebildet.

Demnach ist die unterschiedliche Dauer der Protonema-Phase bis zur Knospenbildung der einzige Unterschied zwischen WT und den *PPM2* knock-out Linien E und P, der bislang festgestellt werden konnte. Das bedeutet, der Phasenübergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium findet in den knock-out Linien zu einem anderen Zeitpunkt statt als im WT, er erfolgt um mindestens sieben Tage zu früh.

Der Wechsel vom Protonema-Stadium zum Gametophoren-Stadium wird verursacht durch den Übergang vom filamentösen zum dreidimensionalen meristematischen Wachstum. Es wechselt der thallophytische Habitus des Protonemas in den „Kormophyten-ähnlichen“ Habitus des Gametophoren. Hierbei findet an der zweiten subapikalen Zelle des mittels apikalen Spitzenwachstums wachsenden Caulonema-Fadens wahrscheinlich durch Zunahme des Phytohormons Cytokinin die Bildung einer Initialzelle statt (Schumaker und Dietrich, 1998). Aus dieser Initialzelle entwickelt sich entweder ein Seitenast, der ebenfalls mittels apikalen Spitzenwachstums wächst, oder sie entwickelt sich durch einen Cytokinin-Stimulus zu einer

Knospe. Durch einsetzendes meristematisches Wachstum entwickeln sich aus den Knospen die Gametophoren (Schumaker und Dietrich, 1998).

Unter den beschriebenen natürlichen oder experimentell erzeugten Mutanten von *P. patens* ist ein ähnlicher Phänotyp wie der der *PPM2* knock-out Linien auch von transgenen *P. patens* Linien bekannt, in denen das Cytokinin-Synthese Gen *IPT* aus *Agrobacterium tumefaciens* überexprimiert wird (Reutter et al., 1998; Schulz et al., 2000). Bei diesen transgenen Linien ist die Cytokinin-Konzentration im umgebenden Medium drastisch erhöht, wodurch die Knospen-Bildung auf Minimal-Medium nach fünf Tagen erfolgt, statt nach 13 Tagen im WT (Schulz et al., 2000). Demnach erfolgen sowohl beim Ausschalten von *PPM2*, als auch bei einer Erhöhung der Cytokinin-Konzentration, die Knospen-Bildung und damit die Gametophoren-Bildung zu früh.

Da beim Ausschalten von *PPM2* eine zu frühe Knospen-Bildung erfolgt, ist wahrscheinlich, daß es sich bei *PPM2* um einen Repressor der Knospen-Bildung in *P. patens* handelt. Demnach würde die endogene Funktion von *PPM2* darin liegen, die Initialzellen-Bildung im Protonema und die nachfolgende Knospen-Bildung zu unterdrücken. Wird *PPM2* dort nicht exprimiert, fällt die Repression weg und die Initialzellen- und Knospen-Bildung erfolgen unmittelbar, d.h. ein Übergang vom filamentösen zum meristematischen Wachstum findet statt.

Da an diesem Übergang nur wenige Zellen beteiligt sind, könnte dies bedeuten, daß die Änderungen im *PPM2*-Expressionsniveau nur in wenigen Zellen stattfinden und *PPM2* daher nur scheinbar konstitutiv exprimiert ist, wie in den Expressionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit festgestellt worden war. Das genaue Expressionsmuster könnte auf zellulärer Ebene mittels *in-situ*-Hybridisierungs-Techniken aufgeklärt werden. Demgegenüber könnte allerdings auch eine Regulation von *PPM2* auf Proteinebene vorliegen, so daß die Expression von *PPM2* tatsächlich konstitutiv erfolgt.

Es ist fraglich, ob *PPM2* und Cytokinin parallel an diesem Übergang beteiligt sind oder ob *PPM2* direkt über die Absenkung der Cytokinin-Konzentration diesen Übergang steuert. Für den Fall, daß *PPM2* wie in den knock-out Linien ausfällt und infolgedessen die Cytokinin-Konzentration steigen würde, müßten in den knock-out Linien erhöhte Cytokinin-Konzentrationen im umgebenden Medium meßbar sein. Darüberhinaus sollten die Knospen und Gametophoren wahrscheinlich Mißbildungen aufweisen, da solche morphologischen Veränderungen durch zu hohe Cytokinin-Konzentrationen bedingt werden (Ashton et al., 1979).

Alternativ könnte auch die Erhöhung der Cytokinin-Konzentration das Expressionsniveau von *PPM2* senken, wodurch *PPM2* als Repressor wegfällt und der Übergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium stattfindet.

Analyse der 35S::PPM2 Linie

Die Überexpression von *PPM2* unter dem konstitutiven 35S-Promotor in *P. patens* bedingt, daß die in Dauerkultur überführte Überexpressionslinie M26 im Protonema-Stadium des Moos-Lebenszyklus arretiert ist.

Die detaillierte Analyse ergab, daß in M26 eine große Menge Protonema gebildet wird, welches auch verzweigt ist. Allerdings erfolgt in M26 kein normaler Übergang vom Protonema-Stadium zum Gametophoren-Stadium. Dies ist unabhängig davon, ob die Anzucht auf Minimal-Medium oder auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium erfolgt. Dagegen erfolgt in parallel angezogenem WT dieser Übergang auf Minimal-Medium nach zwei Wochen, auf NH₄-Tartrat-haltigem Medium nach vier Wochen. Demnach ist bei M26 die Protonema-Phase drastisch verlängert, d.h. der Übergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium findet nicht oder zur falschen Zeit statt.

Daß eine Gametophoren-Bildung in M26 prinzipiell möglich ist, ist aus der Bildung vereinzelter Gametophoren innerhalb des Beobachtungszeitraums von einem Jahr bekannt. Auf diesen wenigen entstandenen Gametophoren sind trotz induktiver Bedingungen innerhalb von vier Monaten keine Gametangien gebildet worden. Ob dies prinzipiell nicht möglich ist, kann allerdings auch nicht definitiv ausgeschlossen werden, da die Zeiträume bis zur Entstehung von Gametangien z.B. stark Jahreszeiten-abhängig zu sein scheinen.

Aus der Tatsache, daß eine Gametophoren-Bildung in M26 prinzipiell möglich ist, kann geschlossen werden, daß durch die Überexpression von *PPM2* nur der Zeitpunkt des Phasenübergangs vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium verschoben ist, er findet, falls überhaupt, deutlich später statt. Auch aus der Analyse der *PPM2* knock-out Linien E und P war der Hinweis hervorgegangen, daß durch das Ausschalten von *PPM2* der Übergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium verschoben ist, er findet deutlich früher statt. In den knock-out Linien E und P und in der Überexpressionslinie M26 ist demnach derselbe Phasenübergang innerhalb des Moos-Lebenszyklus zeitlich verschoben worden. Hierbei führt das Ausschalten von *PPM2* zu einer Beschleunigung, die Überexpression zu einer Verzögerung der Knospen-Induktion und Gametophoren-Bildung. Demzufolge könnte es sich bei *PPM2* in der Tat um einen Repressor handeln, der im WT den Übergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium unterdrückt, bis - eventuell durch einen Cytokinin-Stimulus bedingt - dieser Übergang in wenigen definierten Zellen stattfindet. Wird *PPM2* ausgeschaltet, so fällt der Repressor weg und der Übergang findet zu früh statt. Wird *PPM2* überexprimiert, ist eine große Menge an Repressor vorhanden und der Übergang wird verhindert.

Bleibt allerdings die Frage, in welcher Form *PPM2* als Repressor an diesem Phasenübergang beteiligt sein könnte. Hinweise hierauf konnten durch *P. patens* Mutanten in der Cytokinin-Perzeption erhalten werden. So wurde von Reutter und Mitarbeitern (1998) gezeigt, daß zum

Übergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium vergleichbare Konzentrationen an Cytokinin benötigt werden, wie zur Teilung von Chloroplasten in den Zellen. Findet die Teilung der Chloroplasten nicht statt, so entsteht ein einzelner großer Chloroplast pro Zelle, ein sogenannter Makrochloroplast.

Aus der Tatsache, daß in der *PPM2* Überexpressionslinie M26 keine Makrochloroplasten vorliegen, sondern viele kleine, linsenförmige Chloroplasten wie im WT, kann geschlossen werden, daß bei M26 keine Verringerung der Cytokinin-Konzentration besteht. Das bedeutet, durch Überexpression von *PPM2* ist weder die Cytokinin-Synthese herabgesetzt, noch die Cytokinin-Perzeption gestört, noch bindet *PPM2* das vorhandene Cytokinin, so daß dadurch die Cytokinin-Konzentration gesenkt wäre. Demnach reguliert *PPM2* nicht die Cytokinin-Konzentration.

Auch kann ausgeschlossen werden, daß *PPM2* und Cytokinin über parallele unabhängige Signalwege den Phasenübergang vom Protonema- zum Gametophoren-Stadium steuern, da in diesem Fall in M26 Gametophoren über den Cytokinin-Weg entstünden.

Demnach könnte *PPM2* durch Cytokinin reguliert sein, entweder auf Ebene der Expression oder auf Ebene des funktionellen Proteins. So wäre in der meisten Zeit des Lebenszyklus von *P. patens* die Cytokinin-Konzentration relativ gering, funktionelles *PPM2* läge vor und unterdrückte die Knospen-Bildung. Stiege die Cytokinin-Konzentration, so würde die Menge an funktionellem *PPM2* sinken, der Repressor der Knospen-Bildung würde wegfallen und die Knospen-Bildung fände statt.

Eine Regulation des Übergangs vom filamentösen zum meristematischen Wachstum auf Proteinebene wird auch von anderen vermutet (Fu et al., 1999; Girod et al., 1999). So sind *P. patens* Linien, in denen eine Untereinheit des 26S Proteasoms durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war, ebenfalls im Protonema-Stadium arretiert. Es wurde daher postuliert, daß ein Repressor vorkommt, der den Übergang vom Protonema-Stadium zum Gametophoren-Stadium in Abwesenheit entsprechender Hormonsignale unterdrückt. Wenn eine ausreichende Hormon-Konzentration erreicht ist werden die Repressor-Moleküle durch Degradation entfernt und/oder durch Aktivatoren überkommen, wodurch die Entwicklung der Gametophoren stattfinden kann (Fu et al., 1999; Girod et al., 1999). Ob es sich bei diesem Repressor tatsächlich um *PPM2* handelt, bleibt zukünftig zu analysieren.

Auch in höheren Pflanzen ist in einigen Fällen eine Regulation von MADS-Box-Genen durch Phytohormone beschrieben worden. So ist die gemeinsame Kontrolle von Entwicklungsprozessen durch MADS-Box-Gene und Cytokinin in Tabak und Senf berichtet worden: Es konnte gezeigt werden, daß Cytokinin und Gibberellinsäure an der Blüteninduktion in Senf (*Sinapis alba*)

beteiligt sind, indem die Expression von *SaMADS A* im Apikalmeristem durch Cytokinin und Gibberellinsäure induziert wird (Bonhomme et al., 2000).

Zum anderen führt eine zu hohe Cytokinin-Konzentration zu einer Absenkung des Expressionsniveaus einiger floraler homöotischer Gene. So sinkt in Tabak die Expression der Orthologen der B-Funktionsgene *DEF* und *GLO*, sowie des C-Funktionsgens *PLENA* von *Antirrhinum majus* infolge zu hoher Cytokinin-Konzentrationen (Estruch et al., 1993). Dies wurde anhand von Tabakpflanzen untersucht, die somatische Mosaikpflanzen für ein Cytokinin-Synthese Gen waren und vivipare Blätter hatten, auf denen sowohl vegetative, als auch florale Knospen entstanden. Die floralen Knospen waren entweder normal oder abnormal. Hierbei wurden Abnormalitäten durch zu hohe Cytokinin-Konzentrationen und eine Abnahme der mRNA der Orthologen von *DEF*, *GLO* und *PLENA* von *A. majus* bedingt (Estruch et al., 1993).

Ob eine Regulation von MADS-Box-Genen durch Phytohormone ein allgemeiner und womöglich ursprünglicher Mechanismus in pflanzlichen Entwicklungsprozessen ist, bleibt zukünftig zu analysieren.

4.10 Funktionelle Charakterisierung der *P. patens* MADS-Box-Gene im heterologen Testsystem *Arabidopsis thaliana*

Auf Grund von strukturellen Ähnlichkeiten zu MADS-Box-Genen der höheren Pflanzen wurde *PPM2*, und im Vergleich dazu auch *PPM3*, unter dem konstitutiven 35S-Promotor in *Arabidopsis thaliana* exprimiert.

Die Expression von *PPM2* und *PPM3* in *A. thaliana* resultierte in unterschiedlichen Phänotypen. Während die 35S::*PPM3*-Pflanzen einen wildtypischen Phänotyp aufwiesen, d.h. die Expression von *PPM3* führte weder zu detektierbaren morphologischen, noch zu offensichtlichen physiologischen Veränderungen, resultierte die Expression von *PPM2* in zahlreichen unabhängigen Linien in einer Phänokopie des „*curly leaf*“ Phänotyps.

Die Phänokopie des *curly leaf* Phänotyps durch *PPM2*-Expression im WT von *A. thaliana* umfaßte alle für *curly leaf* Mutanten beschriebenen Teilaspekte: aufgerollte Blätter und Zwergenwuchs, frühzeitig geöffnete Blütenknospen, karpelloide Sepalen mit stigmatischem Gewebe an den Sepalenspitzen und Ovula an den Sepalenträndern, frühe Blüte unter Kurztagbedingungen (Goodrich et al., 1997). Die molekulare Ursache der *curly leaf* Mutante von *A. thaliana* ist aufgeklärt. Goodrich und Mitarbeiter (1997) konnten zeigen, daß die endogene Funktion von *CURLY LEAF* darin besteht, die Transkription des floralen homöotischen MADS-Box-Gens *AGAMOUS (AG)* in Blättern, Infloreszenzachsen und Blüten zu unterdrücken, so daß ein Ausfall von *CURLY LEAF* eine ektopische Expression von *AGAMOUS* bedingt. Als C-

Funktionsgen in der Blütenentwicklung von *A. thaliana* bestimmt *AGAMOUS* die Identität der Organe des dritten und vierten Wirtels (Yanofsky, 1990).

Neben Mutationen im *CURLY LEAF* Gen, führt auch die Überexpression von Genen aus der *AG*-Genfamilie (Mizukami und Ma, 1992; Kirchner, 2001) oder die gleichzeitige Überexpression der B-Funktionsgene *APETALA3* (*AP3*) und *PISTILATA* (*PI*) zu einem *curly leaf* Blatt-Phänotyp (Krizek und Meyerowitz, 1996). Von weiteren Genen, insbesondere MADS-Box-Genen, deren ektopische Expression zu einer Phänokopie des *curly leaf* Blatt-Phänotyps führt, wurde bislang nicht berichtet.

Eine Phänokopie der veränderten Blüten-Morphologie der *curly leaf* Mutante und der *35S::PPM2* Linien wird ebenfalls durch die Überexpression *AG*-ähnlicher Gene erzielt (Mizukami und Ma, 1992; Kirchner, 2001). Außerdem gleicht der *35S::PPM2* Blüten-Phänotyp Mutanten, in denen das A-Funktionsgens *AP2* ausgefallen ist (Gustafson-Brown et al., 1994). Dagegen sind aber bei der *ap2* Mutante die Blätter nicht aufgerollt.

Da der Blatt-Phänotyp der *35S::PPM2* Linien vergleichbar mit der Blatt-Morphologie der *curly leaf* Mutante ist und damit auch durch Überexpression *AG*-ähnlicher Gene oder andererseits durch gleichzeitige Überexpression von *AP3* und *PI* erzielt wird, sollte ausgeschlossen werden, daß *PPM2* indirekt über die ektopische Expression der endogenen *A. thaliana* Gene wirkt. Durch Expressionsanalysen in transgenen *35S::PPM2* Linien konnte gezeigt werden, daß diese Phänokopie in den Blättern nicht durch Expression des endogenen *AG* Gens oder der endogenen B-Funktionsgene erfolgt. Demzufolge kann auch ausgeschlossen werden, daß die Expression von *PPM2* zu einem Ausschalten des *CLF* Gens führt.

Da sowohl die veränderte Blatt-Morphologie, als auch die veränderten Phänotypen der Blüten in der Gesamtheit nur dem Ausschalten des *CLF* Gens oder aber der Überexpression eines *AG*-ähnlichen Gens entsprechen, sollte überprüft werden, ob und inwiefern *PPM2* z.B. die Funktion von *AG* übernehmen kann.

Es war daher versucht worden, die *agamous* Mutante von *A. thaliana* mittels *PPM2* Expression zu komplementieren. In der verwendeten Mutante *ag-1* ist keine endogene *AG*-Funktion mehr vorhanden (Yanofsky et al., 1990). Die morphologische Untersuchung unabhängiger transgener Linien ergab, daß die *35S::PPM2* homozygoten *agamous* Pflanzen aufgerollte Blätter besaßen. Ferner wurden stigmatisches Gewebe, Ovula-Primordien und selten komplette Ovula an den Sepalen transgener homozygoter *agamous* Pflanzen gebildet. Häufig wuchsen aus den differenzierten, undeterminierten Blüten neue Blüten und Infloreszenzen heraus. Diese durch *PPM2* Expression im homozygoten *agamous* Hintergrund erhaltenen Phänotypen gleichen den Phänotypen von *35S::GGM3* transgenen Pflanzen mit homozygotem *agamous* Hintergrund (Kirchner, 2001). *GGM3* ist das *AG*-Orthologe aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon* (Winter et al., 1999). Auch *GGM3* führte nicht zu einer weitreichenden Komplementation der *agamous* Mutante. Hierbei waren die Entstehung von Ovula auf den Sepalen und die Bildung neuer

Infloreszenzen in den Blüten, die als Umschaltung von einem Blütenmeristem zu einem Infloreszenzmeristem bezeichnet wurde, als eine *AG*-Teilkomplementation durch *GGM3* gewertet worden (Kirchner, 2001).

Für die weiteren Betrachtungen werden die verschiedenen Aspekte der durch *PPM2* Expression veränderten Phänotypen separat betrachtet. Es wird daher der *curly leaf* Blatt-Phänotyp zum einen von der Entwicklung reproduktiver Organe und zum anderen von der Umwandlung der Blütenmeristem-Identität zur Infloreszenzmeristem-Identität abgegrenzt. Zusätzlich kommt es in den 35S::*PPM2* Pflanzen im WT Hintergrund von *A. thaliana* zur Ausbildung terminaler Blüten an den im WT undeterminierten Infloreszenzachsen, wodurch die Blütenanzahl der Pflanzen verringert ist.

Bei allen vier Prozessen stellt sich die Frage, auf welche Weise die Expression von *PPM2* zu den beobachteten Effekten geführt haben könnte. Das bedeutet, ob *PPM2* direkt Teilfunktionen eines *AG*-ähnlichen Gens übernimmt, oder ob zumindest ein Teil der Funktionen über alternative Signal-Wege erfüllt wird und so zu den beschriebenen Phänotypen führt. Wenn *PPM2* über alternative Signal-Wege zu diesen veränderten Phänotypen führt, so stellt sich die Frage, welche Faktoren daran beteiligt sein könnten. Wenn solche Faktoren auch in *P. patens* aufträten, würden diese Interaktionen vielleicht die endogene Funktion von *PPM2* in *P. patens* widerspiegeln.

Zur Entstehung weiblicher reproduktiver Blütenorgane in *A. thaliana* sind alternative Signal-Wege unabhängig von *AG* beschrieben worden. Eine Möglichkeit zur Erzeugung von Ovula in Blüten von *A. thaliana* in denen keine C-Funktion vorhanden ist, führt über die Gene *CRABS CLAW* und *SPATULA*, wobei *CRABS CLAW* ein Transkriptionsfaktor der *YABBY*-Genfamilie ist (Alvarez und Smyth, 1999; Bowman und Smyth, 1999). *CRABS CLAW* und *SPATULA* wirken unabhängig voneinander und parallel zu *AGAMOUS* bei der Karpell-Entwicklung. Wie im Fall von *AGAMOUS*, wird auch die Expression von *CRABS CLAW* und *SPATULA* durch das A-Funktionsgen *APETALA2* (*AP2*) unterdrückt. Zusätzlich werden diese beiden Gene auch durch das B-Funktionsgen *PI* reprimiert. Demnach werden *CRABS CLAW* und *SPATULA* nur in den Wirteln exprimiert, in denen weder *AP2* noch *PI* vorkommen, das heißt, im WT von *A. thaliana* nur im vierten Wirtel (Alvarez und Smyth, 1999; Bowman und Smyth, 1999). Unter der Annahme, daß die Ausbildung von stigmatischem Gewebe, Ovula-Primordien und Ovula an den Sepalen der 35S::*PPM2* transgenen homozygoten *agamous* Pflanzen über *CRABS CLAW* und *SPATULA* erfolgt, und nicht durch *PPM2* direkt, müßte *PPM2* antagonistisch zu *AP2* wirken, wodurch zumindest lokal *AP2* nicht exprimiert wird und *CRABS CLAW* und *SPATULA* gebildet werden. Alternativ dazu könnte *PPM2* auch direkt als Adressat des Weges zu Ovula über *CRABS CLAW* und *SPATULA* wirken.

Da durch die Expression von *CRABS CLAW* und *SPATULA* jedoch die Ausbildung aufgerollter Blätter, sowie die Umwandlung der Blütenmeristeme zu Infloreszenzmeristemen nicht erklärt

werden können, müßte eine Spaltung der *PPM2* Wirkung angenommen werden. So könnten stigmatisches Gewebe, Ovula-Primordien und Ovula in der Blüte über *CRABS CLAW* und *SPATULA* entstehen, während die Wirkung von *PPM2* auf die Morphologie der Rosettenblätter und der Blütenmeristem-Identität über andere Wege erfolgen würde, z.B. durch *PPM2* gemeinsam mit den endogenen Interaktionspartnern von *AG*.

Wenn *PPM2* direkt *AG*-Funktionen übernehmen kann, so muß unterstellt werden, daß *PPM2* mit den Interaktionspartnern von *AG* direkt interagieren kann oder die gleichen Zielgene wie *AG* ansteuern kann, und so zu denselben phänotypischen Veränderungen führt. Als direkte Interaktionspartner des *AG* Proteins sind im *in-vitro* Testsystem bislang die MADS-Domänen-Proteine *SEP1*, *SEP2*, *SEP3* und *AGL6* nachgewiesen worden (Fan et al., 1997).

Es stellt sich die Frage, wie *PPM2* auf molekularer Ebene mit den Interaktionspartnern von *AG* in Wechselwirkung treten könnte. In Phylogenierekonstruktionen fällt *PPM2* nicht in die Klade der *AGAMOUS*-ähnlichen Gene, so daß hieraus keine Orthologie-Beziehung von *PPM2* zu den *AG*-ähnlichen Genen abgeleitet werden konnte. Demgegenüber bilden *AG*-ähnliche Gene aus dikotylen und monokotylen Blütenpflanzen und Gymnospermen eine stets klar abgegrenzte Klade phylogenetisch eng verwandter Gene (Tandre et al., 1995; Theißen et al., 1996; Theißen et al., 2000; Kirchner, 2001).

Da *PPM2* zwar zum einen *AG*-ähnliche Überexpressions-Phänotypen aufweist, zum anderen aber nicht in die *AG*-Subfamilie fällt, könnte diese Phänokopie eventuell durch strukturelle Ähnlichkeiten der Proteine erklärt werden. Die auffälligste Gemeinsamkeit zwischen *PPM2* und zahlreichen *AG*-ähnlichen C-Funktionsgenen aus Angiospermen und Gymnospermen ist das Auftreten eines sieben AS langen Sequenzmotivs, das in den *AG*-ähnlichen Proteinen das hochkonservierte C-terminale Ende darstellt. In *PPM2* befindet sich dieses Motiv innerhalb der C-Domäne, wobei der Abstand zum C-terminalen Ende der K-Domäne in *AG*-ähnlichen Proteinen und *PPM2* gleich ist. Ob diese Motive in allen Proteinen von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und damit homolog sind, oder ob das Motiv in den Linien, die zu den heutigen Moosen und Gefäßpflanzen führten, mehrfach unabhängig entstanden ist, bleibt unklar. Eine funktionelle Bedeutung dieses C-terminalen sieben AS langen Motivs konnte bislang nicht nachgewiesen werden. So wurde in Überexpressionsstudien nur gezeigt, daß das *AGAMOUS*-Protein ohne C-Domäne nicht funktionsfähig ist (Mizukami et al., 1996). Hierbei erfolgte jedoch keine Analyse der C-Domäne in Bezug auf funktionelle Untereinheiten.

Die Analyse der Ursachen der *AGAMOUS* Teilfunktionen führt zu zwei Vorgängen, die von *AGAMOUS* beeinflußt werden: die Festlegung von Organidentität und die Kontrolle von Zellteilungs- und Meristemaktivität. Als Organidentitätsgen bestimmt *AGAMOUS* die Ausbildung

von Stamina im dritten und Karpellen im vierten Wirtel der *A. thaliana* Blüte. In folgenden Prozessen scheint *AGAMOUS* die Rolle eines Repressors von Meristemaktivität zu besitzen:

Beim durch *AGAMOUS* verursachten *curly leaf* Blatt-Phänotyp kommt es zu einem Aufrollen der Blätter zur Mitte hin. Zudem sind die Blätter in den Mutanten kleiner und schmaler als im WT (Goodrich et al., 1997; Kim et al., 1998). Dies wird durch eine Reduktion der Zellteilungen in den Blättern bedingt, sowie durch eine geringere Zellstreckung (Kim et al., 1998). Demnach kommt es durch die Expression von *AG* in den Blättern zu einer Reduktion der Meristemaktivität, das heißt *AG* wirkt als Repressor der Zellteilungen.

Desweiteren besitzt *AG* eine Funktion bei der Determination der Blüte. Das bedeutet, *AG* kontrolliert den Übergang des Blütenmeristems vom undeterminierten zum determinierten Zustand (Mizukami und Ma, 1997). Hierbei liegt die endogene Funktion von *AG* in der Repression der meristematischen Aktivität des Blütenmeristems.

Schließlich ist ein weiterer Fall bekannt, in dem *AG* als Repressor von Meristemaktivität wirken könnte. So führt die Überexpression von *AG* zur Ausbildung von terminalen Blüten, bestehend aus wenigen Karpellen oder karpelloiden Organen. Demzufolge ist es möglich, daß die ektopische Expression von *AG* die Undeterminiertheit von Infloreszenzen reduziert (Mizukami und Ma, 1992).

Da *PPM2* gerade die meristematischen Funktionen von *AG* im heterologen Testsystem *A. thaliana* direkt oder indirekt übernehmen kann, wird eine Konservierung dieses Regulationsmechanismus von Meristemaktivität durch MADS-Box-Gene nahegelegt. Schließlich wirkt *PPM2* sehr wahrscheinlich auch in *Physcomitrella patens* selbst als Repressor von Zellteilungen und Meristemaktivität beim Übergang vom filamentösen zum meristematischen Wachstum im Moos-Lebenszyklus.

Womöglich unterscheidet sich *AGAMOUS* in seiner Wirkungsweise auf Meristeme von den meisten anderen MADS-Box-Genen der höheren Pflanzen. So könnte *AGAMOUS* über einen ursprünglichen Regulationsmechanismus wirken, der unter den MADS-Box-Genen der höheren Pflanzen nicht weit verbreitet ist. Da sowohl *AGAMOUS*, als auch *PPM2* Meristemaktivitäten regulieren, könnte dieser Wirkungsmechanismus bereits im letzten gemeinsamen Vorläufer-Gen vorhanden gewesen sein. Ein ursprünglicher Wirkungsmechanismus *AG*-ähnlicher Gene wird durch die wahrscheinlich frühe Entstehung dieser Genfamilie nahegelegt (Purugganan et al., 1995). Im Verlauf der Evolution der Samenpflanzen hat sich dann die Wirkungsweise der MADS-Box-Gene verändert. Dabei hat sich die MADS-Box-Gen-Anzahl innerhalb der Samenpflanzen vergrößert, während die Funktionen der einzelnen Gene spezifischer wurden.

5 Zusammenfassung

MADS-Box-Gene spielen in Angiospermen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Blütenstruktur und in Gymnospermen bei der Spezifizierung reproduktiver Organe. Dagegen ist nicht bekannt, welche Funktion MADS-Box-Gene in ursprünglicheren Gefäßpflanzen wie den Farnen, sowie außerhalb der Gefäßpflanzen innehaben. Es wurden daher MADS-Box-Gene aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* hinsichtlich ihrer Funktion untersucht. *Physcomitrella patens* ist die einzige bekannte Landpflanze, die ein effizientes System zum gezielten Ausschalten von Genen mittels Homologer Rekombination besitzt.

Anhand von Sequenzähnlichkeiten und den Exon-Intron-Strukturen konnten zwei Klassen von *P. patens* MIKC-Typ MADS-Box-Genen unterschieden werden: der MIKC^c-Typ und der MIKC^{*}-Typ. Die *P. patens* MIKC^c-Typ Gene *PPM1*, *PPM2* und *PpMADS1* entsprechen in ihrer Struktur den bislang bekannten MIKC-Typ Genen der höheren Pflanzen. So weisen alle eine vergleichbare Exon-Intron-Struktur auf, ein konserviertes Muster hydrophober AS in der K-Domäne, sowie die diagnostische Länge des fünften und sechsten Exons von 42 Bp. Hierbei liegt die I-Domäne auf einem Exon. Dagegen weichen die MIKC^{*}-Typ Gene *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* und *PpMADS3* von dieser sehr einheitlichen Struktur ab, indem die I-Domäne auf vier bzw. fünf Exons verteilt liegt und deutlich länger als die der MIKC^c-Typ Gene ist.

Desweiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die MADS-Box-Gene vom MIKC^{*}-Typ nicht auf *P. patens* begrenzt sind. So wurde anhand der längeren, auf vier Exons verteilten I-Domäne auch *LAMB1* aus dem Bärlapp *Lycopodium annotinum* als MIKC^{*}-Typ Gen erkannt. Diese Verwandtschaft wird auch durch Phylogenierekonstruktionen unterstützt, in denen die MIKC^{*}-Typ Gene eine gut unterstützte Subfamilie bilden. Durch die Isolierung von MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ Genen sowohl aus *P. patens*, als auch aus *L. annotinum* kann geschlossen werden, daß der letzte gemeinsame Vorfahre von Moosen und Bärlappen vor etwa 450 Millionen Jahren bereits je mindestens ein MIKC^c- und ein MIKC^{*}-Typ Gen besessen hat.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Hinweise darauf erlangt werden, daß Gen-Netzwerke, ähnlich den aus höheren Pflanzen bekannten, auch in Moosen vorkommen. Unterstützt wird dies durch das Auftreten regulatorischer Promotorelemente, durch die große Anzahl von je mindestens fünf MADS-Box-Genen vom MIKC^c- und MIKC^{*}-Typ, sowie durch das Vorhandensein von zur Protein-Dimersierung benötigten K-Domänen in den abgeleiteten Genprodukten.

Im Rahmen der funktionellen Analysen im homologen System wurde jeweils ein MIKC^c-Typ Gen, *PPM2*, und ein MIKC^{*}-Typ Gen, *PPM3*, mittels homologer Rekombination ausgeschaltet, sowie *PPM2* unter dem konstitutiven 35S-Promotor in *P. patens* überexprimiert. Die phänotypische Analyse der durch Southern-Analysen identifizierten *PPM3* knock-out Linien zeigte keine offensichtlichen morphologischen oder physiologischen Veränderungen auf.

Dagegen ergab die Analyse der *PPM2* knock-out Linien, sowie der transgenen *35S::PPM2* Überexpressionslinie, daß *PPM2* wahrscheinlich ein Repressor ist, der den Übergang vom Protonema-Stadium zum Gametophoren-Stadium unterdrückt, und damit den Übergang vom filamentösen zum meristematischen Wachstum reguliert.

Im Rahmen der funktionellen Studien im heterologen System wurden *PPM2* und *PPM3* unter dem konstitutiven *35S*-Promotor in *Arabidopsis thaliana* exprimiert. Bei den transgenen *35S::PPM3* Linien konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Dagegen resultierte die Expression von *PPM2* in *A. thaliana* in einer Phänokopie des *curly leaf* Phänotyps. Sowohl in transgenen Pflanzen mit WT Hintergrund, als auch mit homozygotem *agamous* Hintergrund konnte *PPM2* insbesondere die Meristemkontroll-Funktionen von *AGAMOUS* übernehmen. Die Analyse dieser Daten zeigt, daß *PPM2* und *AGAMOUS*, zumindest in Teilen, sehr ähnlich wirken können. Da die Regulation von Meristemaktivitäten durch MADS-Box-Gene sowohl in Moosen, als auch in Samenpflanzen auftritt, könnte dieser Mechanismus bereits im letzten gemeinsamen Vorläufer der rezenten Moose und Samenpflanzen vorhanden gewesen sein, und somit auch eine ursprüngliche Wirkungsweise von MADS-Box-Genen darstellen.

6 Abstract

MADS-box genes play important roles in the formation of flowers within angiosperms, as well as in the formation of reproductive structures within gymnosperms. In contrast, nothing is known about the function of MADS-box genes within more basal tracheophytes such as ferns, or within non-seed plants. Thus, it was decided to study the function of MADS-box genes within the moss *Physcomitrella patens*, which is the only land-plant known so far that offers the possibility to knock out genes via homologous recombination.

The MADS-box genes of *P. patens* represent the MIKC-type MADS-box genes previously known only from higher plants and ferns. By comparison of sequence similarities and by studying exon-intron-structures the *P. patens* MADS-box genes can be at least divided into two types: the MIKC^c- and MIKC^{*}-type. The MIKC^c-type genes of *P. patens* *PPM1*, *PPM2* and *PpMADS1* have nearly identical structures as the MIKC-type genes from higher plants. They share a comparable exon-intron-structure, the conserved pattern of hydrophobic aminoacids within K-domains, as well as the diagnostic length of the fifth and sixth exon of 42 bp. The I-domain is placed on one exon.

In contrast, the MIKC^{*}-type genes *PPM3*, *PPM4*, *PpMADS2* and *PpMADS3* differ from this conserved structure at least by longer I-domains distributed on four or five exons, respectively. It was shown that the MIKC^{*}-type genes are not restricted to the moss *Physcomitrella patens*. Even *LAMB1* from the lycopod *Lycopodium annotinum* shows this longer I-region consisting of four exons instead of one. That *LAMB1* belongs to the MIKC^{*}-type genes is also supported by phylogeny reconstructions, with the MIKC^{*}-type genes forming a clade supported by high bootstrap-values. Due to the isolation of MIKC^c- and MIKC^{*}-type genes from *P. patens* and from *L. annotinum*, the last common ancestor of mosses and lycopods about 450 MYA must have had at least one MIKC^c- and one MIKC^{*}-type gene, respectively.

In this work, evidence was gained that gene networks as known so far from higher plants, might even exist in mosses. This is supported by the appearance of regulatory promoter elements, the high number of at least five MADS-box genes of MIKC^c- and MIKC^{*}-type each, and the existence of K-domains in the predicted gene-products, which are necessary for protein dimerization.

During the course of functional studies the MIKC^c-type gene *PPM2*, as well as the MIKC^{*}-type gene *PPM3* was knocked out via homologous recombination. Furthermore, *PPM2* was expressed constitutively in *P. patens* under control of the 35S-promoter of the Cauliflower Mosaic Virus. The phenotypic analysis of *PPM3* knock out lines detected by Southern-analysis did not reveal a mutant phenotype. Moreover, the analysis of *PPM2* knock out lines, as well as of the transgenic 35S::*PPM2* overexpressing line, showed, that *PPM2* might act as a repressor of the transition

from protonema to gametophore development. Thus, *PPM2* might control the transition from filamentous to meristematic growth.

Moreover functional studies of moss MADS-box genes in the heterologous system of *Arabidopsis thaliana* were performed. The genes *PPM2* and *PPM3* were expressed constitutively under control of the 35S-promoter. The overexpression of *PPM3* did not result in a change of phenotype. In contrast, constitutive expression of *PPM2* in transgenic *Arabidopsis thaliana* under control of the 35S-promoter leads to a phenocopy of the *curly leaf* phenotype. In transgenic plants with wildtype background as well as in homozygous *agamous* mutants of *A. thaliana* *PPM2* was able to substitute in especially the meristematic functions of *AGAMOUS*. Analysing these data leads to the conclusion that *PPM2* and *AGAMOUS* function at least in some aspects in very similar ways. Since this regulation of meristems can be found in seed plants and mosses, it might have already been present within the last common ancestor of extant mosses and seed plants, and thus it might reflect an ancient mechanism of MADS-box gene action.

7 Literaturverzeichnis

Alvarez, J. und Smyth, D. R. (1999): *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development* 126: 2377-2386.

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

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

Ambrose, B. A., Lerner, D. R., Ciceri, P., Padilla, C. M., Yanofsky, M. F., 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.

Arthur, W. (2002): The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature* 415: 757-764.

Ashton, N. W., Grimsley, N. H., Cove, D. J. (1979): Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427-435.

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

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

Becker, A., Kaufmann, K., Freialdenhoven, A., Vincent, C., Li, M.-A., Saedler, H., Theißen, G. (2002): A novel MADS-box gene subfamily with a sister-group relationship to class B floral homeotic genes. *Mol. Genet. Genomics* 266: 942-950.

Black, B. L. und Olson, E. N. (1998): Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 167-196.

- Bonhomme, F., Kurz, B., Melzer, S., Bernier, G., Jacquard, A. (2000): Cytokinin and gibberellin activate *SaMADS A*, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *Plant J.* 24(1): 103-111.
- Bopp, M. und Bhatla, S. C. (1990): Physiology of sexual reproduction in mosses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9: 317-327.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., Meyerowitz, E. M. (1991): Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20.
- Bowman, J. L. und Smyth, D. R. (1999): *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126: 2387-2396.
- Browning, A. J. und Gunning, B. E. S. (1979): Structure and function of transfer cells in the sporophyte haustorium of *Funaria hygrometrica*. *J. Exp. Bot.* 30: 1247-1264.
- Busch, M. A., Bomblies, K., Weigel, D. (1999): Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285: 585-587.
- Carroll, S. B., Grenier, J. K., Weatherbee, S. D. (2001): *From DNA to Diversity*, Blackwell Science, Massachusetts.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA-isolation by acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Coen, E. S. und Meyerowitz, E. M. (1991): The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Cormack, R. S. und Somssich, I. E. (1997): Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA. *Gene* 194: 273-276.
- Cove, D. J. (1992): Regulation of development in the moss *Physcomitrella patens*. In: Russo, V. E. A., Brody, S., Cove, D. J., Ottolenghi, S. (eds), *Development: 179-193*, The Molecular Genetic Approach. Springer, Berlin.

- Cove, D. J. und Knight, C. D. (1993): The moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell* 5: 1483-1488.
- Cove, D. J., Knight, C. D., Lamparter, T. (1997): Mosses as model systems. *Trends Plant Sci.* 2(3): 99-105.
- Cove, D. (2000): The moss, *Physcomitrella patens*. *J. Plant Growth Regul.* 19: 275-283.
- Davidson, E. H. (2001): Genomic regulatory systems. Academic Press, San Diego.
- Davies, B. und Schwarz-Sommer, Z. (1994): Control of floral organ identity by homeotic MADS-box transcription factors. In: Nover, L. (Ed.), *Results and Problems in Cell Differentiation Vol. 20: 235-258, Plant promoters and transcription factors.* Springer, Berlin.
- Di Rosa, A. (1998): Molekularbiologische Untersuchungen zum Ursprung homöotischer Gene in Pflanzen am Beispiel der MADS-Box-Genfamilie aus dem Farn *Ceratopteris richardii*. Promotionsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Doyle, J. J. (1994): Evolution of a plant homeotic multigene family: towards connecting molecular systematics and molecular developmental genetics. *Syst. Biol.* 43(3): 307-328.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thomson, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* 19(6): 1349.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., Sommer, H. (1999): Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 18: 5370-5379.
- Estruch, J. J., Granell, A., Hansen, G., Prinsen, E., Redig, P., Van Onckelen, H., Schwarz-Sommer, Z., Sommer, H., Spena, A. (1993): Floral development and expression of floral homeotic genes are influenced by cytokinins. *Plant J.* 4(2): 379-384.
- Fan, H. Y., Hu, Y., Tudor, M., MA, H. (1997): Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J.* 12: 999-1010.

- Felsenstein, J. (1993): PHYLIP Phylogeny Inference Package 3.5. Department of Genetics, The University of Washington.
- Fischer, A., Baum, N., Saedler, H., Theißen, G. (1995): Chromosomal mapping of the MADS-box multigene family in *Zea mays* reveals dispersed distribution of allelic genes as well as transposed copies. *Nucl. Acids Res.* 23(11): 1901-1911.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.
- Fu, H., Girod, P.-A., Doelling, J. H., Nocker, S. v., Hochstrasser, M., Finley, D., Vierstra, R. D. (1999): Structure and functional analyses of the 26S proteasome subunits from plants. *Mol. Biol. Rep.* 26: 137-146.
- Gassen, D. (1999): MADS-Box-Gene im Farn *Ceratopteris richardii*: Untersuchungen zum alternativen Spleißen von *CRM9* und zur Evolution von Exon-Intron-Strukturen in Gefäßpflanzen. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Genetics Computer Group (1999): Program Manual for the Wisconsin Package, Version 10.0, January 1999. 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711.
- Gilbert, S. F., Opitz, J. M., Raff, R. A. (1996): Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Dev. Biol.* 173: 357-372.
- Girke, T., Schmidt, H., Zähringer, U., Reski, R., Heinz, E. (1998): Identification of a novel 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 15(1): 39-48.
- Girod, P.-A., Fu, H. Y., Zryd, J. P., Vierstra, R. D. (1999): Multiubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 11: 1457-1471.
- Gocal, G. F. W., King, R. W., Blundell, C. A., Schwartz, O. M., Andersen, C. H., Weigel, D. (2001): Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 1788-1801.

- Gonneau, M., Pagant, S., Brun., F., Laloue, M. (2001): Photoaffinity labelling with the cytokinin agonist azido-CPPU of a 34 kDa peptide of the intracellular pathogenesis-related protein family in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Mol. Biol.* 46: 539-548.
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E. M., Coupland, G. (1997): A polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386: 44-51.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, M. F. (1994): Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* 76: 131-143.
- Hara, K., Morita, M., Takahashi, R., Sugita, M., Kato, S., Aoki, S. (2001): Characterization of two genes, *Sig1* and *Sig2*, encoding distinct plastid sigma factors in the moss *Physcomitrella patens*: phylogenetic relationships to plastid sigma factors in higher plants. *FEBS Letters* 499: 87-91.
- Hasebe, M. und Banks, J. A. (1997): Evolution of MADS gene family in plants. Pp. 179-197 in K. IWATSUKI and P. H. RAVEN, eds. *Evolution and diversification of land plants*. Springer-Verlag, Tokyo, Japan.
- Hasebe, M., Wen, C. K., Kato, M., Banks, J. A. (1998): Characterization of MADS homeotic genes in the fern *Ceratopteris richardii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6222-6227.
- Hasebe, M. (1999): Evolution of reproductive organs in land plants. *J. Plant Res.* 112: 463-474.
- Hauge, B. M., Hanley, S. M., Cartinhour, S., Cherry, J. M., Goodman, H. M., Koornneef, M., Stam, P., Chang, C., Kempin, S., Medrano, L., Meyerowitz, E. M. (1993): An integrated genetic/RFLP map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J.* 3: 745-754.
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Ignatieva, E. V., Ananko, E. A., Podkolodnaya, O. A., Kolpakov, F. A., Podkolodny, N. L., Kolchanov, N. A. (1998): Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucl. Acids Res.* 26: 364-370.
- Henschel, K. (1999): Isolierung und Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G.. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Bonn.

- Himi, S., Sano, R., Nishiyama, T., Tanahashi, T., Kato, M., Ueda, K., Hasebe, M. (2001): Evolution of MADS-box gene induction by *FLO/LFY* genes. *J. Mol. Evol.* 53: 387-393.
- Hofmann, A. H., Codón, A. C., Ivascu, C., Russo, V. E. A., Knight, C., Cove, D., Schaefer, D. G., Chakhparonian, M., Zryd, J.-P. (1999): A specific member of the *Cab* multigene family can be efficiently targeted and disrupted in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 92-99.
- Honma, T. und Goto, K. (2001): Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525-529.
- Huijser, P., Klein, J., Lönnig, W.-E., Meijer, H., Saedler, H., Sommer, H. (1992): Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 11: 1239-1249.
- Kempin, S. A., Savidge, B., Yanofsky, M. F. (1995): Molecular basis of the *cauliflower* phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267: 522-525.
- Kenrick, P., und Crane, P. R. (1997): The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33-39.
- Kim, G.-T., Tsukaya, H., Uchimiya, H. (1998): The *CURLY LEAF* gene controls both division and elongation of cells during the expansion of the leaf blade in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 206: 175-183.
- Kirchner, A. C. (2001): Untersuchungen zum Funktionswandel der *AGAMOUS*-ähnlichen MADS-Box-Gene aus Samenpflanzen im Verlauf der Evolution. Promotionsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Kofuji, R. und Yamaguchi, K. (1997): Isolation and phylogenetic analysis of MADS genes from the fern *Ceratopteris richardii*. *J. Phytogeogr. & Taxon.* 45: 83-91.
- Krizek, B. A. und Meyerowitz, E. M. (1996): Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the *Arabidopsis* MADS domain organ-identity proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4063-4070.

- Krogan, N. T. und Ashton, N. W. (2000): Ancestry of plant MADS-box genes revealed by bryophyte (*Physcomitrella patens*) homologues. *New Phytol.* 147: 505-517.
- Kyozuka, J., Harcourt, R., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (1997): Eucalyptus has functional equivalents of the *Arabidopsis API* gene. *Plant Mol. Biol.* 35: 573-584.
- Leech, M. J., Kammerer, W., Cove, D. J., Martin, C., Wang, T. L. (1993): Expression of *myb*-related genes in the moss, *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 3(1): 51-61.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M. F. (2000): *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Luehrsen, K. R., Taha, S., Walbot, V. (1994): Nuclear pre-mRNA processing in higher plants. *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 47: 149-193.
- Ma, H., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M. (1991): *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* 5(3): 484-495.
- Ma, H. (1994): The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes Dev.* 8: 745-756.
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H., Budiman, M. A., Szymkowiak, E. J., Irish, E. E., Wing, R. A. (2000): *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406: 910-913.
- Mizukami, Y. und Ma, H. (1992): Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* 71: 119-131.
- Mizukami, Y., Huang, H., Tudor, M., Hu, Y., Ma, H. (1996): Functional domains of the floral regulator *AGAMOUS*: Characterization of the DNA binding domain and analysis of dominant negative mutations. *Plant Cell* 8: 831-845.
- Mizukami, Y. und Ma, H. (1997): Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell* 9: 393-408.

- Münster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J. T., Martin, W., Saedler, H., Theißen, G. (1997): Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(6): 2415-2420.
- Nickrent, D. L., Parkinson, C. L., Palmer, J. D., Duff, R. J. (2000): Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1885-1895.
- Nishiyama, T. und Kato, M. (1999): Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1027-1036.
- Nultsch, W. (1991): *Allgemeine Botanik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Pnueli, L., Abu-Abeid, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z., Lifschitz, E. (1991): The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J.* 1: 255-266.
- Puchta, H. und Hohn, B. (1996): From centimorgans to base pairs – homologous recombination in plants. *Trends Plant Sci.* 1: 340-348.
- Puchta, H. (2002): Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Mol. Biol.* 48: 173-182.
- Purugganan, M. D., Rounsley, S. D., Schmidt, R. J., Yanofsky, M. F. (1995): Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* 140(1): 345-356.
- Qiu, Y.-L. und Palmer, J. D. (1999): Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes. *Trends Plant Sci.* 4: 26-30.
- Reski, R. und Abel, W. O. (1985): Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165: 354-358.
- Reski, R. (1998): Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot. Acta* 111: 1-15.

- Reski, R. (1999): Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* 208: 301-309.
- Reutter, K., Atzorn, R., Hadeler, B., Schmülling, T. Reski, R. (1998): Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in *budding* and in *plastid division*. *Planta* 206: 196-203.
- Riechmann, J. L. und Meyerowitz, E. M. (1997): MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378: 1079-1101.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., et al. (14 co-authors) (2000): *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schaefer, D. G. und Zryd, J.-P. (1997): Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 11(6): 1195-1206.
- Schaefer, D. G. (1998): Principles and protocols to work with the moss *Physcomitrella patens*. <http://www.unil.ch/lpc/docs/Ppprotocols2001.pdf>.
- Schaefer, D. G. (2001): Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 143-150.
- Schaefer, D. G. und Zryd, J.-P. (2001): The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol.* 127: 1430-1438.
- Schmidt, R. J., Veit, B., Mandel, M. A., Mena, M., Hake, S., Yanofsky, M. F. (1993): Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the maize homolog of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Plant Cell* 5(7): 729-737.
- Schulz, P., Reski, R., Maldiney, R., Laloue, M., Schwartzenberg, K. v. (2000): Kinetics of cytokinin production and bud formation in *Physcomitrella*: Analysis of wild type, a developmental mutant and two of its *ipt* transgenics. *J. Plant Physiol.* 156: 768-774.
- Schumaker, K. S. und Dietrich, M. A. (1997): Programmed changes in form during moss development. *Plant Cell* 9: 1099-1107.

- Schumaker, K. S. und Dietrich, M. A. (1998): Hormone-induced signaling during moss development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 501-523.
- Schwarz, V. (2000): Konstruktion von Expressionsvektoren für erste Funktionsuntersuchungen von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens*. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Bonn.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., Sommer, H. (1990): Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250(4983): 931-936.
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P. J., Hansen, R., Tetens, F., Lönnig, W.-E., Saedler, H., Sommer, H. (1992): Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*; evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* 11: 251-263.
- Shindo, S., Ito, M., Ueda, K., Kato, M., Hasebe, M. (1999): Characterization of MADS genes in the gymnosperm *Gnetum parifolium* and its implication on the evolution of reproductive organs in seed plants. *Evol. Dev.* 1: 180-190.
- Shore, P. und Sharrocks, A. D. (1995): The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229: 1-13.
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., Huse, W. D. (1988): lambda ZAP: A bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* 16: 7583.
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A. (1995): An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 23(6): 1087-1088.
- Sieburth, L. E., Running, M. P., Meyerowitz, E. M. (1995): Genetic separation of third and fourth whorl functions of *AGAMOUS*. *Plant Cell* 7: 1249-1258.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Albert, V. A., Oppenheimer, D. G., dePamphilis, C. W., Ma, H., Frohlich, M. W., Theißen, G. (2002): Missing links: the genetic architecture of flower and floral diversification. *Trends Plant Sci.* 7(1): 22-31.

- Strepp, R., Scholz, S., Kruse, S., Speth, V., Reski, R. (1998): Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4368-4373.
- Summerton, J., Attkins, T., Bestwick, R. (1983): Rapid methods of preparation of bacterial plasmids. *Annal. Biochem.* 103: 79.
- Svensson, M. E., Johannesson, H., Engström, P. (2000): The *LAMBI* gene from the clubmoss, *Lycopodium annotinum*, is a divergent MADS-box gene, expressed specifically in sporogenic structures. *Gene* 253: 31-43.
- Svensson, M. E. (2000): Evolution of a family of plant genes with regulatory functions in development; studies on *Picea abies* and *Lycopodium annotinum*. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiological Botany presented at Uppsala University.
- Tandre, K., Albert, V. A., Sundas, A., Engström, P. (1995): Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Mol. Biol.* 27(1): 69-78.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Theißen, G. und Saedler, H. (1995): MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5(5): 628-639.
- Theißen, G., Strater, T., Fischer, A., Saedler, H. (1995): Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of *AGAMOUS*-like MADS-box genes from maize. *Gene* 156(2): 155-166.
- Theißen, G., Kim, J. T., Saedler, H. (1996): Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43(5): 484-516.
- Theißen, G. und Saedler, H. (1999): The golden decade of molecular floral development (1990-1999): a cheerful obituary. *Dev. Genet.* 25: 181-193.
- Theißen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Winter, K.-U., Saedler, H. (2000): A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 115-149.

- Theißen, G. (2001a): Genetics of flower development. In: Brenner, S. und Miller, J. H. (Ed.), Encyclopedia of Genetics. Acad. Press: 713-717.
- Theißen, G. (2001b): Development of floral organ identity: stories from the MADS house. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 75-85.
- Theißen G. und Saedler, H. (2001): Floral quartets. Nature 409: 469-471.
- Töpfer, R., Maas, C., Hörnicke-Grandpierre, C., Schell, J., Steinbiss, H.-H. (1993): Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Methods Enzymol. 217: 66-78.
- Tzeng, T.-Y. und Yang, C.-H. (2001): A MADS box gene from Lily (*Lilium longiflorum*) is sufficient to generate dominant negative mutation by interacting with PISTILLATA (PI) in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 42(10): 1156-1168.
- Van Larabeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R. A., Schell, J. (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature 252: 169-170.
- Van Tunen, A. J., Eikelboom, W., Angenent, G. C. (1993): Floral organogenesis in *Tulipa*. Flowering Newsl 16: 33-37.
- Vergara-Silva, F., Martinez-Castilla, L., Alvarez-Buylla, E. R. (2000): MADS-box genes: development and evolution of plant body plans. J. Phycol. 36: 803-812.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., Giovannoni, J. (2002): A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *Ripening-Inhibitor (Rin)* locus. Science 296: 343-346.
- Wang, T. L., Leech, M. J., Martin, C. R., Knight, C. D., Kammerer, W., Cove, D. J. (1992): Molecular genetic approaches to studying cytokinin action in moss. Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants: 149-155.
- Wang, T. L. (1994): Cytokinin Mutants. Cytokinins: Chemistry, Activity and Function: 255-268.

- Weigel, D. und Meyerowitz, E. M. (1994): The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78: 203-209.
- Wellesen, K. (2000): Molekulargenetische Untersuchungen zum Mechanismus von Organfusionen bei Mutanten von *Arabidopsis thaliana*. Promotionsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Western, T. L. und Haughn, G. W. (1999): *BELLI* and *AGAMOUS* genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18(3): 329-336.
- Wettstein, F. von (1932): Genetik. In: F. Verdoorn, ed., *Manual of Bryology*: 233-272. Martinus Nijhoff, The Hague.
- Wiencke, C. und Schulz, D. (1975): Sporophytenentwicklung von *Funaria hygrometrica* Sibth. I. Strukturelle Grundlagen der Wasser- und Nährstoffaufnahme im Haustorium. *Protoplasma* 86: 107-117.
- Winter, K.-U., Becker, A., Münster, T., Kim, J. T., Saedler, H., Theißen, G. (1999): MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(13): 7342-7347.
- Winter, K.-U. (2001): Charakterisierung von Orthologen floraler homöotischer B-Funktionsgene der Gymnospermen *Gnetum gnemon* L.. Promotionsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Xue, J. und Rask, L. (1995): The unusual 5' splicing border GC is used in myrosinase genes of Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* 29: 167-171.
- Yanish-Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains – nucleotide sequence of M13, MP18 and PUC19 vectors. *Gene* 33: 103.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., Meyerowitz, E. M. (1990): The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346(6279): 35-39.
- Zhang, H. und Forde, B. G. (1998): An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

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

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. majus</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
Abb.	Abbildung
al.	alii
AS	Aminosäure(n)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar(e)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA (= komplementäre DNA)
cDNAs	Plural von cDNA
Ci	Curie
DIECA	Natriumdiethyldithiocarbaminat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GUS	-Glucuronidase
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaare
<i>L. annotinum</i>	<i>Lycopodium annotinum</i>
μ	mikro
m	milli
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA (= Boten-RNA)
p	Plasmid
P	Primer
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
PCR	polymerase chain reaction(s) (= Polymerase-Ketten-Reaktion(en))
PEG	Polyethylenglycol
RACE	rapid amplification of cDNA ends (= schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden)
RAGE	rapid amplification of genomic ends (= schnelle Vervielfältigung von genomischen Enden)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcriptase RCR (= Umkehr-PCR)
sek	Sekunde(n)
UTR	untranslated region (= untranslatierter Bereich)
x	...fach

8.2 Nomenklatur von Genen und Genprodukten

Wildtyp-Gen:	Großbuchstaben, kursiv	Beispiel: <i>PPM2</i>
Protein:	Großbuchstaben	Beispiel: PPM2
Mutante:	Kleinbuchstaben, kursiv	Beispiel: <i>agamous</i>

8.3 Alignment zur Phylogeniekonstruktion in Abb. 6

Symbol comparison table: GenRunData:blosum62.cmp CompCheck: 1102

GapWeight: 8; GapLengthWeight: 2

Name: PpMADS2	Len: 131	Check: 5428	Weight: 1.00
Name: PpMADS3	Len: 131	Check: 4592	Weight: 1.00
Name: PPM4	Len: 131	Check: 5810	Weight: 1.00
Name: PPM3	Len: 131	Check: 6589	Weight: 1.00
Name: def	Len: 131	Check: 2468	Weight: 1.00
Name: pmads1	Len: 131	Check: 1107	Weight: 1.00
Name: ap3	Len: 131	Check: 503	Weight: 1.00
Name: crm3	Len: 131	Check: 1179	Weight: 1.00
Name: crm9	Len: 131	Check: 106	Weight: 1.00
Name: jointless	Len: 131	Check: 9673	Weight: 1.00
Name: stmads16	Len: 131	Check: 5927	Weight: 1.00
Name: stmads11	Len: 131	Check: 7584	Weight: 1.00
Name: glo	Len: 131	Check: 1779	Weight: 1.00
Name: pmads2	Len: 131	Check: 3332	Weight: 1.00
Name: pi	Len: 131	Check: 9777	Weight: 1.00
Name: ggm2	Len: 131	Check: 2763	Weight: 1.00
Name: prglo	Len: 131	Check: 9287	Weight: 1.00
Name: cermads5	Len: 131	Check: 6864	Weight: 1.00
Name: crm1	Len: 131	Check: 7037	Weight: 1.00
Name: crm4	Len: 131	Check: 7234	Weight: 1.00
Name: tm3	Len: 131	Check: 25	Weight: 1.00
Name: tobmads1	Len: 131	Check: 799	Weight: 1.00
Name: defh24	Len: 131	Check: 846	Weight: 1.00
Name: dal3	Len: 131	Check: 49	Weight: 1.00
Name: PPM2	Len: 131	Check: 9230	Weight: 1.00
Name: PPM1	Len: 131	Check: 9627	Weight: 1.00
Name: PpMADS1	Len: 131	Check: 7961	Weight: 1.00
Name: ggm13	Len: 131	Check: 1794	Weight: 1.00
Name: zmm17	Len: 131	Check: 3064	Weight: 1.00
Name: ap3_2	Len: 131	Check: 5081	Weight: 1.00
Name: ag	Len: 131	Check: 3706	Weight: 1.00
Name: ple	Len: 131	Check: 2101	Weight: 1.00
Name: zmm1	Len: 131	Check: 2932	Weight: 1.00
Name: ggm3	Len: 131	Check: 1352	Weight: 1.00
Name: samadsb	Len: 131	Check: 8703	Weight: 1.00
Name: squa	Len: 131	Check: 9811	Weight: 1.00
Name: zap1	Len: 131	Check: 1313	Weight: 1.00
Name: prmads2	Len: 131	Check: 1577	Weight: 1.00
Name: zag3	Len: 131	Check: 9879	Weight: 1.00
Name: agl13	Len: 131	Check: 467	Weight: 1.00
Name: agl6	Len: 131	Check: 9487	Weight: 1.00
Name: agl2	Len: 131	Check: 699	Weight: 1.00
Name: om1	Len: 131	Check: 1644	Weight: 1.00
Name: zmm8	Len: 131	Check: 8617	Weight: 1.00
Name: crm6	Len: 131	Check: 8737	Weight: 1.00
Name: agl17	Len: 131	Check: 556	Weight: 1.00
Name: defh125	Len: 131	Check: 975	Weight: 1.00
Name: agl15	Len: 131	Check: 2205	Weight: 1.00
Name: agl12	Len: 131	Check: 8415	Weight: 1.00
Name: cermads3	Len: 131	Check: 7767	Weight: 1.00
Name: LAMB1	Len: 131	Check: 2116	Weight: 1.00

//

	1				50
PpMADS2	MGRVKLEIKK	IENPTNRQVT	YSKRRNGLIK	KAYELSVLCD	IDLALIMFSP
PpMADS3	MGRVKLEIKK	IENPTNRQVT	FSKRRNGLIK	KAYELSVLCD	IDLALIMFSP
PPM4	MGRVKLEIKK	IENPTNRQVT	YSKRRNGLVK	KAYELSVLCD	IDLALIMFSP
PPM3	MGRVKLEIKK	IENSANRQVT	YSKRRNGLTK	KAYELSVLCD	IDLALIMFSP
def	MARGKIQIKR	IENQTNRQVT	YSKRRNGLFK	KAHELTVLCD	AKVSIIMISS
pmads1	MARGKIQIKR	IENQTNRQVT	YSKRRNGLFK	KANELTVLCD	AKVSIIMISS
ap3	MARGKIQIKR	IENQTNRQVT	YSKRRNGLFK	KAHELTVLCD	ARVSIIMFSS
crm3	MGRGKIEMKR	IENRTTRQVT	FCKRRAGLVK	KARELSVLCD	ADVALIVFSS
crm9	MGRCKIEMKR	IENKTTRQVT	FCKRRAGLVK	KARELSLLCD	ADVALIVFSP
jointless	MAREKIQIKK	IDNSTARQVT	FSKRRRGLFK	KAEELSVLCD	ADVALIIFSS
stmads16	MAREKIQIKK	IDNITARQVT	FSKRRRGLFK	KAEELSVLCD	ADVALIIFSS
stmads11	MVRQKIQIKK	IDNLTARQVT	FSKRRRGLFK	KAQELSTLCD	ADIGLIVFSA
glo	MGRGKIEIKR	IENSSNRQVT	YSKRRNGIMK	KAKEISVLCD	AHVSVIIFAS
pmads2	MGRGKIEIKR	IENSSNRQVT	YSKRRNGI IK	KAKEITVLCD	AKVSLIIFGN
pi	MGRGKIEIKR	IENANNRVVT	FSKRRNGLVK	KAKEITVLCD	AKVALIIFAS
ggm2	MGRGKIEMKK	IENTNNRQVT	FSKRRNGLMK	KAQELAVLCD	AEVGLIIFSS
prglo	MGRGKIEIKM	IENATNRQVT	FSKRRGGLK	KAQELSVLCN	AEVALIIFSS
cermads5	MVRRKIKIKR	IENATTRQVT	FSKRRGGLK	KAHDLVLCD	ADVGVIIFSS
crm1	MVRRKIKIKR	IENATTRQVT	FSKRRGGLK	KAHDLVLCD	AEVAVIIFSS
crm4	MVRTKIKIKR	IENATTRQVT	FSKRRGGLFK	KAHDLVLCD	AEVAVIIFSS
tm3	MVRGKTQMRR	IENATSRQVT	FSKRRNGLLK	KAFELSVLCD	AEVGLIIFSP
tobmads1	MVRGKTQMRR	IENATSRQVT	FSKRRNGLLK	KAFELSVLCD	AEVGLVIFSP
defh24	MVRGKTQMRR	IENATSRQVT	FSKRRNGLLK	KAFELSVLCD	AEVSLIIFSP
dal3	MVRGKTQMKR	IENDTSRQVT	FSKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIVFSP
PPM2	MGRGKIEIKK	IENTTSRQVT	FCKRRGGLK	KAHELAVLCD	AEVALIVFSS
PPM1	MGRGKIEIKK	IENTTSRQVT	FCKRRGGLK	KAHELAVLCD	AEVALIVFSS
PpMADS1	MGRGKIEIKK	IENTTSRQVT	FSKRRGGLK	KAHELAVLCD	AEVALIVFSS
ggm13	MGRGKIEIKR	IENTTNRQVT	FSKRRGGLK	KAHELAVLCD	AEGLIIFSS
zmm17	MGRGKIEIKR	IENSTNRQVT	FSKRRGGLK	KANELAVLCD	ARVGVVIFSS
ap3_2	~~~~~	~~~~~	~~~~~GGLK	KARELAILCD	AQLGVIIFSS
ag	SGRGKIEIKR	IENTTNRQVT	FCKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIVFSS
ple	NGRGKIEIKR	IENITNRQVT	FCKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALVVFSS
zmm1	MGRGRIEIKR	IENNTSRQVT	FCKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALVVFSS
ggm3	MGRGKIEIKR	IENTTNRQVT	FCKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIVFSS
samadsb	MGRGRVQLKR	IENKINRQVT	FSKRRSGLK	KAHEISVLCD	AEVALIVFSS
squa	MGRGKVQLKR	IENKINRQVT	FSKRRGGLK	KAHELVLCD	AEVALIVFSN
zap1	MGRGKVQLKR	IENKINRQVT	FSKRRNGLLK	KAHEISVLCD	AEVAVIVFSP
prmads2	MGRGRVELKR	IENKINRQVT	FSKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIIFSS
zag3	MGRGRVELKR	IENKINRQVT	FSKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIIFSS
ag113	MGRGKVEVKR	IENKITRQVT	FSKRKSGLK	KAYELSVLCD	AEVSLIIFST
ag16	MGRGRVEMKR	IENKINRQVT	FSKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIIFSS
ag12	MGRGRVELKR	IENKINRQVT	FAKRRNGLLK	KAYELSVLCD	AEVALIIFSN
om1	MGRGRVELKM	IENKINRQVT	FAKRRKRLK	KAYELSVLCD	AEVALIIFSN
zmm8	MGRGKVELKR	IENKISRQVT	FAKRRNGLLK	KAYELSLCD	AEVALIIFSG
crm6	TSRGKIQIRR	IENTTSRQVT	FSKRRNGLLK	KAHELVLCD	AEIALIIFSS
ag117	~~~~~IQK	IDDSTSRQVT	FSKRRKGLIK	KAKELAILCD	AEVCLIIFSN
defh125	MGRGKIVIQR	IDKSTSRQVT	FSKRRSGLK	KAKELAILCD	AEVGVVIFSS
ag115	~~~~~EIKR	IENANSRQVT	FSKRRSGLK	KARELSVLCD	AEVAVIVFSK
ag112	MARGKIQIKR	IENPVHRQVT	FCKRRTGLK	KAKELSVLCD	AEIGVVIFSP
cermads3	YRSPRIAIRR	VDNATNRQVT	FSKRRNGLLK	KASELSILCD	AEIAAIVFSS
LAMB1	MGRRKIEMQK	IKNNNARNVT	FCKRKTGLMK	KAFELSVLCG	VDVGLLMFAP

	51				100
PpMADS2	SGKLTQYCNC	ELKKAQQEKE	LVQQRARLYL	ADEQLLQGV	SVQQLANMET
PpMADS3	SGKLTQYCNC	ELKKAQQEKE	LVQQRARLYL	ADEQLLQGV	SVQQLANMET
PPM4	SGKLTQYSNC	ELKKSQQEKE	LVQQRARLYL	ADQQLQSVT	SVQQLANMET
PPM3	SGKLTQYSNC	ELKKTQHEKE	LIQQRIRLYL	ADEQLLQSVT	SVQQLANMET
def	TQKLHEYISP	HLKLNNEVNR	NLRREIRQRM	GE..SLNDL.	GYEQIVNLE
pmads1	TGKLHEFISP	QLRKLKEVNR	NLRKEIRQRM	GE..SLNDL.	NYEQLEELME
ap3	SNKLHEYISP	TKRKLEETNR	NLRTQIKQRL	GE..CLDEL.	DIQELRRLED
crm3	SGRLFYAGS	ELTELKREVE	SLRQEKRRKD	GDIHDLKLL.	SADELDLSE
crm9	SGRLFYAGS	ELSKLKEEAN	ILKNDKRIRR	GDVHALEAL.	SEEELGSLET
jointless	TGKLFDYSSS	NYSRLSKEIS	EKSHRLRQMR	GE..ELQGL.	NIEELQQLER
stmads16	TGKLFDFAST	LNMRLSKQVA	DKTRELRQMR	GE..ELEGL.	SLDELLQIEK
stmads11	TGKLFDFAST	THAMLSRDFV	EKNRELRQLH	GE..ELQGL.	GLDDLKMLEK
glo	SGKMHEFCSP	EINRVKEND	SMQIELRHLK	GE..DITTL.	NYKELMVLED
pmads2	SGKMHEYCSP	EIDRIKKEND	NMQVKLRHLK	GE..DINSL.	NHKELMVLEE
pi	NGKMIDYCCP	EIDRIKKEND	SLQLELRHLK	GE..DIQSL.	NLKNLMAVEH
ggm2	TGKLFDYCNT	ELIKERRENE	KLRSKLRYMM	GE..DIGEL.	KIAQLEKLEH
prglo	TGKLHEWSSS	EMRRITKENE	SLQERLRHMN	GE..EVNSL.	KLPELFFLEE
cermads5	KGKLFQFANP	EIDRITLTFE	KLKALQRNVI	GD..DLERL.	SLRDLIHLEQ
crm1	KGKLFQFANP	EADRLTVFTE	KLKMLQSNVI	GD..DLERL.	SLRDLIHLEQ
crm4	KGKLFHFGNP	EADHLTVFTE	KLKLLQSVVI	GD..DLERL.	SVRDIIYLEQ
tm3	RGKLYEFASS	EAANLMKKIE	LLETAKRKFL	GE..GLQSC.	TLQEVQQIEK
tobmads1	RGKLYEFASS	AAASLMKKIE	LLEESKRKLL	GE..GLQSC.	SLVELQQIEK
defh24	RGKLYEFASS	ETVSMKKIE	QLETSKRKLL	GE..GLGTC.	NMEELQQLEQ
dal3	RGKLYEFANP	SMQKMEERIK	ILESQRKQMV	GE..ELASC.	ALSDLNLES
PPM2	TGKLFDYASS	EVVKLREQLE	QLKASHRHML	GE..DLSLL.	KVPDLLQLEQ
PPM1	TGKLFDYASS	EVVKLQEQVE	RLKSSQRRML	GE..DLSAL.	KVPDLLQLEQ
PpMADS1	TGKHFEFASS	EVIKLKQQVE	RLESSQRHML	GE..DLSAL.	KVSDLLELEQ
ggm13	KGKLFYESSA	EMTRMKNE	KLQTNIRMM	GE..DLTSL.	TMTELHHLGQ
zmm17	TGKMFYFCSP	EMTRMKNEM	KLETGIRRYT	GD..DLSSL.	TLDDVSDLEQ
ap3_2	SGKMFYFSSP	EITRMKNEID	KLQATMRHFA	GE..DLTSL.	TMNEMLQLEQ
ag	RGRLYEYSNN	ESAKLRQQII	SIQNSNRQLM	GE..TIGSM.	SPKELRNLEG
ple	RGRLYEYANN	EANKLRRQIR	EIQTSNRQML	GE..GVSNM.	ALKDLKSTEA
zmm1	RGRLYEYANN	ESVKLRNQIQ	MLQNTNRHLV	GD..SVGNL.	SLKELKQLES
ggm3	RGRLYEFANN	EAVKLKQQID	VLNNQIRHYM	GE..CLQSM.	TIKELKQLEG
samadsb	KGKLFYESTD	EHAKLKARVE	VLEKNKRNF	GE..DLDSL.	SLKELQSLEH
squa	KGKLFYESTD	EYSKLRKARIE	LLQRNHRHYM	GE..DLDSL.	SLKELQSLEH
zap1	KGKLYEYATD	EYRKLKAKIE	TIQKCHKHLM	GE..DLESL.	NPKELQQLEQ
prmads2	RGKLYEFGSA	EVGKLKARVE	LLQRSQRHLL	GE..DLGPL.	SIKELQQLE
zag3	RGKLYEFGSA	EMSKLRKARFE	ALQRTQRHLL	GE..ELGPL.	SVKELQQLEK
ag113	GGKLYEFSNV	EVTKLKCKYE	SLLRTHRNLV	GE..DLEGM.	SIKELQTLER
ag16	RGKLYEFGSV	EVTKLKSKYE	SLVRTNRNLL	GE..DLGEM.	GVKELQALER
ag12	RGKLYEFCSS	EYLKLGGRYE	NLQRQRNLL	GE..DLGPL.	NSKELEQLER
om1	RGKLYEFCSS	EYLKLNKRV	ALQRSQRNLL	GE..DLGPL.	GSKELEQLER
zmm8	RGRLFYFSSS	DYLKLRTRVD	FLQTTQRNLL	GE..DLGPL.	SMKELEQLEN
crm6	TGKLFDYSSS	EAERLKERLT	YMEEIQRNML	GE..SLGSL.	QIKDLQNLEA
ag117	TDKLYDFASS	EAETLRQELH	SLQENYRQLT	GV..ELNGL.	SVKELQNLES
defh125	TGKLYEFSST	EAATLRQQLQ	DLQENHRKLM	GE..ELQGL.	NVEDLHRLEN
ag115	SGKLFYSSST	EVDILKDQLS	KLQEKHLQLQ	GK..GLNPL.	TFKELQSLEQ
ag112	QGKLFELATK	EINVLKQEI	MLQKGISYMF	GG..GDGAM.	NLEELLLLEK
cermads3	TGRLSEFASS	QALHLRRQVG	CMNDIQSCIM	GE..NAAAL.	SLDELQNTA
LAMB1	TGKLSLYASK	NLKMIQMKKA	YTEFQIQLYQ	GI..GIEKL.	SLEGLQNFES

	101	129
PpMADS2	ELEQALERVR	ARKNYVSSAY QTANALQRQ
PpMADS3	ELEQALERVR	ARKNYVSSAY Q..NVIQRQ
PPM4	ELEQAIERVR	ARKAYVSSAY EAASVMQRQ
PPM3	ELEQALERVR	TRKAYVTSAY QAVSVMQRQ
def	DMDNSLKLIR	ERKYKV..IS NQIDTSKKK
pmads1	NVDNSLKLIR	ERKYKV..IG NQIETFKKK
ap3	EMENTFKLVR	ERKFKS..LG NQIETTCKK
crm3	EVETSLCSIR	KRQKQL..YR EKMNETFRR
crm9	EVEAKLVKIR	SLQKQI..RE LQFREQLKK
jointless	SLETGLSRVI	ERKGDK..IM REINQLQOK
stmads16	RLEAGFNRVL	EIKGTR..IM DEITNLQRK
stmads11	LVEGGISRVL	RIKGDK..FM KEISSLKCK
glo	ALENGTSALK	NKQMEF..VR M...MRKH
pmads2	GLTNGLSSIS	AKQSEI..LR M...VRKN
pi	AIEHGLDKVR	DHQMEI..LI S...KRRN
ggm2	DLESALRLVR	RKKDHA..WD YQ.....R
prglo	QLDKAATQVR	RRKDHV..LE NERIKQRNK
cermads5	QIHESLGRIR	AKKEEM..IL DQLEDFCKK
crm1	QVHESLGHIR	AKKDEL..IL EQIDEFKQK
crm4	QFHENLGRIR	AKKDEL..ML ERNNDLMQK
tm3	QLERSVGTIR	ARKLQV..FK EQVERLKCK
tobmads1	QLERSVSTIR	ARKIQV..FK EQIERLKEK
defh24	QLERSVNTIR	ARKMQL..YM QQIEQLKEK
dal3	QVERGLRHIR	ARKTQI..LV AEIEELKRR
PPM2	QLDLGASVR	ARKNQL..IL EEVESLRRK
PPM1	QLDLGASVR	ARKNQL..IL EEIEGLQCK
PpMADS1	QLDQGASVR	ARKNQL..IL EEIEDLRRK
ggm13	QLESASSRVR	SRKNQL..ML QQLENLRRK
zmm17	QLEYSVSKVR	ARKHQL..LN QQLDNLRRK
ap3_2	QLEISVNKVR	SRKEQL..LQ QQLDNLRRK
ag	RLERSITRIR	SKKNEL..LF SEIDYMQKR
p1e	KVEKAISRIR	SKKNEL..LF AEIEHMQKR
zmm1	RLEKGISKIR	ARKSEL..LA AEINYMAKR
ggm3	KLEKGLGRVR	SKRNEK..LL EDIDTLQRR
samadsb	QLHAAIKSIR	SRKNQA..MF ESISALQCK
squa	QLDTALKNIR	TRKNQL..LY DSISELQHK
zap1	QLDSSLKHIR	SRKSHL..MA ESISELQCK
prmads2	QLEVALTHVR	SRKTQV..ML EMMDELRRK
zag3	QLECALSQAR	QRKTQL..MM EQVEELRRK
agl13	QLEGALSATR	KQKTQV..MM EQMEELRRK
agl6	QLEAALTATR	QRKTQV..MM EEMEDLRRK
agl2	QLDGSLKQVR	SIKTQY..ML DQLSDLQNK
om1	QLDSSLRQIR	STRTQF..ML DQLADLQRR
zmm8	QIEVSLKHIR	SRKNQM..LL DQLFDLKSK
crm6	KLDGSLYKIR	GAKTQL..MV RQVQELQCK
agl17	QLEMSLRGIR	MKREQI..LT NEIKELTRK
defh125	QLEMSLRGVR	MKKVQM..LT DEVHELRRK
agl15	QLYHALITVR	ERKERL..LT NQLEESRLK
agl12	HLEYWISQIR	SAKMDV..ML QEIQSLRCK
cermads3	RLQIALDKIR	TRRNEL..LA MQTQNIISK
LAMB1	KLQLSIINTR	AFKEQA..IL EMCCKNHEA

8.4 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer und Adapter

Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von cDNA-Pools:

„RACE Primer“ P₀₁₉: 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA (T)₁₇-3'

„RACE Primer“ P_{anchor-oligo-dT}: 5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT (T)₁₄V-3'

Oligonukleotid-Primer für 3'RACE-PCR:

„RACE-Adapter Primer“ P₀₁₈: 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CG-3'

„RACE-Adapter Primer“ P_{anchor}: 5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C-3'

Adapter zur Herstellung der Adapter-Ligationsansätze für Genomische Linker PCR:

Langer Adapter:

5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT-3'

Kurzer Adapter:

5'-PO₄-ACC AGC CC-NH₂-3'

Oligonukleotid-Primer für Genomische Linker PCR:

„RAGE-Adapter Primer1“ P_{AP1}: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

„RAGE-Adapter Primer2“ P_{AP2}: 5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3'

„MADS-Box-spezifischer Primer“ P_{KH05}: 5'-AGG CAR GTG ACS TWC TSC AAR MG-3'

Oligonukleotid-Primer zum Nachweis der *P. patens* Aktin-cDNA:

P_{V45}: 5'-TGG CAC CTC CGG AGA GGA AG-3'

P_{V46}: 5'-TAG AAA CAC TTT CTG TGC ACA ATC-3'

Oligonukleotid-Primer zum Nachweis der *ag-1*-Mutante (C. Kirchner, persönliche Mitteilung):

P_{AGIn4fw}: 5'-GCG TCA ACA AAT TAT CAG CAT AC-3'

P_{AGIn5bw}: 5'-TCG ATT TCA GAA AAT AAG AGC TC-3'

Oligonukleotid-Primer zum Nachweis der *A. thaliana* actin-1-cDNA:

P_{AT258fw}: 5'-TGC GAC AAT GGA ACT GGA ATG-3'

P_{AT258bw}: 5'-GGA TAG CAT GTG GAA GTG CAT ACC-3'

8.5 Eidesstattliche Erklärung

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

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Heinz Saedler betreut worden.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Theißen, G., Münster, T., Henschel, K. (2001): Why don't mosses flower? *New Phytol.* 150: 1-8.

Henschel, K., Kofuji, R., Hasebe, M., Saedler, H., Münster, T., Theißen, G. (im Druck): Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Biol. Evol.*

8.6 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Heinz Saedler danke ich vielmals für die Betreuung dieser Arbeit, seine wertvollen Anregungen und stets hilfreichen Diskussionen, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der sehr guten Arbeitsbedingungen.

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

Herrn Prof. Dr. Günter Theißen danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und für seine Anregungen, die diese Arbeit beeinflußt und begleitet haben.

Herrn Dr. Thomas Münster möchte ich ganz besonders danken für seine Tag und Nacht währende Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie für alles andere, was in dieser Zeit war.

Herrn Wolfram Faigl möchte ich für die stets freundliche Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen danken.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus der Abteilung Saedler bedanken, die mich unterstützt und zu einer guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ganz besonders herzlich danke ich meinen lieben Eltern.

8.7 Lebenslauf

Name: Katrin Andrea Henschel

Adresse: Karl-Bosch Str. 2, 50827 Köln

Geburtstag: 01.07.1973

Geburtsort: Reutlingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

1979 – 1980 Besuch der Grundschule in Hausen, Krs. Gießen

1980 – 1983 Besuch der Grundschule in Stotzheim, Krs. Euskirchen

1983 – 1992 Besuch des St. Michael Gymnasiums in Bad Münstereifel

1992 – 1994 Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie Köln

1994 – 1998 Biologie-Studium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

1998 – 1999 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik (Prof. Dr. H. Saedler).
Thema: Isolierung und Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G.

Seit 1999 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik (Prof. Dr. H. Saedler).
Thema: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von MADS-Box-Genen aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G.