

**Ein Kandidaten-Gen für**  
***Tunicate1***  
**und seine nahen Verwandten**

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

**vorgelegt von**  
**Luzie Ursula Wingen**  
**aus Vechta**

**Köln 2000**

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Heinz Saedler  
Prof. Dr. Jonathan Howard  
Tag der letzten mündlichen Prüfung: 17.01.2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Morphologie und Morphogenese einer Maispflanze . . . . .	1
1.1.1	Der modulare Aufbau von Mais . . . . .	1
1.1.2	Phytomer- und Blattentwicklung . . . . .	2
1.1.3	Entwicklungskontrollgene in der Blattentwicklung . . . . .	3
1.1.4	Aufbau von Grasinfloreszenzen und -blüten . . . . .	4
1.2	<i>Tunicate1</i> – eine berühmte Mais-Entwicklungsmutante . . . . .	5
1.3	Die Familie der MADS-Box-Gene – eine wichtige Familie für die Steuerung von Entwicklungsprozessen in Pflanzen . . . . .	9
1.3.1	Blütenentwicklung in Dikotylen . . . . .	9
1.3.2	Blütenentwicklung in Monokotylen . . . . .	10
1.3.3	Spielen MADS-Box-Gene eine Rolle in der vegetativen Pflanzenentwicklung? . . . . .	11
1.3.4	Eine Mutation in einem MADS-Box-Gen könnte ursächlich für den <i>Tunicate</i> -Phänotyp sein . . . . .	11
1.4	Ziel der Arbeit . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme . . . . .	14
2.2	Medien, Puffer, Lösungen . . . . .	14
2.3	Plasmide und Bakterienstämme . . . . .	14
2.4	Mais-cDNA-Klone . . . . .	15
2.5	Pflanzenmaterial . . . . .	15
2.6	Rasterelektronenmikroskopische Studien . . . . .	16
2.7	Isolierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten . . . . .	17
2.8	Isolierung von genomischer DNA aus Mais . . . . .	17

2.9	Isolierung von Gesamt-RNA . . . . .	17
2.10	Herstellung von cDNA . . . . .	18
2.11	RNA-Gel-Blot-Analyse . . . . .	18
2.12	<i>In situ</i> -Hybridisierung . . . . .	19
2.13	Nachweis der Expression von Allelen durch einen <i>Single-Nucleotide-Polymorphism</i> . . . . .	20
2.14	Sequenzierung . . . . .	20
2.15	Computeranalyse . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Das MADS-Box-Gen <i>ZMM19</i> kartiert in der Nähe von <i>TUNICATE1</i> . . . . .	22
3.2	RNA-Gel-Blot-Untersuchungen in Wildtyp-Pflanzen . . . . .	25
3.3	RNA-Gel-Blot-Untersuchung mit <i>Tu1</i> -Pflanzen . . . . .	27
3.3.1	Ektopische <i>ZMM19</i> -Expression in <i>Tu1-A158</i> -Pflanzen . . . . .	27
3.3.2	Verringerte ektopische <i>ZMM19</i> -Expression in schwächeren <i>Tu1</i> -Mutanten . . . . .	29
3.4	Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung von weiblichen <i>Tu1</i> -Infloreszenzen . . . . .	31
3.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Wildtyp- und <i>Tu1</i> -Pflanzen . . . . .	34
3.6	PCR-Nachweis einer veränderten <i>ZMM19</i> -Promotor-Region in <i>Tunicate</i> -Pflanzen unterschiedlicher Herkunft . . . . .	37
3.7	Nachweis der unterschiedlichen Expression von <i>ZMM19</i> -Allelen in heterozygoten <i>Tu1-A158</i> -Pflanzen durch einen <i>Single-Nukleotide-Polymorphism</i> . . . . .	39
3.8	Sequenzvergleich und phylogenetische Analysen . . . . .	41
3.9	Expression von <i>ZMM19</i> und <i>ZMM20</i> in vegetativen Organen . . . . .	46
3.9.1	Expression in verschiedenen Blatt-Typen und Nodien . . . . .	46
3.9.2	Blätter verschiedener Entwicklungsstadien . . . . .	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Belege für die Identität von <i>TU1</i> und <i>ZMM19</i> . . . . .	49
4.1.1	<i>Tu1</i> und <i>ZMM19</i> kartieren in der gleichen Region . . . . .	49
4.1.2	Überexpression von Transkriptionsfaktoren führt zu dominanten <i>gain-of-function</i> -Phänotypen . . . . .	50

4.1.3	Korrelation zwischen morphologischer Veränderung und <i>ZMM19</i> -Expressionsniveau . . . . .	50
4.1.4	<i>ZMM19</i> wird in vegetativen Strukturen exprimiert, hauptsächlich in Blattscheiden und Nodien . . . . .	52
4.1.5	Die putative Promotor-Sequenz von <i>ZMM19<sup>Tu1-A158</sup></i> unterscheidet sich von der eines wildtypischen Allels . . . . .	54
4.1.6	Nur <i>ZMM19<sup>Tu1-A158</sup></i> wird ektopisch exprimiert . . . . .	56
4.1.7	Korrelierung des <i>Tu1</i> -Phänotyps mit einem RFLP . . . . .	57
4.2	Abschließende Bewertung der Beweise . . . . .	57
4.2.1	Vorgehensweisen zur Generierung unabhängiger Allele . . . . .	58
4.3	Die Rolle der <i>STMADS11</i> -Familie in der Pflanzenentwicklung . . . . .	60
4.3.1	Verwandtschaftsverhältnisse der <i>STMADS11</i> -ähnlichen Gene . . . . .	60
4.3.2	<i>ZMM19</i> und <i>ZMM26</i> sind rezente Paraloge . . . . .	62
4.3.3	Haben <i>ZMM19</i> und <i>ZMM26</i> redundante Funktionen? . . . . .	63
4.3.4	Welche gemeinsame Funktion hat die <i>STMADS11</i> -Subfamilie, und welche Unterschiede gibt es zwischen den Untergruppen? . . . . .	64
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>68</b>
5.1	Kurz-Zusammenfassung . . . . .	70
5.2	Abstract . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .	<b>71</b>
<b>A</b>	<b>Nomenklatur</b> . . . . .	<b>83</b>
<b>B</b>	<b>Abkürzungen</b> . . . . .	<b>84</b>
<b>C</b>	<b>Sequenzen</b> . . . . .	<b>86</b>
C.1	cDNAs . . . . .	86
C.1.1	cDNA-Sequenz von <i>ZMM19</i> (Klon wf4123, Maislinie T232) . . . . .	86
C.1.2	cDNA-Sequenz von <i>ZMM20</i> (Klon wf4e7a8, Maislinie T232) . . . . .	87
C.1.3	cDNA Sequenz von <i>ZMM21</i> (Klon wf4105, Maislinie T232) . . . . .	88
C.1.4	partielle Sequenz von <i>ZMM26</i> (Maislinie C) . . . . .	89
C.2	<i>Oligonukleotide</i> . . . . .	90

<b>D</b>	<b><i>Multiple-Sequence-Alignments</i></b>	<b>92</b>
D.1	MADS-Domäne . . . . .	92
D.2	STMADS11-ähnliche Proteine . . . . .	94
D.3	Sequenzen der Fragmente aus der diagnostischen PCR auf putativen ZMM19-Promotor-Regionen . . . . .	95
D.3.1	Sequenzierung mit <i>Primer</i> allatgds . . . . .	95
D.3.2	Sequenzierung mit <i>Primer</i> mutestus . . . . .	97
<b>E</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>98</b>
<b>F</b>	<b>Danksagung</b>	<b>99</b>
<b>G</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>100</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Mais ist eine aus Mittel- oder Südamerika stammende Nutzpflanze, die heutzutage weltweit angebaut wird. Wie kaum eine andere alte Kulturpflanze ist Mais auf seine landwirtschaftliche Eignung optimiert. Insbesondere die weibliche Infloreszenz, der Maiskolben, mag dabei als geniale „Erfindung“ der Indios vor ca. 7000 Jahren erscheinen, er ist jedoch höchstwahrscheinlich nur das Ergebnis einer Züchtung mit Hilfe einfacher Selektionsverfahren. Die drastische morphologische Umgestaltung der weiblichen Infloreszenz von Teosinte, der Vorläuferpflanze von Mais, zum Maiskolben, zeigt besonders deutlich das erstaunliche Entwicklungs-Potential, welches in höheren Pflanzen vorhanden ist.

Momentan werden viele Untersuchungen zur Aufklärung von Entwicklungskontrollgenen durchgeführt, um die Entwicklungsprozesse besser zu verstehen. Durch Veränderung der Expression dieser Gene kommt es zur Bildung neuer Pflanzenformen. In Mais sind viele Mutanten bekannt, die in ihrer Entwicklung verändert sind. Solche Mutanten sind wichtige Hilfsmittel zur Identifizierung von Entwicklungskontrollgenen und zum Verständnis ihrer Funktion. *Tunicate1* ist eine dieser Mais-Mutanten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Kandidaten-Gen für den *TU1*-Locus und mit nahe verwandten putativen Entwicklungskontrollgenen. Um die vorgestellten Analysen besser nachvollziehen zu können, ist ein Verständnis der Maisentwicklung, der Morphologie der *Tunicate1*-Mutante und der Familie der *MADS*-Domänen-Transkriptionsfaktoren hilfreich.

## 1.1 Morphologie und Morphogenese einer Maispflanze

### 1.1.1 Der modulare Aufbau von Mais

Mais (*Zea mays* ssp. *mays*) gehört zu den Süßgräsern (*Poacea*), einer Familie der monokotylen Pflanzen. Süßgräser zeichnen sich durch verschiedene morphologische Merkmale aus; so ist der modulare Aufbau des oberirdischen Pflanzenteils charakteristisch. Jede Pflanze besteht aus einer linearen Abfolge von sich wiederholenden Einheiten, den Phytomeren (s. [SCANLON und FREELING 1998] und darin enthaltene Zitate). Jedes Phytomer besteht aus einem Blatt, dem dazugehörigen Knoten (Nodium), dem unterhalb des Knotens befindlichen Stängelsegmentes (Internodium) und einer Seitenknospe. Das Blatt ist

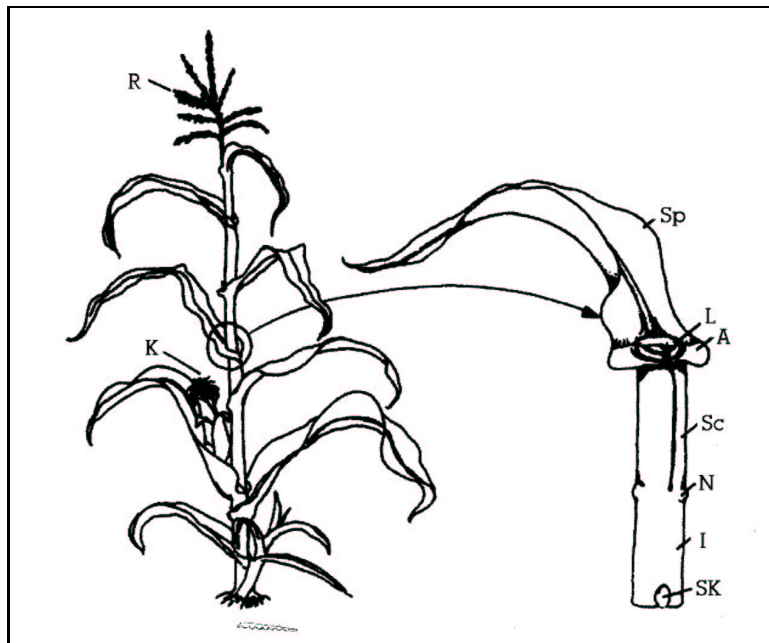


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des oberirdischen Teils einer Maispflanze. Links die Maispflanze und rechts vergrößert ein Phytomer, das Strukturelement, aus dem Süßgräser aufgebaut sind. Abkürzungen: R = Rispe oder Fahne (männliche Infloreszenz), K = Kolben (weibliche Infloreszenz), Sp = Blattspreite, Sc = Blattscheide, L = Ligula (Blatthäutchen), A = Aurikel (Öhrchen), I = Internodium (Stängelsegment), N = Nodium (Stängelknoten) und SK = Seitenknospe. Aus: [SCANLON und FREELING 1998].

aus der proximalen Blattscheide und der distalen Blattspreite aufgebaut, welche durch das Blatthäutchen (Ligula) und die Öhrchen (Aurikel) voneinander abgegrenzt werden (vgl. Abb. 1.1). Alle vegetativen und floralen Strukturen der Maispflanze werden aus Phytomeren aufgebaut, auch wenn es in verschiedenen Fällen zu extremen Modifikationen von Form und Funktion der Phytomeren-Elemente kommt.

### 1.1.2 Phytomer- und Blattentwicklung

Während der Entwicklung einer Maispflanze entsteht jedes Phytomer aus einer Gruppe von Initialzellen (*founder cells*), die vom Sprossapikalmeristem (SAM) bzw. von einem lateralen Meristem abstammen. Während der weiteren Entwicklung bilden sich Untergruppen, die jeweils für die Entstehung von Blatt, Nodium, Internodium bzw. der Knospe verantwortlich sind. Aus den Zellgruppen entwickeln sich Organprimordien, die auswachsen und sich differenzieren [POETHIG und SZYMKOWIAK 1995, SCANLON und FREELING 1998].

Zu Beginn der Blattentwicklung liegen die Blattinitialzellen auf einer Seite der jungen Sprossachse, an der Peripherie des SAMs. Von hier aus bezieht die Gruppe weitere Zellen rings um den Umfang der Sprossachse mit ein; aus dieser Initialzellgruppe



entsteht das Blattprimordium [POETHIG und SZYMKOWIAK 1995, POETHIG 1997]. Im Gegensatz zu der Entwicklung der Dikotylen, in denen das Blattprimordium durch Wachstum von *blastozones* (Randzonen mit Meristem-ähnlichen Aktivitäten [HAGEMANN und GLEISSBERG 1996]) laterale Blattbereiche bildet, sind diese im Maisblatt schon als Bereiche des Primordiums angelegt [POETHIG 1997, SCANLON und FREELING 1998]. Es gibt drei unterscheidbare Wachstumsphasen in der Entwicklung des Maisblattes. In der primordialen Wachstumsphase hat zunächst das ganze Maisblattprimordium meristematischen Charakter, d.h es teilen sich alle Zellen; es wächst nicht durch die Aktivität eines Interkalarmeristems, wie früher vermutet wurde. In der zweiten Phase bildet sich die Ligula-Region. Spreite und Ligula wachsen durch weitere Zellteilungen und Zellstreckung aus. In der dritten Phase wächst nur noch die Blattscheide, die Zellteilungen finden anfangs entlang der gesamten Länge der Blattscheide statt, und sind später auf die Scheidenbasis beschränkt [SYLVESTER et al. 1990, POETHIG und SZYMKOWIAK 1995].

### 1.1.3 Entwicklungskontrollgene in der Blattentwicklung

Viele der Erkenntnisse über Entwicklungsprozesse in Mais und in anderen Pflanzen sind durch Analysen von Zell-Linien in Mosaik-Mutanten gewonnen worden, z. B. [JOHRI und COE JR. 1983, POETHIG und SZYMKOWIAK 1995]. Durch den zunehmenden Einsatz von molekulargenetischen Methoden bei der Erforschung von Pflanzenentwicklungsprozessen, vor allem in der Blütenentwicklung der Dikotylen [THEISSEN und SAEDLER 1999], wurden daran beteiligte Entwicklungskontrollgene identifiziert. Ausgangspunkt von Gen-Identifizierungen waren in vielen Fällen Mutanten, die durch abweichende Entwicklungsprozesse veränderte Pflanzen-Phänotypen bildeten.

Aus Mais sind erst wenige Gene bekannt, die die Blattentwicklung kontrollieren. Ein Antagonist der Blattinitiierung ist das erste klonierte Homöobox-Gen aus Pflanzen, *KNOTTED1* (*KN1*). Das Gen wird im Wildtyp im gesamten SAM exprimiert, in Blättern und Blattprimordien aber herunterreguliert [SMITH und HAKE 1992, JACKSON et al. 1994]. Das KN1-Homöodomänen-Protein ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Meristemstatus der Zellen [VOLLBRECHT et al. 1991, SMITH und HAKE 1992] und ist damit für die Funktion von SAM und Infloreszenzmeristemen notwendig [VOLLBRECHT et al. 2000]. In der *Knotted1*-Mutante wird *KN1* ektopisch in den Blättern exprimiert und führt dadurch zur Bildung von Knötchen auf den Blattrippen. *ROUGH SHEATH1* und *LIGULELESS3* sind ebenfalls *KNOTTED1*-ähnliche-Homöobox-Gene (*KNOX*-Gene) mit ähnlichen Funktionen. Ein Antagonist dieser drei Gene ist *ROUGH SHEATH2*. Dieses Gen kodiert für einen putativen MYB-ähnlichen Transkriptionsfaktor, der in den jungen

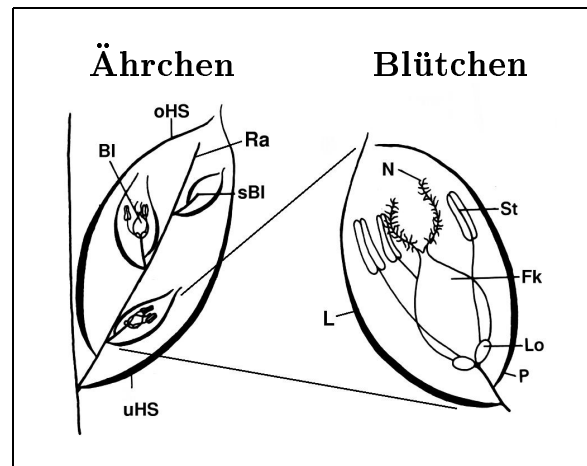


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Grasährchens (links) und eines Grasblütchens (rechts). Abkürzungen: Bl = Blüthen, sBl = steriles Blüthen, uHS = untere Hüllspelze, oHS = obere Hüllspelze, Ra = Rachilla (Ährchenachse), Fk = Fruchtknoten, N = Narbe, St = Stamina, Lo = Lodiculae (Schwellkörperchen), P = Palea (Vorspelze) und L = Lemma (Deckspelze). Aus: [BELL und BRYAN 1991], verändert.

lateralen Organprimordien an der Herunterregulierung der *KNOX*-Expression beteiligt ist [TIMMERMANS et al. 1999, TSIANTIS et al. 1999]. Interaktionspartner dieser Gene sind kaum bekannt, sind aber von großem Interesse für ein weiteres Verständnis der Regulation des Blattentwicklungsprozesses.

#### 1.1.4 Aufbau von Grasinfloreszenzen und -blüten

Süßgräser sind stets windblütig, und ihre unscheinbaren Blüten, oft Blüthen genannt, sind zu mehreren, oder selten allein, in Ährchen angeordnet. Die einzelnen Ährchen besitzen gewöhnlich zwei Hüllspelzen, von denen die untere die Ährchenachse (*Rachilla*) mit den Blüthen trägt. Die Blüthen sind jeweils von einer adaxialen Deckspelze (Lemma) und einer abaxialen Vorspelze (Palea) umgeben. Zwischen diesen Spelzen befinden sich meist zwei Schwellkörperchen (Lodiculae), drei Staubblätter (Stamina) und ein pseudomonomerer Fruchtknoten (vgl. Abb. 1.2).

Über die evolutionäre Verwandtschaft der Deck- und Vorspelze und der Schwellkörperchen mit den Perianth-Organen der dikotylen Blüte bestand lange Uneinigkeit [CLIFFORD 1987]. Neueste Untersuchungen zeigen, dass mutmaßlich Orthologe der Gene, die in dikotylen Pflanzen an der Bestimmung der Kelchblatt- bzw. der Kronblattidentität beteiligt sind, eine ähnliche Funktion in Reis und in Mais für die Deck- und Vorspelze bzw. für die Schwellkörperchen übernehmen [AMBROSE et al. 2000, KANG et al. 1998]. Dies deutet darauf hin, dass die Schwellkörperchen homologe Organe zu den Kronblät-

tern und die Deck- und Vorspelzen homolog zu den Kelchblättern sind [KANG et al. 1998, AMBROSE et al. 2000, THEISSEN et al. 2000].

Die Ährchen sind in rispigen, ährigen oder traubigen Gesamtblütenständen zusammengefasst. Hier bildet Mais eine gewisse Ausnahme. Die Pflanzen sind monözisch. Die männliche Infloreszenz bildet eine endständige Rispe, auch Fahne genannt. Die weibliche Infloreszenz dagegen ist ein seitenständiger Kolben, ein Infloreszenztyp, der sonst nicht bei den Süßgräsern zu finden ist.

Der Maiskolben ist von Hüllblättern, auch Lieschblätter genannt, umgeben. Den Lieschblättern fehlen in vielen Fällen die Blattspreiten, der Kolben wird nur von den Lieschblattscheiden umgeben. Der Kolben selbst besteht aus der Kolbenspindel, auf der im reifen Zustand die Maiskörner sitzen. Die Ährchen der Maisinfloreszenzen legen stets zwei Blütchenanlagen an. Während der Entwicklung der weiblichen Infloreszenz abortieren die unteren Blütchen aber in der Regel. Alle Blütchen, sowohl in den weiblichen, als auch in den männlichen Infloreszenzen werden zwittrig angelegt, im Laufe der Entwicklung kommt es zur Abortion der Stamina und der Schwellkörperchen in den weiblichen Blütchen bzw. zur Abortion der Fruchtknoten in den männlichen Blütchen.

## 1.2 *Tunicate1* – eine berühmte Mais-Entwicklungsmutante

Die *Tunicate1*-Mutante von Mais, auch als Spelzmais oder *pod corn* bekannt, hat seit ihrer ersten Beschreibung die Aufmerksamkeit von Botanikern und Maisgenetikern auf sich gezogen. Besonders eindrucksvoll ist der Phänotyp des Maiskolbens. Hier sitzen die Maiskörner nicht offen auf dem Kolben, wie im Wildtyp, sondern sie sind einzeln von langen, blattartigen Spelzen umhüllt (s. Abb. 1.3).

Dieser Phänotyp wurde von dem Naturforscher A. SAINT-HILAIRE als ursprünglich gewertet, denn die übrigen Süßgräser haben von Spelzen eingeschlossene Früchte, Karyopsen genannt [SAINT-HILAIRE 1829]. Nach einem *Tunicate*-Maiskolben, den er aus Brasilien erhalten hatte, beschrieb er die Pflanze als neue Varietät mit dem Namen *Zea Maïs* var. *tunicata* [SAINT-HILAIRE 1829]. Zu der Zeit war der tatsächliche wilde Vorfahre von Mais, Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumes*), noch nicht identifiziert worden [WEATHERWAX 1935].

Auch spätere Maisgenetiker [MANGELSDORF 1974] haben den *Tunicate*-Phänotyp für ursprünglich gehalten, aber bei dieser Beurteilung nie berücksichtigt, dass die Hüllfunktion bei vielen Süßgräsern nur von Deck- und Vorspelzen erfüllt wird, und nicht von den Hüllspelzen, wie das in der *Tunicate*-Mutante der Fall ist. Weiterhin wurde nicht wirk-



Abbildung 1.3: Phänotyp eines *Tunicate*-Maiskolbens (oben) und eines Wildtyp-Maiskolbens (unten) im Vergleich. Die Körner des *Tunicate*-Maiskolbens sitzen nicht nackt auf dem Kolben sondern sind einzeln von Spelzen umhüllt.

lich in Betracht gezogen, dass die nahen Mais-Verwandten dauerhafte, verholzte Hüllspelzen haben und nicht wie *Tunicate* feine, papierartige Hüllspelzen.

Die Erkenntnis, dass Teosinte der Vorfahre von Mais ist, setzte sich schließlich auf Grund verschiedener, u.a. auch molekularbiologischer Ergebnisse durch [BEADLE 1939, GALINAT 1983, ILLIS 1983, DOEBLEY 1990, WANG et al. 1999]. Es ist anzunehmen, dass Mais vor etwa 5.000 bis 10.000 Jahren aus der Wildpflanze Teosinte domestiziert wurde.

Auch auf Grund der Fehleinschätzung der Bedeutung der *Tunicate*-Mutante für die Evolution von Mais, ist die Mutante sehr intensiv untersucht worden. Genetische Analysen zeigten, dass es sich um ein codominantes Merkmal handelt [COLLINS 1917, MANGELSDORF und GALINAT 1964] und der *TUNICATE*-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 4 lokalisiert ist [HAYES und CHANG 1939]. Nach neuen Nomenklaturregeln der Maisgenetiker ([http://www.agron.missouri.edu/maize\\_nomenclature](http://www.agron.missouri.edu/maize_nomenclature)) wird der

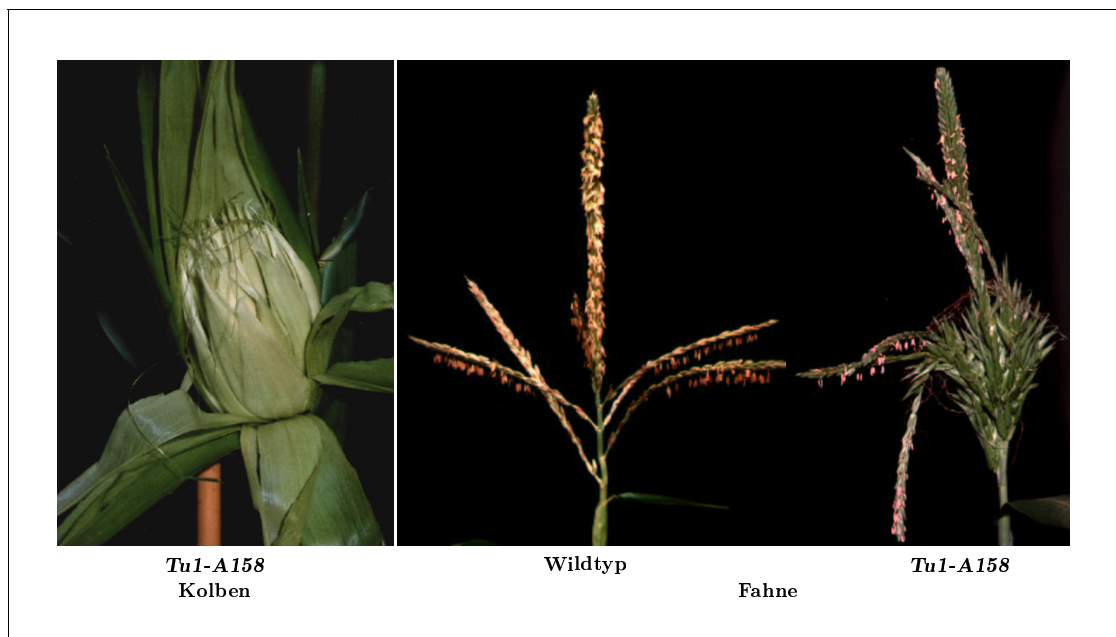


Abbildung 1.4: Phänotypen der *Tu1-A158*-Planzen unter MPIZ-Anzuchtbedingungen. Links eine weibliche *Tu1*-Infloreszenz, rechts eine *Tu1*-Fahne im Vergleich mit einer Wildtyp-Fahne (Mitte).

Locus mit einer zusätzlichen Ziffer benannt und heißt jetzt *TUNICATE1* oder *TU1*.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Ausprägung des *Tu1*-Phänotyps mit den Umweltbedingungen und dem genetischen Hintergrund stark variieren kann [MANGELSDORF 1974]. Ein jedoch stets auftretender Phänotyp ist die Verlängerung der Hüllspelzen in den Maiskolben. Andere Veränderungen, die nicht immer auftreten, sind die Verzweigung der Maiskolben, die Entwicklung der unteren Blüten in der weiblichen Infloreszenz und die Entwicklung von Fruchtknoten in den männlichen Infloreszenzen. Auch eine Verlängerung des den Kolben tragenden Seitentriebs wird manchmal beobachtet, wodurch der Kolben nicht mehr von den Lieschblättern umgeben wird. Sogar die Kolbenspindel kann stark verlängert sein, wodurch der Kolben eher das Aussehen einer Grasähre erhält [MANGELSDORF 1974].

Auch die für diese Arbeit unter Gewächshausbedingungen angezogenen heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanzen besaßen stark verlängerte Hüllspelzen, verzweigte weibliche Infloreszenzen, welche kaum Körner bildeten, und stark feminisierte terminale Infloreszenzen (s. Abb. 1.4).

Es wurde viel über den möglichen Ursprung von *Tunicate* bzw. die Häufigkeit des *Tunicate*-Mutationsereignisses spekuliert. Da *Tunicate*-Pflanzen oder *Tunicate*-Kolben an vielen Orten in Südamerika und einigen in Nordamerika gefunden wurden, gab es die Vermutung, dass es mehr als ein Mutationsereignis gegeben hat [COLLINS 1917]. Es sind

allerdings keine Berichte über ein spontanes Auftreten von *Tunicate*-Mutanten beim Anbau von Zuchtrassen bekannt. H. CUTLER entwickelte eine neue Idee über das verbreitete Vorkommen von *Tunicate* in Amerika. Seine Studien haben ergeben, dass *Tunicate*-Kolben von Medizinmännern der südamerikanischen Indios als Medizin-Bestandteil benutzt werden [CUTLER 1944]. Vorfahren dieser Medizinmänner wanderten in vorkolumbianischen Zeiten von Südamerika in den Südwesten von Nordamerika, wie alte Felsenmalereien von buckligen Flötenspielern, genannt „Kocopelli“, zeigen. Da sich in den gleichen Regionen, in denen diese Felsenmalereien auftreten, auch alte *Tunicate*-Kolben auffinden lassen, vermutet H. CUTLER, dass die vorkolumbianischen Medizinmänner die *Tunicate*-Mutante sowohl bewahrt als auch verbreitet haben. Nach dieser Theorie könnten alle *Tunicate*-Pflanzen auf ein einziges ursächliches Mutationsereignis zurückzuführen sein. Ein unabhängiges *Tu1*-Allel wäre dann nicht bekannt.

Auch Untersuchungen in neuerer Zeit bedienten sich der *Tu1*-Mutante. Gendosis-Analysen zeigten, dass die *Tu1*-Mutation einen *gain-of-function*-Charakter besitzt, d. h. die Ausprägung des Phänotyps war positiv korreliert mit der relativen *Tu1*-Gendosis [POETHIG 1987]. Untersuchungen an Mais-Mutanten, welche somatische Mosaik bezüglich der Anwesenheit der chromosomalen Region von *Tu1* waren, zeigten, dass *Tu1* zumindest in der Fahne zellautonom wirkt [JOHRI und COE JR. 1983], d. h. das Entwicklungsprogramm der *Tu1*-Zell-Linien, wurde von den Zellen selbst bestimmt und nicht von den umliegenden Zellen beeinflusst.

## 1.3 Die Familie der MADS-Box-Gene – eine wichtige Familie für die Steuerung von Entwicklungsprozessen in Pflanzen

### 1.3.1 Blütenentwicklung in Dikotylen

Die Erforschung der Infloreszenz- und Blütenentwicklung hat gerade in den letzten zehn Jahren große Fortschritte gemacht; einen Überblick geben [THEISSEN und SAEDLER 1999]. Mit molekularen Methoden wurden Komponenten eines regulatorischen Gen-Netzwerks entdeckt, welches die Infloreszenz- und Blütenentwicklungsprozesse steuert. Dieses Netzwerk erscheint, abgesehen von einigen Modifikationen, in allen bisher untersuchten eudikotylen Modellpflanzen sehr ähnlich und es wird daher vermutet, dass ein solches Netzwerk der Blütenentwicklung aller Eudikotylen zugrunde liegt.

Das Gen-Netzwerk kann in verschiedene Ebenen eingeteilt werden: auf der obersten Ebene stehen Blütezeit-Gene, welche durch Umwelteinflüsse aktiviert oder inhibiert werden können. Diese Gene bewirken ein Umschalten von vegetativer zu reproduktiver Entwicklung, wodurch wahrscheinlich direkt oder auch mittelbar Meristemidentitätsgene aktiviert werden. Die Meristemidentitätsgene bewirken die Transition vom vegetativen Meristem zum Infloreszenzmeristem und vom Infloreszenzmeristem zum Blütenmeristem. In den Blütenmeristemen werden durch die Aktion von Kataster-Genen (*cadastal genes*) die Grenzen der verschiedenen Blütenwirtel festgelegt. Durch Aktivierung der Blütenorgan-Identitätsgene, welche innerhalb jedes Wirtels die Aktivierung weiterer Gen-Kaskaden bewirken, wird die Realisierung der jeweiligen Organ-Charakteristika erreicht. Diese Blütenorgan-Identitätsgene werden auch als Homöotische-Selektor-Gene oder als ABC-Gene bezeichnet, da im klassischen Modell der Blütenentwicklung drei Klassen von homöotischen Funktionen postuliert werden, die A-, B- und C-Klasse. Diese spezifizieren einzeln oder in Kombinationen die Kelchblatt- (nur A), die Kronblatt- (A und B), die Staubblatt- (B und C) und Karpell-Identität (nur C) [COEN und MEYEROWITZ 1991].

Der Ausfall einer dieser Funktionen oder die Etablierung einer Funktion am falschen Blütenort führt zu homöotischen Veränderungen der Blüte, wie dies in verschiedenen Infloreszenz- und Blütenmutanten beobachtet wird. So fehlt z. B. der *globosa*-Mutante aus *Antirrhinum majus* die B-Funktion. Anstelle von Kronblättern bildet sie daher einen zweiten Wirtel Kelchblätter aus und anstelle der Staubblätter entwickeln sich Karpelle [TRÖBNER et al. 1992].

Viele Gene des regulatorischen Netzwerkes gehören zur Familie der MADS-Box-Gene. Diese große Genfamilie ist in allen Eukaryonten vertreten. Die MADS-Box

kodiert für eine 60-Aminosäuren-lange DNA-Bindedomäne, die MADS-Domäne. Die Abkürzung MADS steht für die ersten vier gefundenen Vertreter dieser Familie: *MCM1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS* und *SRF* [SCHWARZ-SOMMER et al. 1990]. Die MADS-Box-Gene sind nicht nur prominent unter den Blütenorgan-Identitätsgenen vertreten, sondern werden auch auf weiteren Netzwerkebenen gefunden. Die von ihnen kodierten MADS-Domänen-Proteine sind modular aufgebaute Transkriptionsfaktoren. In Samenpflanzen gehören sie vorrangig zu den MIKC-Typ-Proteinen [MÜNSTER et al. 1997]: Meist beginnen sie N-terminal mit der MADS-Domäne (M), es folgt die *intervening*-Region (I), die Keratin-ähnliche Region (K) und schließlich die C-terminale Region (C). Die MADS-Domäne ist die am stärksten konservierte Domäne und ist hauptverantwortlich für die DNA-Bindung, aber sie hat auch Funktionen in der Dimerisierung und Bindung von zusätzlichen Faktoren. Am wenigsten stark konserviert ist die C-Domäne [THEISSEN et al. 1996, RIECHMANN und MEYEROWITZ 1997].

Sequenzanalysen und Phylogenierekonstruktionen der MADS-Box-Genfamilie haben gezeigt, dass die Familie aus verschiedenen Subfamilien besteht [THEISSEN et al. 1996, PURUGGANAN 1997, MÜNSTER et al. 1997]. Mitglieder einer Subfamilie besitzen oft sehr ähnliche Expressionsmuster und Funktionen. Das bedeutet, dass z. B. Gene, die an der Bildung gleicher homöotischer Funktionen beteiligt sind in der Regel in der gleichen Subfamilie zu finden sind. Es handelt sich in vielen Fällen wahrscheinlich um orthologe Gene.

Die Etablierung der verschiedenen Subfamilien war vermutlich von Bedeutung für die Evolution der homöotischen Funktionen der Blütenorganbildung [THEISSEN und SAEDLER 1999].

### 1.3.2 Blütenentwicklung in Monokotylen

Das regulatorische Netzwerk der Blütenentwicklung ist bislang am besten in höheren Eudikotylen erforscht. Verschiedene Untersuchungen, insbesondere an Mais und Reis, haben aber gezeigt, dass auch in Monokotylen sowohl MADS-Box-Gene der Subfamilien vorkommen, deren Mitglieder in Dikotylen Blütenorgan-Identitätsgene sind [SCHMIDT et al. 1993, CHUNG et al. 1994, CHUNG et al. 1995, THEISSEN et al. 1995, MENA et al. 1995, MENA et al. 1996, KANG et al. 1998, LOPEZ-DEE et al. 1999, MOON et al. 1999, AMBROSE et al. 2000, KYOZUKA et al. 2000], als auch MADS-Box-Gene der Subfamilien, die andere Rollen in der Infloreszenz- und Blütenentwicklung haben [KANG et al. 1995, GRECO et al. 1997, HEUER et al. 2000, JEON et al. 2000]. Die Expressionsmuster dieser Gene sind, wenn man die morphologischen Unterschiede zwischen Monokotylen und Dikotylen berücksichtigt, sehr ähnlich zu denen ihrer Verwandten in Dikotylen und legen daher zum großen Teil identische Funktionen nahe.



Analysen von Funktionsverlust-Mutanten (*loss-of-function*-Mutanten) haben für einzelne Gene gezeigt, dass sie tatsächlich an der Bereitstellung der homöotischen Blütenorganfunktionen beteiligt sind [MENA et al. 1996, KANG et al. 1998, AMBROSE et al. 2000].

Am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ) in Köln wurden in den letzten Jahren weitere MADS-Box-Gene aus Monokotylen kloniert. Ziel dieser Klonierungen war die Erweiterung des Wissens über die Vorgänge, die zur Bildung der Monokotylen-Infloreszenzen und -Blüten führen, auch in Hinsicht auf mögliche Anwendungen in der Pflanzenzüchtung. Aus Gerste und Mais wurden neue MADS-Box-Gen-cDNA-Klone isoliert und analysiert (Gerste: [SCHMITZ et al. 2000]; Mais: [CACHARRÓN 1998, MÜNSTER et al. 2000] und G. THEISSEN, T. MÜNSTER, W. FAIGL und S. WERTH persönliche Mitteilung). Nicht alle diese Gene gehören Subfamilien an, die bekanntermaßen an der Blütenentwicklung beteiligt sind.

### **1.3.3 Spielen MADS-Box-Gene eine Rolle in der vegetativen Pflanzenentwicklung?**

Regulatorische Gen-Netzwerke sind am Ablauf vieler Entwicklungsprozesse beteiligt. Das bekannteste Beispiel ist die Embryonalentwicklung von Tieren [MCGINNIS und KUZIORA 1994]. Es wird vermutet, dass alle komplexen Entwicklungsprozesse durch Gen-Netzwerke gesteuert werden, u. a. auch die Entwicklung des vegetativen Sprosses, die Wurzelentwicklung und die Pflanzen-Embryonalentwicklung. Homöobox-Gene spielen in der Regulation der Spross- und Blattentwicklung eine bedeutende Rolle [REISER et al. 2000]. Auch eine Beteiligung von MADS-Box-Genen in solchen Gen-Netzwerken, die vegetative Entwicklungsprozesse steuern, ist wahrscheinlich. Es sind MADS-Box-Gene bekannt, die hauptsächlich in vegetativen Organen exprimiert werden: z. B. *AGL12* und *AGL17* in der Wurzel [HECK et al. 1995], *AGL15* im Embryo [ROUNSLY et al. 1995], *FLC* in Wurzel und Rosettenblättern [SHELDON et al. 1999] und die Mitglieder der *STMADS11*-Subfamilie in fast allen untersuchten vegetativen Organen [CARMONA et al. 1998, GARCIA-MAROTO et al. 2000, HARTMANN et al. 2000, SCHMITZ et al. 2000, MAO et al. 2000].

Auch einige der am MPIZ gefundenen Mais-MADS-Box-Gene wurden hauptsächlich in vegetativen Organen exprimiert.

### **1.3.4 Eine Mutation in einem MADS-Box-Gen könnte ursächlich für den *Tunicate*-Phänotyp sein**

Einige Aufschlüsse über den Ablauf von Entwicklungsprozessen können von Entwicklungsmutanten gewonnen werden. Diese weichen in ihrer Entwicklung von wildtypischen Pflanzen ab. Die Abweichung kann z. B. dadurch hervorgerufen werden, dass durch den

Ausfall eines Genproduktes ein Entwicklungsprozess blockiert ist, so dass die Pflanzen sich nach einer bestimmten Entwicklungsphase nicht mehr weiter entwickeln. Ebenso kann ein Entwicklungsprogramm am falschen Ort ablaufen, wodurch es zu homöotischen Mutationen kommen kann, d. h. es bilden sich vollständige Organe am falschen Ort. Das Programm kann auch zur falschen Zeit ablaufen, diese Änderungen nennt man heterochronisch. Der Phänotyp solcher Mutanten kann unterschiedlich ausfallen. Er ist abhängig von der Art der Interaktion der verschiedenen Entwicklungs-Regulationsmechanismen. Werden die Entwicklungsprozesse unabhängig voneinander reguliert, so kann es zur Ausprägung unterschiedlicher Identitäten in einem Organ kommen. So tragen z. B. in *Teopod*-Mutanten Maisblätter, die in wildtypischen Pflanzen adulte Charakteristika entwickeln, sowohl juvenile als auch adulte Merkmale. Viele Entwicklungsmutanten können sowohl als homöotische als auch als heterochronische Mutanten interpretiert werden. So führt z. B. die Ausprägung eines vegetativen Entwicklungsprogramms in Primel-Infloreszenzen zu Transformationen von Tragblättern (Brakteen) zu echten Blättern. Dies kann als falscher Zeitpunkt für die Ausprägung des Programms, nämlich *nach* statt *vor* der floralen Transition, oder als falscher Ort für das Programm, nämlich im Infloreszenzmeristem statt im SAM, verstanden werden [CONWAY und POETHIG 1993].

In Mais ist eine große Anzahl von Entwicklungsmutanten bekannt, die im Laufe der verhältnismäßig langen Geschichte der Maisgenetik gesammelt wurden [NEUFFER et al. 1997]. Ein großer Teil von ihnen betrifft die Blütenentwicklung [VEIT et al. 1993]. Viele der mutanten Loci wurden chromosomal lokalisiert [NEUFFER et al. 1997]. Ein Ansatz zur Aufklärung von Entwicklungsprozessen ist die Suche nach Genen, deren Mutation ursächlich für solche veränderte Phänotypen ist. Eine Möglichkeit, Entwicklungskontrollgene zu identifizieren, ist die Analyse von Genfamilien, von denen bereits Mitglieder bekannt sind, die an der Steuerung von Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Solche Genfamilien sind z. B. die Homöobox-Genfamilie oder die MADS-Box-Genfamilie.

Um in einer bestimmten Spezies weitere Mitglieder der entsprechenden Familie zu finden, verwendet man Homologie-basierte Methoden. Auf diese Art wurden z. B. die ersten Mitglieder der MADS-Box-Genfamilie aus Mais gefunden [SCHMIDT et al. 1993, THEISSEN et al. 1995]. Die identifizierten Gene lassen sich, zumindest in Mais, durch Genkartierungsverfahren mit RFLP-Markern [BURR und BURR 1991] einem chromosomalen Ort zuordnen. Ist in dem ermittelten Abschnitt ebenfalls der veränderte Genlocus einer Entwicklungsmutante lokalisiert, so hat man ein Kandidaten-Gen für diese Entwicklungsmutante. Weitere Analysen müssen dann zeigen, ob der Kandidaten-Genlocus wirklich mit dem Ort der Mutation übereinstimmt.

Es wurde vermutet, dass die Mais-Entwicklungsmutanten *indeterminate1* (*id1*),

*barrenstalk1*, *tasselseed4* und *Polytypic ear1* durch Mutationen in verschiedenen Mais-MADS-Box-Genen entstanden sind [SCHMIDT et al. 1993]. Für *id1* konnte jedoch mittlerweile nachgewiesen werden, dass die Mutation eines anderen Gens, welches für ein Zink-Finger-Protein kodiert, ursächlich ist [COLANSANTI et al. 1998]. Der Kandidaten-Gen-Ansatz kann also auch in die Irre führen. Bisher konnte nur für eine bekannte Entwicklungsmutante, *silky1* (*si*), gezeigt werden, dass der *si1*-Phänotyp durch eine Mutation in einem Mais-MADS-Box-Gen hervorgerufen wird [AMBROSE et al. 2000]. Dieser Nachweis wurde allerdings mit Transposon-*tagging* erbracht.

Die Kartierung der neu am MPIZ gefundenen Mais-MADS-Box-Gene hat zur Identifizierung weiterer Loci geführt, die in der Nähe eines in Entwicklungsmutanten veränderten Genortes kartieren. Einer dieser Orte liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4, auf dem sich der *TU1*-Locus befindet. In dessen Nähe kartiert das MADS-Box-Gen *ZMM19*.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch Charakterisierung des Mais-MADS-Box-Gens *ZMM19* Hinweise zu erhalten, ob eine Mutation in diesem Gen ursächlich für den *Tu1*-Phänotyp ist.

Schwerpunkte dieser Arbeit bildeten dabei eine morphologische Charakterisierung der *Tu1*-Mutante und Expressionsstudien von *ZMM19*. Es wurde außerdem die phylogenetische Verwandtschaft von *ZMM19* zu anderen MADS-Box-Genen geklärt und drei nahe verwandte Gene wurden in die Expressionsstudien eingeschlossen.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), BIOMOL Feinchemikalien (Hamburg), Difco BD Biosciences (Sparks, USA), Dynal A.S. (Oslo, Norwegen), Eurogentec (Seraing, Belgien), Fluka (Deisenhofen), Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), National Diagnostics (Atlanta, USA), Qiagen (Hilden), Pall Gelman Sciences (Roßdorf), Pharmacia Biotech Europe (Freiburg), Riedel de Haen (Hannover), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Sartorius (Göttingen), Seakem (Rockland, USA), Serva (Heidelberg), Sherwood Medical (Schwalbach) und Sigma (München) bezogen und hatten in der Regel den Reinheitsgrad p.A.

Die Enzyme stammten von den Firmen Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), New England Biolabs Inc. (Beverly, USA), Promega (Heidelberg), Roche Diagnostics (Mannheim) und Stratagene Cloning Systems (La Jolla, USA).

Oligonukleotide stammten von den Firmen MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Metabion (Martinsried) und MWG-Biotech (Ebersberg).

### 2.2 Medien, Puffer, Lösungen

Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach den in SAMBROOK [1989] beschriebenen Protokollen hergestellt.

### 2.3 Plasmide und Bakterienstämme

Die verwendeten Mais-cDNA-Klone (s.u.) befanden sich in den Vektoren „pGEM-T“ (Promega, Heidelberg) oder „pBluescriptIISK+“ bzw. „pBluescriptIISK+“ (Stratagene, La Jolla, USA). Als Wirtszellen für die Plasmidpropagation wurde der *Escherichia coli*-Stamm JM109 benutzt.

## 2.4 Mais-cDNA-Klone

Die für diese Arbeit verwendeten Mais-MADS-Box-Gen-cDNA-Klone stammen aus cDNA-Banken die mittels mRNA aus Maislinie T232 hergestellt wurden und wurden von W. FAIGL oder S. WERTH in unserer Arbeitsgruppe kloniert. Die Klone repräsentieren folgende Gene:

Klon-Name	Gen-Name
wf4123	<i>ZMM19</i>
wfe7a8	<i>ZMM20</i>
wf4105	<i>ZMM21</i>

Für ein viertes MADS-Box-Gen, *ZMM26*, lag kein cDNA-Klon vor. Das Gen wurde aufgrund seiner großen Sequenzähnlichkeit mit *ZMM19* bei der Sequenzierung des *ZMM19*-Locus entdeckt (T. MÜNSTER und W. FAIGL, persönliche Mitteilung). Matrizen für RNA-Sonden wurden mittels PCR mit *ZMM26*-spezifischen Oligonukleotiden auf einem cDNA-Pool aus Lieschblättern (Maislinie C) amplifiziert und anschließend zur Kontrolle sequenziert.

Subklone der *KNOTTED1*-cDNA, pKS-*kn3'*, pSK-*kn5'* und pSK-*knbox*, wurden von D. Jackson [JACKSON et al. 1994] zur Verfügung gestellt und zur Herstellung von Kontrollsonden für die *in situ*-Hybridisierung verwendet.

Eine cDNA der cytosolischen Glycerinaldehyd-Dehydrogenase aus Mais, *GAPDH*, wurde von W. MARTIN zur Verfügung gestellt und wurde ebenfalls zur Herstellung von Kontrollsonden für die *in situ*-Hybridisierung verwendet.

## 2.5 Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Maislinien (*Zea mays* ssp. *mays*) verwendet:

(Die Abkürzungen bedeuten: CIMMYT = *Centro Internacional para Mejoramiento del Maíz y Triego* (<http://www.cimmyt.cgiar.org>); IPK = Institut für Kulturpflanzenforschung, Gatersleben (<http://www.ipk-gatersleben.de>); MGSC = *Maize Genetic Stock Center* (<http://w3.aces.uiuc.edu/maize-coop/>); MPIZ = Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln; ACE = *accession evolution*, lokale Mais-Stammsammlung der Arbeitsgruppe am MPIZ.)

Name	Beschreibung	Quelle	Lager-Nr.
<i>C</i>	Inzuchtlinie, w22 farbverändert [SCHWARZ-SOMMER et al. 1984]	MPIZ	ACE99
<i>T232</i>	Inzuchtlinie [EDWARDS et al. 1987]	MPIZ	ACE100
<i>A158</i>	Inzuchtlinie	Universität Bergamo, Italien	
<i>Tu1-A158</i>	<i>Tunicate</i> -Phänotyp, <i>Tu1</i> -Referenzallel [MANGELSDORF und GALINAT 1964]	MGSC	416A
<i>Tu1-l</i>	abgeschwächter <i>Tu</i> -Phänotyp [MANGELSDORF und GALINAT 1964]	MGSC	416B
<i>Tu1-d</i>	abgeschwächter <i>Tu</i> -Phänotyp [MANGELSDORF und GALINAT 1964]	MGSC	416D
<i>Tu1-md</i>	abgeschwächter <i>Tu</i> -Phänotyp [MANGELSDORF und GALINAT 1964]	MGSC	416F
<i>W23M14</i>	heterogene Linie, in die <i>Tu1-A158</i> im MGSC eingekreuzt wurde	MGSC	416A
<i>Tu*5090B</i>	<i>Tunicate</i> -Phänotyp	MGSC	Tu*5090B
<i>TUNICA9</i>	Durango 101, <i>Tunicate</i> -Phänotyp, aus Mexico	CIMMYT	10633
<i>CRCHIH</i>	Chihuahua 289, <i>Tunicate</i> -Phänotyp, aus Mexico	CIMMYT	10634
<i>ZEA41</i>	<i>Tunicate</i> -Phänotyp	IPK	ZEA41
<i>ZEA48</i>	<i>Tunicate</i> -Phänotyp	IPK	ZEA48
<i>Cornell1,</i> <i>-2, -3, -4</i>	Maiskolben mit <i>Tunicate</i> -Phänotyp	Cornell University, USA	
<i>TuMPIZ1</i>	<i>Tunicate</i> -Phänotyp	MPIZ	Ausstellung
<i>Hsf1-</i> <i>N1595</i>	<i>Hairy-sheath-frayed1</i> -Phänotyp [BERTRAND-GARCIA und FREELING 1991]	MGSC	528A

Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen.

## 2.6 Rasterelektronenmikroskopische Studien

Pflanzenmaterial für die Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurde nach dem Ernten auf feuchten Tüchern bei Raumtemperatur transportiert und maximal 6 h aufbewahrt. Die Organe wurden unter dem Binokular freipräpariert, ohne Fi-

xierung auf der Objektplatte befestigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Wasserkristalle auf der Objektoberfläche wurden durch Erwärmung der Objektplatte mit den tiefgefrorenen Objekten von  $-184\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Vakuum entfernt. Die so vorbereiteten Objekte wurden mit Gold in einem „CT 15000 Crytrans System“ (Oxford Instruments, England) bedampft und mit einem „DSM 940 Rasterelektronenmikroskop“ (Zeiss, Oberkochen) mikroskopiert. Bilder wurden digital aufgenommen.

## 2.7 Isolierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Plasmid-DNA wurde mit dem „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. PCR-Reaktionen wurden nach den in SAMBROOK [1989] beschriebenen Protokollen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim) aufgereinigt.

## 2.8 Isolierung von genomischer DNA aus Mais

Genomische DNA aus Mais wurde mit einer veränderten DIECA-Methode [SCHWARZ-SOMMER et al. 1984] aus Blattspreiten aufgereinigt.

2-3 g tiefgefrorenes gemörstertes Blattmaterial (ca. eine Blattspreite) wurden in 15 ml DIECA-Puffer (50 mM Tris-HCL, pH 7,8, 50 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 7 mM Mercaptoethanol, 1% (v/v) Lauroylsarcosin und 100 mM Natrium-Diethyldithiocarbaminat) suspendiert. Nach 90 Minuten Inkubation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die unlöslichen Komponenten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der wässrige Überstand mit einem Volumen kaltem Isopropanol versetzt und sanft geschüttelt. Der DNA-Niederschlag wurde abzentrifugiert, in 2 ml TE (pH 8,0) gelöst, über Nacht einer RNase-Behandlung ( $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  RNase A,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ausgesetzt. Es wurde ein Proteinase-K-Verdau angeschlossen (0,2% SDS, 0,25 mg/ml Proteinase K, 30 Minuten  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 Minuten  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die DNA-Lösung wurde in drei Schritten, mit Phenol, mit Phenol/Chloroform und mit Chloroform extrahiert und nach Zugabe von Natriumacetat (0,3 M) mit 2 Volumina Ethanol gefällt. Der DNA-Niederschlag wurde abzentrifugiert, gewaschen, getrocknet und in 0,5 ml TE aufgenommen.

## 2.9 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Herstellung von Gesamt-RNA wurde Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff gemörstert und die RNA mit Hilfe des „Total-RNA-Reagenzes“ (BIOMOL, Hamburg)

nach Anleitung des Herstellers gewonnen (10 ml Reagenz je 1 g Pflanzenmaterial). Aufgereinigte Gesamt-RNA wurde in deionisiertem Formamid aufgenommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.10 Herstellung von cDNA

Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese war Gesamt-RNA, die aus Lieschblättern bzw. weiblichen Infloreszenzen einer heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanze bzw. nur aus Lieschblättern einer Wildtyp-Pflanze (*W23M14*) gewonnen wurde. Die Aufreinigung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA erfolgte mit Hilfe von „Oligo(dT)25-Dynabeads“ (Dyna, Oslo) nach Herstellerangaben. Die Synthese von cDNA wurde mit „SuperscriptII-Polymerase“ (Gibco) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die 20  $\mu\text{l}$  PCR-Ansätze wurden 1 : 25 mit Wasser verdünnt (500  $\mu\text{l}$ ) und in Aliquots eingefroren.

## 2.11 RNA-Gel-Blot-Analyse

Gesamt-RNA für die RNA-Gel-Blots wurde, sofern nicht anderes angegeben, aus der Maislinie *C* gewonnen.

RNA für Standard-RNA-Gel-Blots wurde aus folgenden Pflanzenteilen gewonnen: Blattspreite (Blatt 5 oder 6; 6 Wochen alt), Wurzel (gesamt; 4 Wochen alt), Keimling (oberirdischer Teil; 15 Tage nach Aussaat), Lieschblatt (von nachfolgenden weiblichen Infloreszenzen, Lieschblätter aus Maislinie *C* besaßen keine Lieschblattspreiten), weibliche Infloreszenzen (3 mm bis 2,5 cm groß), männliche Infloreszenzen (5 mm bis 2,5 cm groß) und Körner (15 bzw. 20 Tage nach Befruchtung).

Die RNA-Gel-Blots mit RNA aus verschiedenen vegetativen Organen umfassten folgendes Material: Keimling (s.o.), Coleoptilen (7 und 10 Tage alt), undifferenzierte Blattscheide und Blattspreite (Blatt 6; 4 Wochen alt), ausdifferenzierte Blattscheide und Blattspreite (Blatt 4; 6 Wochen alt), Vorblatt und Lieschblätter der weiblichen Infloreszenz (13 Wochen alt) und Nodien (von 0,3 mm oberhalb des 4. Nodiums bis 0,3 mm unterhalb des 5. Nodiums; 6 Wochen alt).

Für RNA-Gel-Blots aus Blättern verschiedener Altersstufen wurde Blattmaterial im Abstand von einer Woche aus einer Population gleichaltriger Pflanzen jeweils von Blatt 4 (von unten gezählt) geerntet: Blattscheide (vom Nodium bis 1 cm unterhalb des Blatthäutchens), Ligula (Bereich von 1 cm unterhalb bis 1 cm oberhalb des Blatthäutchens) und Blattspreite (ab 1 cm oberhalb des Blatthäutchens ca. 10 cm aufwärts).

Im Fall aller *Tunicate1*-RNA-Gel-Blots wurden die Pflanzenteile von ca. 13 Wochen alten Pflanzen kurz vor Pollenreife geerntet: Blattspreite, Lieschblatt (alle Lieschblätter



bestanden nur aus Scheiden), Zweig einer männlichen Infloreszenz und eine ca. 2-3 cm große weibliche Infloreszenz.

Jeweils 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA pro Spur wurden auf einem denaturierenden Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran („positiv geladene Nylonmembran“ Roche, Mannheim; oder „Biodyne+“ von Pall, Roßdorf), nach Anleitung der Firma Roche transferiert. Als Sonden für die Hybridisierung dienten *antisense*-Digoxigenin- (DIG-) bzw. *antisense*-Fluoreszin-markierte RNA-Moleküle, die mittels *in vitro*-Transkription hergestellt wurden („T7-“ oder „T3-RNA-Polymerase“, Roche, Mannheim).

Als Vorlagen für die *run-off*-Transkription dienten etwa 200 - 400 bp große cDNA-PCR-Fragmente. Für *ZMM19* wurden cDNA-PCR-Fragmente entsprechender Größe durch PCR-Starter-Oligonukleotidensequenz mit geeigneten Restriktionsschnittstellen ausgestattet (s. Anhang C.2) und nach entsprechendem Restriktionsverdau in „pBluescriptIIKS+“ kloniert. Als Transkriptionsvorlagen wurden PCR-Fragmente erstellt, die diese cDNA-Subklonen zusammen mit den rechts und links davon gelegenen T7- und T3-Promotor-Startsequenzen aus dem Vektor überspannten (s. Anhang C.2). Für *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26* wurden die Transkriptionsvorlagen mittels PCR direkt auf dem jeweiligen cDNA-Klon erstellt. Die Fragmente trugen an den Enden T7- bzw. T3-Promotor-Startsequenzen, die aus den PCR-Starter-Oligonukleotiden (Sequenzen s. Anhang C.2) stammten [GANDRILLON et al. 1996].

Als Vorlage für RNA-Gel-Blot-Sonden wurden die C-Region bzw. die 3'-untranslatierte Region (UTR) der jeweiligen MADS-Box-Gen-cDNA benutzt.

Hybridisierung erfolgte in „DIG-Easy“-Hybridisierungslösung (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers, ebenso wie die Detektion, mit der Ausnahme, dass anstelle von zwei finalen Waschschritten vier Waschschrritte vor der Detektion durchgeführt wurden. Die Detektion erfolgte mit dem Chemoluminiszenz-Substrat „CDP-Star“ (Roche, Mannheim) auf lichtempfindlichem Film.

## 2.12 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde im wesentlichen wie bei [CACHARRÓN et al. 1999] angegeben durchgeführt, nur dass die zwei stringenten Waschschrritte für 30 Minuten in 0,3x SSC bei 60 °C, statt 60 Minuten in 0,1x SSC, durchgeführt wurden.

Die Hybridisierungssonden (DIG-markierte RNA-Moleküle) wurden wie für die RNA-Gel-Blots beschrieben hergestellt, nur dass die I-, K-, C-Region und der 3'-UTR der jeweiligen MADS-Box-cDNAs als Vorlage benutzt und sowohl *sense*- als auch *antisense*-RNA-Sonden erstellt wurden. *Antisense*-RNA-Sonden von der C-Region und dem 3'-UTR waren identisch mit den RNA-Gel-Blot-Sonden.

Als Kontrollsonden wurden DIG-markierte *antisense*-RNA-Moleküle der *KN1*-cDNA und der cytosolischen *GAPDH*-cDNA hergestellt. Als Vorlage für die Transkription dienten PCR-Fragmente, die die kompletten *KN1*-Subklone bzw. die *GAPDH*-cDNA zusammen mit den rechts und links davon gelegenen T7- und T3-RNA-Polymerase-Promotorsequenzen aus den pBluescript-Vektoren überspannten.

Für die Hybridisierungen wurden weibliche Mais-Infloreszenzen der Linien *Tu1-A158* oder *W23M14* verwendet und wie bei [CACHARRÓN et al. 1999] fixiert. Maisgewebe-Schnitte (8 µm dick) wurde mit dem Mikrotom hergestellt und fortlaufende Schnittserien für die Hybridisierungen mit *ZMM19-sense*, *ZMM19-antisense* und Kontrollsonden eingesetzt. Die hybridisierten Schnitte wurden in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingebettet und mit dem Photomikroskop „Axiophot“ (Zeiss, Oberkochen) mit digitaler Kamera „SPOT 1.3.0“ (INTAS, Göttingen) fotografiert.

## 2.13 Nachweis der Expression von Allelen durch einen *Single-Nucleotide-Polymorphism*

Die Sequenzen der cDNAs des in *W23M14*-Wildtyp-Pflanzen gefundenen *ZMM19*-Allels und eines in *Tu1-A158*-Pflanzen gefundenen Allels unterscheiden sich an Position 243 stromab des Start-ATG (A = Position 1) in einem Nukleotid (*ZMM19*<sup>*W23M14*</sup>: T, *ZMM19*<sup>*Tu1-A158*</sup>: C) (T. MÜNSTER, persönliche Mitteilung); es handelt sich dabei um einen stillen Austausch, der keine Änderung der Proteinsequenz mit sich bringt. Dieser *Single-Nucleotide-Polymorphism* wurde ausgenutzt, um zwischen der Expression der beiden *ZMM19*-Allele zu unterscheiden. Es wurde eine PCR durchgeführt, die die Region von Position 148 bis 311 amplifizierte (Oligonukleotid-Startersequenzen pTM28 und pTM32 s. Anhang C.2). Vorlagen für die PCR waren cDNA-pools aus Wildtyp-Lieschblatt (*W23M14*), aus *Tu1*-Lieschblatt und -Kolben (*Tu1A158/+*). 50 µl-PCR-Ansatz enthielten: 1 µl cDNA-Pool, 0,1 mM je Oligonukleotid, 0,1 mM je NTP, 1x Roche-PCR-Puffer und 0,25 µl Taq-Polymerase (Roche, Mannheim). PCR-Zyklus: 2 Minuten 95 °C; 30 Sekunden 95 °C; 30 Sekunden 64 °C; 1 Minuten 72 °C; Schritt zwei bis vier 34 Mal wiederholen; 10 Minuten 72 °C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt und in beiden Richtungen sequenziert. Die sich ergebenden Fluoreszenzintensitätskurven der verschiedenen Sequenzen wurden ausgewertet.

## 2.14 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der „Automatischen DNA-Isolations- und Sequenzierereinheit“ (ADIS) des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung durchgeführt. Sequenzierungen wurden auf Sequenziergeräten „Abi Prism 377“ und „3700“ (Applied Bio-

systems, Weiterstadt) durchgeführt. Die photometrische Detektion erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten, zum Kettenabbruch führenden Nukleotiden, „*BigDye-terminator chemistry*“ (Applied Biosystems, Weiterstadt), während des Gel- bzw. Kapillarlaufs (Anregung mit Laserlicht).

## 2.15 Computeranalyse

Für die Erstellung von *Multiple-Sequence-Alignments* und deren Darstellung wurden die Programme `PileUp`, `Pretty` und `Prettybox` des GCG-Paketes (Genetics Computer Group, Madison, USA, <http://www.gcg.com/>) mit verschiedenen Parametern verwendet. Für Vergleiche einzelner Sequenzen wurden die Programme `Gap` und `BestFit` benutzt. Vorhersagen von Restriktionsschnittstellen und Aminosäuresequenzen wurden mit `Map` oder `MapSort` gemacht, Sequenzstücke wurden mit `Assemble` zusammengesetzt. Suchen nach ähnlichen Peptidsequenzen wurde mit dem Programm `NetBLAST` in nicht redundanten Teilen der verschiedenen Gen- und Peptidatenbanken (*GenBank* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Alle diese Programme stammen ebenfalls aus dem GCG-Paket. Stammbaumrekonstruktionen wurden nach der `neighbor-joining`-Methode wie bei [THEISSEN et al. 1996] angegeben erstellt. Öffentlich zugängliche Gensequenzen finden sich auf der *MADS-homepage* (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/mads/>).

Fluoreszenzintensitätskurven wurden mit dem Program `gnuplot` von T. WILLIAMS und C. KELLEY ausgedruckt.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Das MADS-Box-Gen *ZMM19* kartiert in der Nähe von *TUNICATE1*

Ziel dieser Arbeit war es, den Kandidatengen-Status des MADS-Box-Gens *ZMM19* für den *TUNICATE1*-Locus näher zu untersuchen.

Ausgangspunkt für die Untersuchungen war die Identifizierung von neuen Mais-MADS-Box-Genen am MPIZ (T. MÜNSTER, W. FAIGL und S. WERTH, persönliche Mitteilung). Vier dieser Gene, *ZMM19*, *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26*, bzw. deren putative Proteine, zeigten eine besonders hohe Sequenzähnlichkeit, wie im folgenden noch dargestellt wird. Für diese vermutlich nahe verwandten Gene wurde eine Bestimmung der chromosomalen Lokalisation durchgeführt. Sie wurden anhand von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) in Mais-*recombinant-inbred*-Linien [BURR und BURR 1991] kartiert (S. WERTH und B. BURR, persönliche Mitteilung). Die Gene befinden sich an folgenden Positionen auf der Karte des *Brookhaven National Laboratory* (BNL):

- *ZMM19* auf dem langen Arm von Chromosom 4 (ca. 4L 145)
- *ZMM20* auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (ca. 1S 53)
- *ZMM21* auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (ca. 9S 23)
- *ZMM26* auf dem langen Arm von Chromosom 5 (ca. 5L 215)

Die Lage der Gene auf den Mais-Chromosomen ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt.

Eine Überprüfung der chromosomalen Regionen der Gen-Loci ergab, dass in zwei Fällen ebenfalls in der Nähe ein Gen-Locus einer Entwicklungsmutanten zu finden ist. In der Nähe von *ZMM19*, welches zwischen RFLP-Marker *np192* und *np253B* kartiert, liegt auch der *TUNICATE1*-Locus, in etwa zwischen den Markern *bnl10.05* und *wsu(nia3)* [NEUFFER et al. 1997]. Ebenso wird in der Nähe von *ZMM26*, welches zwischen den Markern *umc68* und *wsu(nia5)* kartiert, der *HAIRY-SHEATH-FRAYED1*-

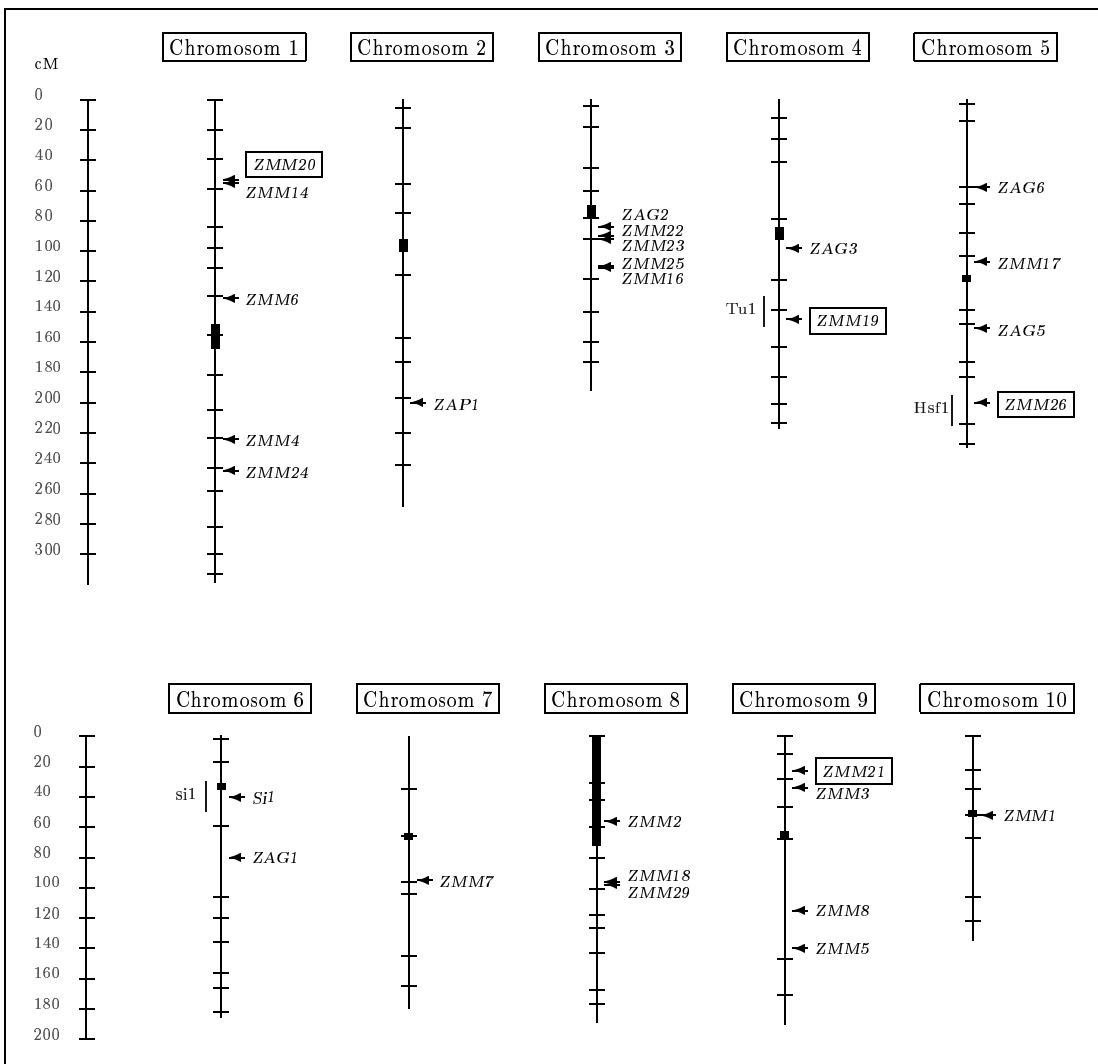


Abbildung 3.1: Chromosomale Lokalisation verschiedener MADS-Box-Gene und Entwicklungsmutanten von Mais. Die Zuordnung zu chromosomalen Orten basiert auf der Karte des *Brookhaven National Laboratory* (<http://burr.bio.bnl.gov/acemaz.html>). Die Gene sind rechts von den Chromosomen angegeben und sind ihren ungefähren chromosomalen Orten durch Pfeile zugeordnet. In dieser Arbeit näher charakterisierte Gene sind durch Kästchen gekennzeichnet. Die Informationen über die Gen-Loci der Entwicklungsmutanten stammen aus NEUFFER [1997]. Diese Loci sind auf der Karte durch dunkelgraue vertikale Striche links von den Chromosomen dargestellt. Dickere schwarze Boxen geben die ungefähren Orte der Centromeren an. Abkürzungen: cM = Centimorgan, si1 = *silky1*, Hsf1 = *Hairy-sheath-frayed1*, Tu1 = *Tunicate1*.

Locus gefunden. Da in dieser Region die Markerdichte gering ist, ist diese Kartierung allerdings ungenau.

Als MADS-Box-Gen kodieren *ZMM19* und *ZMM26* für putative Transkriptionsfaktoren. Ein solcher sollte bei einer Überexpression einen dominanten *gain-of-function*-

	ZMM19	ZMM20	ZMM21	ZMM26
ZMM19	-	58,2	73,1	93,9
ZMM20	68,2	-	52,5	57,8
ZMM21	82,1	62,8	-	70,8
ZMM26	94,7	67,4	80,7	-

Tabelle 3.1: Identität und Ähnlichkeit der Aminosäuren der vier neuen MADS-Domänen-Proteine aus Mais in Prozent. Die Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten wurden mit dem Programm `Gap` des GCG-Programm-Paketes ermittelt. Verwendete Parameter waren: *gap weighth* = 8, *gap length weight* = 2. Werte der Sequenzidentität sind oberhalb der Diagonalen und Werte der Sequenzähnlichkeit sind unterhalb der Diagonalen angegeben.

Phänotyp hervorrufen. Ein solcher Phänotyp wurde für die *Tunicate1*-Mutante beschrieben [MANGELSDORF und GALINAT 1964, POETHIG 1987]. Diese Tatsachen zusammen mit der interessanten chromosomalen Lokalisation ließen eine genauere Untersuchung von *ZMM19* sinnvoll erscheinen.

Auch *Hsf1* ist eine dominante Mutante [BIRD und NEUFFER 1985]. *Hsf1*-Pflanzen sind durch einen veränderten Blattphänotyp gekennzeichnet, es bilden sich blattscheidenartige Auswüchse an den Blattspreiten. Da *ZMM26* erst im Laufe der Charakterisierung von *ZMM19* entdeckt wurde, wurde es nicht eingehend untersucht. Die hier dargestellten Untersuchungen konzentrierten sich auf *ZMM19* als Kandidaten-Gen für *TU1*.

Um zu einer Entscheidung zu gelangen, ob der *Tunicate1*-Phänotyp durch eine Veränderung des genomischen Locus von *ZMM19* hervorgerufen wird, schied ein Transposon-tagging zur Beweisführung aus (s. Kapitel 4.2.1). Es mussten stattdessen andere verfügbare Informationsquellen ausgenutzt werden. So wurde die Expression von *ZMM19* im Wildtyp und in *Tu1*-Mutanten untersucht. In verschiedenen Studien wurden jedoch auch einzelne oder alle der nahe verwandten Gene von *ZMM19* eingeschlossen. Durch Charakterisierung auch dieser Gene sollten z. B. fundiertere Hinweise auf Wildtyp-Funktionen erhalten werden. Diese sollten helfen, die mögliche Rolle von *ZMM19* beim Zustandekommen des *Tunicate1*-Phänotyps zu verstehen. Außerdem wurden die Gene in einzelnen Experimenten als Kontrollen verwendet.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass Sequenzähnlichkeiten von 68% bis 95% zwischen den vier putativen Proteinen bestehen (s. Tabelle 3.1).

## 3.2 RNA-Gel-Blot-Untersuchungen in Wildtyp-Pflanzen

Um in einem ersten Ansatz zu untersuchen, in welchen Organen die vier Mais-Gene vorrangig exprimiert werden, wurde ihre Expression mittels RNA-Gel-Blot-Analyse untersucht. Die dafür verwendeten Pflanzenteile waren Blattspreite, Wurzel, Keimling, Lieschblatt (bestand nur aus Blattscheide), unreife Kolben, unreife Fahne und unreife Körner. Die ermittelten Expressionsmuster sind in Abb. 3.2 dargestellt.

Die Expression von *ZMM19* ist sehr stark im Lieschblatt, eine deutliche Expression ist aber auch in der Blattspreite nachzuweisen. In allen anderen Organen ist nur ein sehr geringes Expressionsniveau vorhanden (Abb. 3.2 und gleicher Blot mit längerer Exposition, nicht gezeigt). Das Expressionsmuster von *ZMM26* ist nicht wesentlich unterschiedlich von dem von *ZMM19*. Wegen der hohen Sequenzähnlichkeit beider Gene muss eine Kreuzhybridisierung der Sonden in Betracht gezogen werden. Für die RNA-Gel-Blot-Hybridisierungen wurden *antisense*-Sonden passend zur C-Region bzw. zur 3'-UTR verwendet, die Sequenzähnlichkeit in dieser Region beträgt 89%, was eine Kreuzhybridisierung vermuten lässt. In anderen RNA-Gel-Blot-Analysen unter denselben Bedingungen können aber deutliche quantitative Unterschiede zwischen der Expression von *ZMM19* und *ZMM26* nachgewiesen werden (s. Abb. 3.3). Das zeigt, dass die RNA-Gel-Blot-Bedingungen stringent genug sind, um wesentliche Expressionsunterschiede zwischen *ZMM19* und *ZMM26* nachzuweisen. Da die hier gefundenen Expressionsstärken nahezu identisch sind, kann geschlossen werden, dass beide Gene annähernd gleich exprimiert werden.

Das Expressionsmuster von *ZMM20* weist Unterschiede zu den beiden bisher beschriebenen auf. Neben einer starken Expression im Lieschblatt ist eine schwächere, aber deutliche Expression auch in Wurzel und Keimling nachzuweisen. Im Gegensatz zu *ZMM19* fehlt aber die Expression in der Blattspreite.

*ZMM21* schließlich wird in Blattspreite und Keimling etwa gleich stark exprimiert, aber nur sehr schwach im Lieschblatt und in anderen Organen überhaupt nicht.

Alle vier untersuchten Gene werden hauptsächlich in vegetativen Organen exprimiert. Sie werden nicht oder nur in geringem Maße in Infloreszenzen exprimiert. Eine Expression im Korn ist nur für *ZMM19* und *ZMM26* andeutungsweise nachweisbar. Alle Gene scheinen mit verschiedenen Spezifitäten in blattartigen Organen abgelesen zu werden, sie sind danach vermutlich an der Blattentwicklung beteiligt. Für drei der Gene findet sich die stärkste Expression im Lieschblatt, wo daher eine wichtige Funktion der Gene vermutet werden sollten. Eine deutliche Expression in der Wurzel findet sich nur für *ZMM20*.

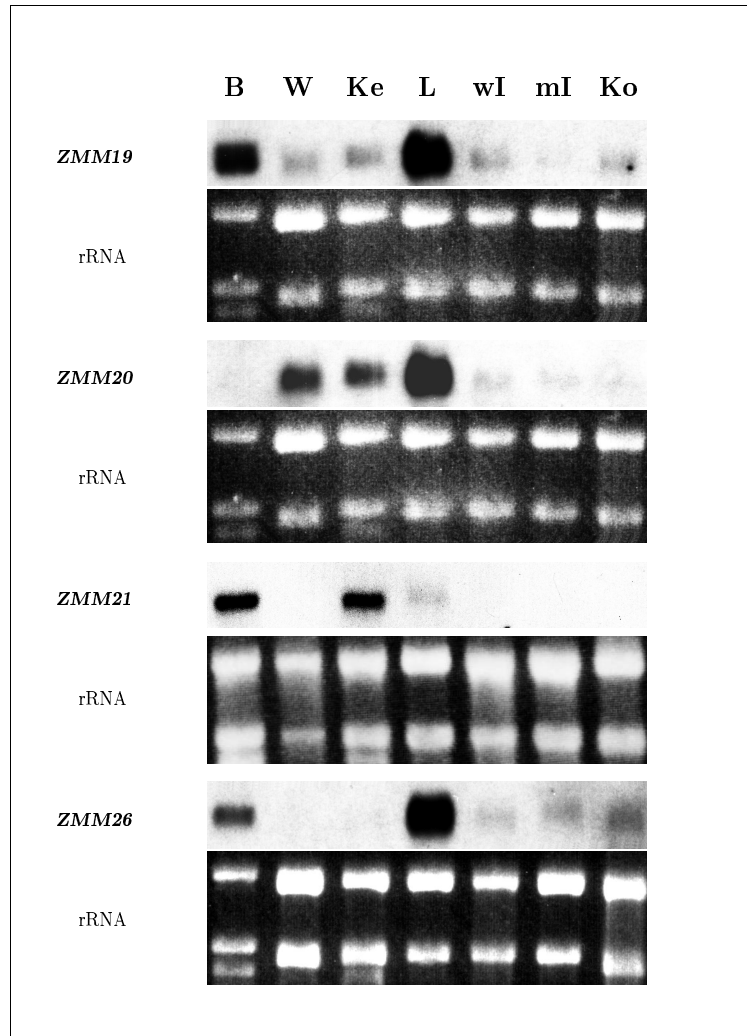


Abbildung 3.2: Expressionsmuster von *ZMM19*, *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26* in unterschiedlichen Maisgeweben. RNA-Gel-Blot-Analysen wurden mit Gesamt-RNA aus Blattspreite (B), Wurzel (W), Keimling (Ke), Lieschblatt (L), jungen weiblichen Infloreszenzen (wI), jungen männlichen Infloreszenzen (mI) und unreifen Körnern (Ko) durchgeführt. Als Sondenvorlagen wurden Teile der C-Region und die 3'-UTR der jeweiligen cDNAs verwendet (s. 2.11). Als Ladekontrolle sind die rRNA-haltigen Abschnitte der Ethidiumbromid gefärbten Gele gezeigt, die jeweils auf die oberhalb abgebildeten RNA-Gel-Blot-Membranen geblottet wurden. Für *ZMM19* und *ZMM20* wurde dieselbe Membran benutzt. Die ermittelten Transkriptlängen betragen 1,1 kb für *ZMM19*; 1,1 kb für *ZMM20*; 1,2 kb für *ZMM21* und 1,3 kb für *ZMM26*.



### 3.3 RNA-Gel-Blot-Untersuchung mit *Tu1*-Pflanzen

#### 3.3.1 Ektopische *ZMM19*-Expression in *Tu1-A158*-Pflanzen

Eine Expression von *ZMM19* wurde im Wildtyp hauptsächlich in vegetativen Organen gefunden. Es wurde ebenfalls die Expression in *Tunicate1*-Pflanzen untersucht. Diese sind durch starke Veränderungen im Kolben und geringere auch in der Fahne gekennzeichnet, zeigen ansonsten aber keine auffallenden phänotypischen Veränderungen. Es wurde daher angenommen, dass zumindest in den betroffenen Organen eine veränderte *ZMM19*-Expression gefunden werden sollte, wenn tatsächlich eine Veränderung des genomischen Locus von *ZMM19* ursächlich für den *Tu1*-Phänotyp ist.

Um mögliche Unterschiede zwischen wildtypischer *ZMM19*-Expression und der Expression in *Tu1*-Pflanzen optimal nachzuweisen, wurde eine Population von 30 Pflanzen untersucht, die sowohl Wildtyp- als auch *Tu1*-Pflanzen enthielt. Die Population ging aus einer Kreuzung einer heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanze mit einer Wildtyp-Pflanze (*W23M14*) hervor, d. h. die Nachkommen waren vom Genotyp entweder wiederum heterozygot *Tunicate1* (*Tu1/+*) oder homozygot Wildtyp (*+/+*). Die Pflanzen segregierte also für den *Tu1*-Phänotyp und wiesen ansonsten keine auffälligen Unterschiede auf. *Tu1*-Pflanzen konnten kurz nach Erscheinen der Fahne von wildtypischen Pflanzen unterschieden werden. Da mit der Vergrößerung der Spelzen, die oft erst im späteren Entwicklungsstadium sichtbar wird, auch eine Feminisierung der Fahne einhergeht, ließen sich die *Tunicate1*-Pflanzen durch Narbenfäden in der terminalen Infloreszenz leicht identifizieren. In diesem Stadium wurden Blattspreite, Lieschblätter, unreife Kolben und Fahne geerntet und RNA daraus isoliert.

Vergleicht man nun die mRNA-Expressionsmuster von *ZMM19* in wildtypischen und *Tu1-A158*-Pflanzen (s. Abb. 3.3) so stellt man ein ähnliches Expressionsniveau in Blattspreite und Lieschblatt in allen Pflanzen fest. Unterschiede im Expressionsniveau findet man dagegen in jungen Kolben und in der Fahne. Während die *Tu1-A158*-Pflanzen eine starke *ZMM19*-Expression im Kolben und eine schwächere auch in der Fahne zeigen, ist die Expression in diesen Organen der Wildtyp-Pflanzen, wie auch schon zuvor gefunden, sehr gering bzw. nicht nachweisbar. Die Expression von *ZMM19* in *Tu1-A158*-Pflanzen erfolgt also genau in den Organen ektopisch, in denen der *Tu1*-Phänotyp zu beobachten ist. Eine solche ektopische Expression konnte für 15 *Tu1-A158*-Pflanzen gezeigt werden, während 15 wildtypische Pflanzen keine solche Expression zeigten (nur Pflanzen 1-5 in Abb. 3.3 gezeigt). Das Expressionsniveau der ektopischen *ZMM19*-Expression ist positiv korreliert mit der Ausprägung des Phänotyps, d.h. in den stärker veränderten Maiskolben ist, im Vergleich mit den weniger stark veränderten Fahnen, eine höhere *ZMM19*-Expression vorhanden.

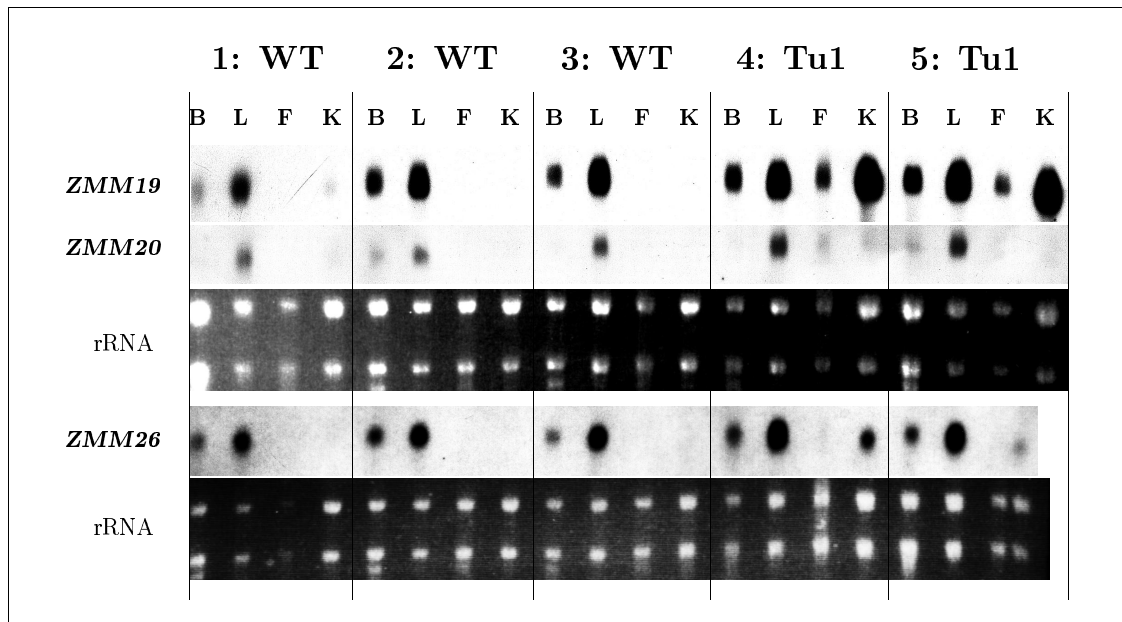


Abbildung 3.3: Expressionsmuster von *ZMM19*, *ZMM20*, und *ZMM26* in drei Wildtyp- und zwei *Tu1-A158*-Pflanzen. RNA-Gel-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA von Blattspreiten (B), Lieschblatt (L), Fahne kurz vor Pollenreife (F) und unreifen Kolben (K). Die RNA stammte aus verschiedenen Pflanzen einer segregierenden Population, die aus einer (*Tu1-A158/+* x *+/+*) Kreuzung hervorging. Die Nummer der Pflanze und der Phänotyp (*Tu1* oder WT) ist oberhalb der RNA-Gel-Blot-Spuren vermerkt. Weiteres wie Abb. 3.2.

Die ektopische *ZMM19*-Expression könnte entweder die direkte Ursache des *Tu1*-Phänotyps sein, oder es könnte die Folge einer durch andere Faktoren verursachten Initiierung eines Blattidentitäts-Programms sein, in dessen Rahmen eben auch *ZMM19* hochreguliert wird.

Es wurde daher die Expression der beiden anderen im Lieschblatt exprimierten Gene, *ZMM20* und *ZMM26*, untersucht (s. Abb. 3.3). Es wurden diese beiden Gene ausgewählt, da sie, aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit und des ähnlichen Expressionsmusters, wahrscheinlich Funktionen in den gleichen Entwicklungsprozessen wie *ZMM19* haben. Beruht der *Tu1*-Phänotyp also auf einer Mutation eines Regulatorgens auf einer höheren Ebene des putativen Gen-Netzwerkes, so sollte eine allgemeine Hochregulierung aller Blatt- oder Blattscheidenentwicklungsgene inklusive *ZMM19* beobachtet werden. Es sollte dann mit großer Wahrscheinlichkeit eine Hochregulierung aller drei MADS-Box-Gene beobachtet werden

Überprüft man daraufhin die Ergebnisse der RNA-Gel-Blot-Analyse, so findet man für *ZMM20* keine Abweichung der Expression in den untersuchten Organen der *Tu1-A158*-Pflanzen von der Wildtyp-Expression. Dieses Ergebnis deutet nicht auf eine allgemeine

Hochregulierung des Blatt- oder Blattscheiden-Entwicklungsprozesses hin, sondern auf eine spezifische *ZMM19* Beteiligung.

Im Gegensatz zu *ZMM20* zeigt *ZMM26* eine etwas erhöhte Expression in den Kolben der *Tu1-A158*-Pflanzen, allerdings in wesentlich geringerem Maße als *ZMM19*. Hier stellt sich allerdings die Frage, ob es sich um ein echtes *ZMM26*-Signal handelt, oder ob es sich nur um Kreuzhybridisierung wegen der großen Ähnlichkeit der Sonden handelt. Dieser zweite Fall ist wesentlich wahrscheinlicher, da das Hybridisierungssignal von *ZMM26* im Kolben – anders als das im Blatt und Lieschblatt – wesentlich geringer als das von *ZMM19* ist. Geht man von Kreuzhybridisierung aus, so ist keine Hochregulierung von *ZMM26* zu finden.

Die beobachtete ektopische Expression erscheint daher spezifisch für *ZMM19*. Die Ursache dieser Expression kann eine Mutation in *ZMM19* sein, dann sind *ZMM19* und *TU1* identisch. Es ist aber auch möglich, wenn auch unwahrscheinlich, dass die spezifische Hochregulierung von *ZMM19* durch ein unbekanntes Gen bzw. dessen Genprodukt verursacht wird, welches nur auf *ZMM19* wirkt, und nicht auf die anderen ähnlichen Gene. Dieses Gen müsste ebenfalls in der chromosomalen Region von *TU1* lokalisiert sein.

### **3.3.2 Verringerte ektopische *ZMM19*-Expression in schwächeren *Tu1*-Mutanten**

Neben der *Tu1-A158*-Linie gibt es noch mindestens drei *Tu1*-Linien, die aus *Tu1-A158* hervorgegangen sind, aber einen schwächeren Phänotyp haben. Diese Linien sind: *Tu1-l*, *Tu1-d* und *Tu1-md* [MANGELSDORF und GALINAT 1964]. Der Charakter dieser Linien ist nicht vollständig geklärt – es könnten schwächere Allele von *Tu1-A158* sein – genetische Analysen lassen jedoch auch die Deutung zu, dass es sich bei dem *TUNICATE1*-Locus um einen aus drei Komponenten zusammengesetzten Locus handelt. Die drei Komponenten sind dann *Tu1-l*, *Tu1-d* und *Tu1-m*, wobei die Komponente *Tu1-m* nie von *Tu1-d* getrennt werden konnte [MANGELSDORF und GALINAT 1964, MANGELSDORF 1974].

Von diesen drei Linien zeigte *Tu1-d* den schwächsten Phänotyp (s. Abb. 3.4). In *Tu1-d*-Kolben waren die Körner nur teilweise von Spelzen bedeckt, während in den anderen Linien die Spelzen mehrere Zentimeter lang wurden. Die Phänotypen von *Tu1-md*- und *Tu1-l*-Pflanzen waren unter Gewächshaus-Anzuchtbedingungen nicht voneinander unterscheidbar, sie waren aber schwächer als der Phänotyp von *Tu1-A158*. Das zeigte sich vor allem in der Fahne, die bei *Tu1-A158*-Pflanzen an der Basis lange Spelzen aufwies (s. Abb. 1.4). Diese Verlängerung der Spelzen in der männlichen Infloreszenz war in den schwächeren Linien kaum zu bemerken, außerdem wurde die Fahne zu einem deutlich geringeren Anteil feminisiert. Die Kolben waren in *Tu1-A158*-, *Tu1-md*- und



Abbildung 3.4: Kolben einer heterozygoten *Tu1-d*-Pflanze.

*Tu1-l*-Pflanzen stark verändert, d. h. es bildeten sich nicht nur längere Spelzen, sondern in den Spelzen bildeten sich häufig anstelle der Körner neue Infloreszenzen. Die so entstandenen Kolben hatten Verzweigungen wie die Fahne, die einzelnen Verzweigungen waren aber von Lieschblatt-ähnlichen Strukturen umgeben (s. Abb. 1.4). Die Kolben der *Tu1-l*- und *Tu1-md*-Pflanzen waren in der Regel kleiner als die der *Tu1-A158*-Pflanzen, zeigten sonst aber keine Unterschiede.

Es wurde die Expression von *ZMM19* in den Organen jeweils einer Pflanze der drei schwächeren *Tu1*-Linien ermittelt. Zum Vergleich wurde die Expression in einer *Tu1-A158*-Pflanze ebenfalls untersucht. Die gefundenen Expressionsmuster waren einander ähnlich. Zumindest für die *Tu1-l*- und *Tu1-md*-Pflanze ist eine ektopische Expression von *ZMM19* in den weiblichen Infloreszenzen nachzuweisen, während die Expression in Blattspreite und Lieschblatt nicht von der im Wildtyp abweicht (s. Abb. 3.5 und Vergleich mit Wildtyp in Abb. 3.3). Die Expressionsstärken in den weiblichen Infloreszenzen sind allerdings schwächer als die in den *Tu1-A158*-Pflanzen, eine Expression in der männlichen Infloreszenz ist in den *Tu1-l*- und *Tu1-md*-Pflanzen fast nicht nachweisbar. Für die *Tu1-d*-Pflanze ist eine nur sehr geringe ektopische *ZMM19*-Expression in der weiblichen Infloreszenz nachzuweisen und keine in der männlichen Infloreszenz.

Die Expressionstärken stimmen qualitativ mit den beobachteten abgeschwächten Phänotypen überein, d. h. die Expression von *ZMM19* im Kolben nimmt in der Reihenfolge: Wildtyp, *Tu1-d*, *Tu1-l* bzw. *Tu1-md* bis *Tu1-A158* zu, und in derselben Reihenfolge nimmt die Ausprägung der *Tunicate1*-typischen phänotypischen Effekte zu. Ebenso stimmen die nachgewiesenen *ZMM19*-Expressionstärken qualitativ mit den in den männlichen Infloreszenzen beobachteten phänotypischen Effekten überein.

Die Kontrollhybridisierung mit *ZMM20* zeigt keine Hochregulierung dieses Gens parallel zu *ZMM19* an.

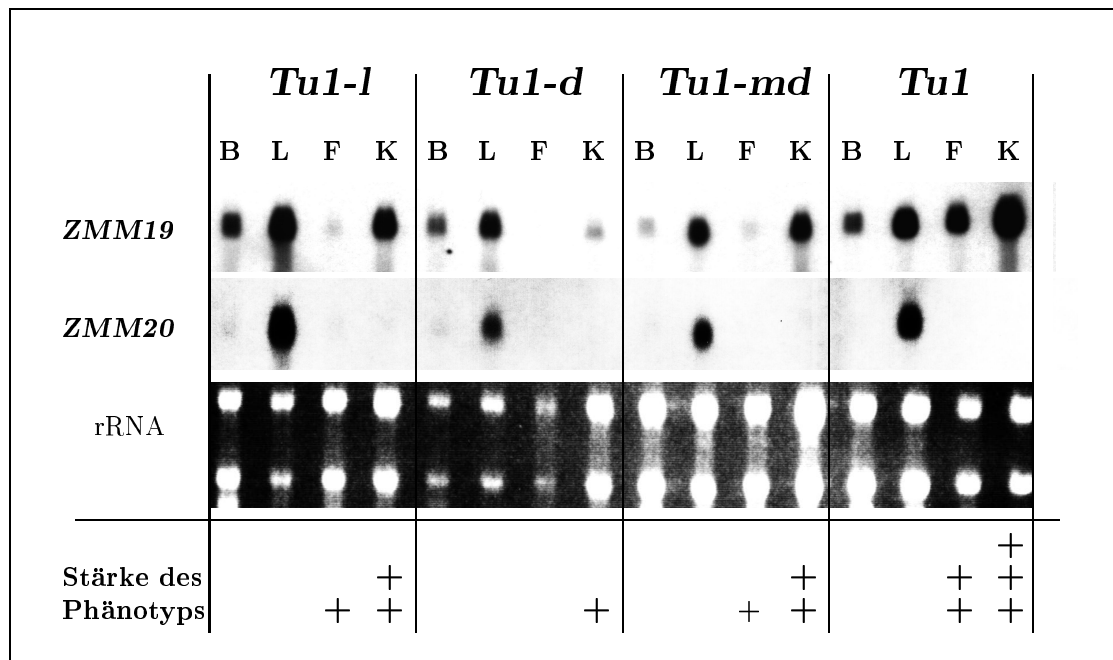


Abbildung 3.5: Expressionsmuster von *ZMM19* und *ZMM20* in *Tu1*-Linien mit verschieden stark ausgeprägten Phänotypen. Oben: RNA-Gel-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA von Blattspreiten (B), Lieschblattscheiden (L), Fahne kurz vor Pollenreife (F) und unreifen Kolben (K). Die RNA stammte aus verschiedenen *Tu1*-Linien. Der Name der jeweiligen Linie ist oberhalb der RNA-Gel-Blot-Spuren vermerkt (*Tu1-l*, *Tu1-d*, *Tu1-md*, *Tu1* = *Tu1-A158*). Die Pflanzen sind jeweils heterozygot. Weiteres wie Abb. 3.2. Unten: Bewertung der Ausprägung des veränderten Phänotyps, + = schwach, ++ = mittel, +++ = stark.

### 3.4 Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung von weiblichen *Tu1*-Infloreszenzen

Eine detaillierte Charakterisierung der morphologischen Veränderungen in *Tu1*-Pflanzen sollte eine Grundlage schaffen, um zu beurteilen, ob der *Tu1*-Phänotyp durch eine mögliche Aktion von *ZMM19*-Genprodukt in den Pflanzen erklärbar ist.

Um den Phänotyp der *Tu1-A158*-Pflanzen besser zu charakterisieren, wurde daher die Entwicklung weiblicher Infloreszenzen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert. Für die frühen Entwicklungsstadien, ausgehend von der Bildung der ersten Ährchenpaar-Primordien bis zum Beginn der Narbenfadenentwicklung in den Ährchen (d. h. Entwicklungsstadien A bis I [CHENG et al. 1983]), werden keine morphologischen Unterschiede gefunden (s. Abb. 3.6 A und B). Solche Unterschiede werden erst in der nachfolgenden Entwicklung sichtbar, d. h. ab Stadium J.

Die äußeren Hüllspelzen von *Tu1-A158*-Ährchen wachsen dann länger aus als die von Wildtyp-Ährchen und zeigen eine andere Zellstruktur an der abaxialen Oberfläche (vgl.

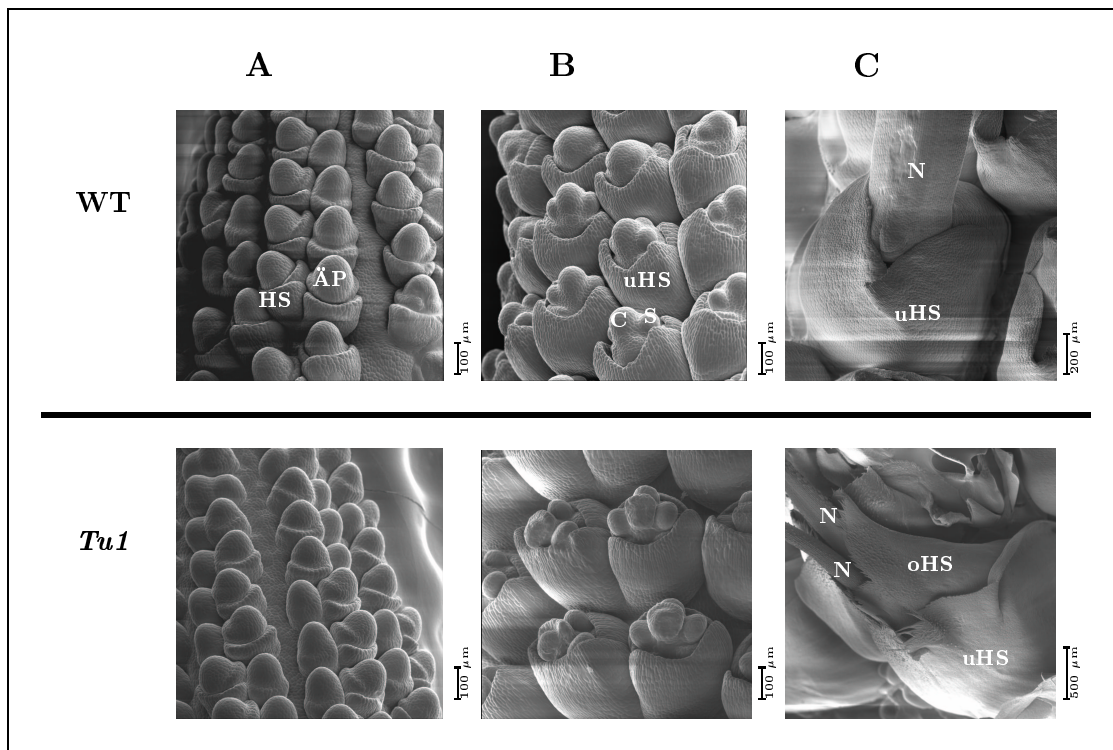


Abbildung 3.6: REM-Aufnahmen von weiblichen Ährchen aus Wildtyp-Pflanzen und aus heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien (obere bzw. untere Reihe im Bild). In **A** und **B** sind frühe Stadien der Ährchenentwicklung gezeigt. Es sind in diesen Stadien noch keine morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Tu1-A158*-Ährchen zu erkennen. In **A** sind die Hüllspelzenprimordien noch sehr klein. Sie wurden vom Ährchenprimordium gebildet und sitzen jetzt unterhalb und oberhalb des Primordiums (Entwicklungsstadium C nach CHENG [1983]). In **B** sind die Hüllspelzenprimordien größer. Sie verdecken große Teile der zwei Blütenanlagen jedes Ährchens. In den oberen Blütenprimordien sind jetzt alle reproduktiven Organe angelegt, die unteren Blüten (verdeckt) abortieren im Normalfall, ebenso wie die drei Stamina des oberen Blütchens (Entwicklungsstadium F-G nach CHENG [1983]). Die Karpelle des oberen Blütchens entwickeln sich weiter und bilden die Narbenfäden wie in **C** zu erkennen ist. Erst jetzt sind Unterschiede zwischen Wildtyp-Ährchen und *Tu1-A158*-Ährchen zu erkennen. Die Hüllspelzen sind bei den *Tu1-A158*-Ährchen länger, haben mehr Trichome an den Rändern und besitzen eine andere abaxialen Zellstruktur als die Wildtyp-Ährchen (Entwicklungsstadium J-K nach CHENG [1983]). Abkürzungen: HS = Hüllspelzenanlage, uHS = untere HS, oHS = obere HS, C = Karpellanlage, S = Stamenanlage, N = Narbenfaden.

Abb. 3.6 C). Außerdem bilden sich in manchen *Tu1-A158*-Ährchen zwei Narbenfäden (s. Abb. 3.6 C), was auf eine fehlende Unterdrückung des unteren Blütchens zurückzuführen ist. Die Entwicklung des unteren Blütchens in *Tu1*-Pflanzen ist, ebenso wie die Feminisierung der Fahne (Unterdrückung der Karpell-Abortion), abhängig von der Maislinie und den Anzuchtbedingungen. Da eine fehlende Unterdrückung der Entwicklung des unteren Blütchens auch für andere Mais-Mutanten beschrieben wird, z. B. in *Country Gentleman*

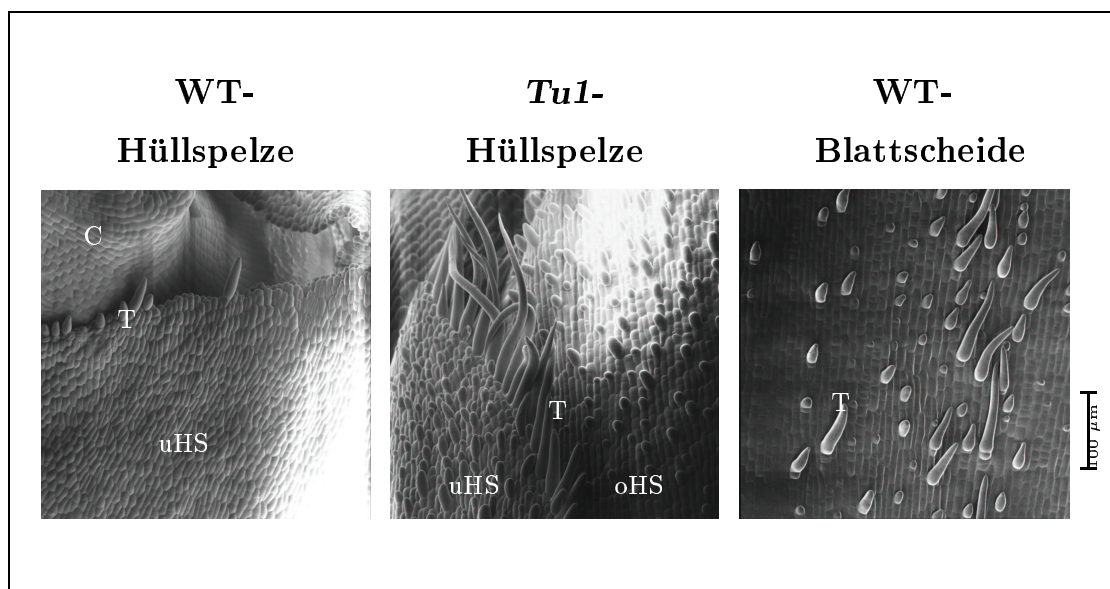


Abbildung 3.7: REM-Aufnahmen von abaxialen Oberflächen von Hüllspelzen eines Wildtyp-Ährchens und eines Ährchens aus einer heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanze (Entwicklungsstadium wie in Abb. 3.6 C) und von der abaxialen Oberfläche einer jungen Lieschblattscheide. An der Oberfläche der *Tu1-A158*-Hüllspelzen sind Blatthaaranlagen zu entdecken, wie auch an der Lieschblattscheiden-Oberfläche. Die Wildtyp-Hüllspelze besitzt nur an den Spelzenrändern einzellige Blatthaaranlagen. Abkürzungen: HS = Hüllspelze, oHS = obere Hüllspelze, uHS = untere Hüllspelze, C = Karpell, T = Trichomanlage (Blatthaaranlage).

[NEUFFER et al. 1997], wurden die weiteren Untersuchungen auf die spezifischere Veränderung, die veränderte Morphologie der Hüllspelzen in *Tu1*-Pflanzen, beschränkt.

Untersuchungen an abaxialen Oberflächen junger Hüllspelzen aus *Tu1-A158*-Pflanzen zeigen die Anlagen vieler Blatthaare, welche auf der Spelzenoberfläche verteilt sind. Solche Trichomanlagen sind in den Wildtyp-Hüllspelzen nur an den Rändern der Spelzen zu finden (s. Abb. 3.7). Eine ähnlich Trichom-reiche abaxiale Oberfläche findet sich an Blattscheiden (s. Abb. 3.7); die *Tu1-A158*-Hüllspelzen zeigen also, was die Bildung von Blatthaaren angeht, Ähnlichkeiten zu Blattscheiden. Dies wurde auch schon von GALINAT [1957] festgestellt, der entdeckte, dass *Tu1*-Hüllspelzen Blatthaare und Spaltöffnungen an sowohl adaxialen als auch abaxialen Oberfläche tragen, keine verholzten Zellen besitzen und eine blattartige Nervatur haben. Alle diese Merkmale sind in Mais charakteristisch für Blätter und finden sich nicht in Hüllspelzen. Die Bildung von großen Mengen an Blatthaaren auch an abaxialen Oberflächen ist insbesondere charakteristisch für Blattscheiden und wird in Blattspreiten kaum beobachtet [GALINAT 1957].

Durch die REM-Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass der spezifische *Tu1*-

Phänotyp in einer Verlängerung der Hüllspelzen in den weiblichen Infloreszenzen besteht. Es wurde eine Veränderung ihrer morphologischen Charakteristik von Hüllspelzen-Identität zu Blatt-Identität beobachtet, wobei insbesondere blattscheidenartige Merkmale zu finden sind.

### **3.5 *In situ*-Hybridisierung mit Wildtyp- und *Tu1*-Pflanzen**

Bei MADS-Box-Genen aus Pflanzen stimmt im allgemeinen der Expressionsort mit dem Funktionsort überein. Durch die RNA-Gel-Blot-Analyse wurden einige Expressionsorte von *ZMM19* im Wildtyp, wie Lieschblatt und Blatt, herausgefunden. Um genauere Ideen über die Funktion von *ZMM19* zu erhalten, sowohl im Wildtyp als auch in *Tu1-A158*-Pflanzen, sollten die Expressionsorte mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung besser eingegrenzt werden.

Zum Vergleich zwischen Wildtyp- und *Tunicate1*-Pflanzen wurden erste Untersuchungen an Schnitten durch junge weibliche Infloreszenzen beider Pflanzentypen gemacht (s. Abb. 3.8 A und B). In weiblichen Infloreszenzen aus Wildtyp-Pflanzen ist, außer in den umgebenden Lieschblättern, keine wesentliche *ZMM19*-Expression (violette Färbung) zu entdecken. Die Expression in den Lieschblättern ist innerhalb des Gewebes nicht räumlich differenziert.

In weiblichen Infloreszenzen aus *Tu1-A158*-Pflanzen liegt ein hohes *ZMM19*-Expressionsniveau vor, angezeigt durch die starke violette Anfärbung (s. Abb. 3.8 C und D). Das *in situ*-Signal ist über alle Bereiche der weibliche Infloreszenz verteilt, jedoch ist die Verteilung nicht gleichmäßig. Das entdeckte Expressionsmuster lässt sich nicht offensichtlichen Strukturen, wie z. B. Hüllspelzen-Primordien, zuordnen.

Es wurde erhofft, durch Vergleichshybridisierungen mit Sonden von Markergenen das *ZMM19*-Expressionsmuster in *Tu1-A158*-Infloreszenzen besser verstehen zu können. Dafür wurden Sonden der Gene *KN1*, welches besonders in Meristemen transkribiert wird, und *GAPDH*, welches besonders in stoffwechselaktiven Zellen transkribiert wird, verwendet. Vergleiche der gefundenen Expressionsmuster in jungen Stadien der Ährchenbildung (Abb. 3.9, Bildreihe A) lassen vermuten, dass die *KN1*-Expression die Expression von *ZMM19* verhindert. Die *KN1*-Expression ist im gesamten Zentrum der Ährchenprimordien, wo sich das Meristem befindet, lokalisiert. *ZMM19* dagegen, wird am äußeren Rande des Primordiums exprimiert. Die Vergleichshybridisierung mit einer *GAPDH*-Sonde, zeigt eine starke, räumlich nicht differenzierte Expression im gesamten Primordium an. Hieraus kann geschlossen werden, dass innerhalb des Primordiums noch



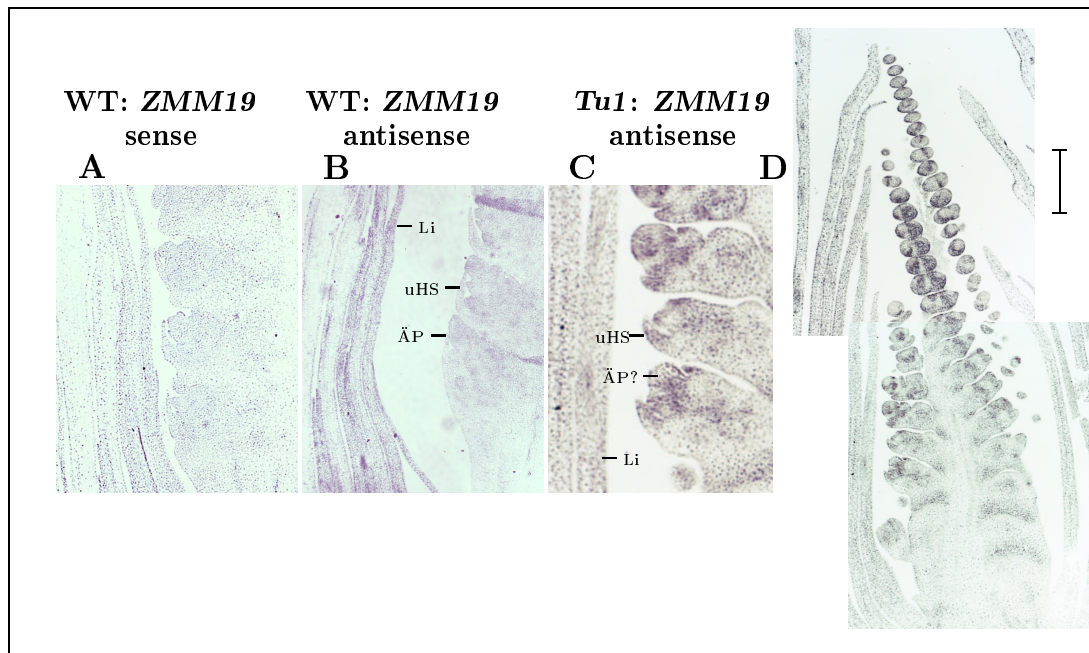


Abbildung 3.8: *In situ*-Hybridisierung an Längsschnitten durch weibliche Infloreszenzen von Wildtyp- und *Tu1-A158*-Pflanzen mit Digoxigenin-markierten *ZMM19*-RNA-Sonden, in *antisense*- oder in *sense*-Orientierung (Details s. 2.12): Wildtyp *sense* **A**, Wildtyp *antisense* **B**, *Tu1-A158 antisense* **C** und **D**. Violette Färbungen zeigen Expression an. Der Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$  für Bilder A-C und 800  $\mu\text{m}$  für Bild D. Abkürzungen: Li = Lieschblatt, ÄP = Ährchenprimordium, uHS = untere Hüllspelze.

wenig räumliche Differenzierung besteht und die *ZMM19*-Expression nicht dadurch beschränkt wird.

In etwas älteren Primordien (Abb. 3.9, Bildreihe B) nimmt die *KN1*-Expression mit zunehmender Organdifferenzierung ab, während die *ZMM19*-Expression sich räumlich ausdehnt. In dem dritten gezeigten Stadium (Abb. 3.9, Bildreihe C), das in der Organdifferenzierungsphase liegt, ist keine *KN1*-Expression mehr nachweisbar und die *ZMM19*-Expression erstreckt sich über das ganze Ährchenprimordium. In den Primordien ist die *ZMM19*-Expression nicht gleichmäßig. Sie folgt einem komplexen Muster, zu dessen Erklärung weitere Untersuchungen erforderlich sind.

Die *in situ*-Hybridisierung konnte keinen wesentlichen Beitrag leisten, die Funktion von *ZMM19* zu erhellen. Es wurden die RNA-Gel-Blot-Untersuchungen insofern bestätigt als eine Expression von *ZMM19* in jungen Lieschblättern nachgewiesen werden konnte. Ein Gewebespezifität von *ZMM19* innerhalb der Lieschblätter ließ sich nicht zeigen. Die Untersuchungen von *Tu1-A158*-Kolben bestätigte ebenfalls die RNA-Gel-Blot-Untersuchungen, indem ebenfalls die ektopische Expression von *ZMM19* nachgewiesen werden konnte. Die *ZMM19*-Expression wurde in der ganzen Infloreszenz gefunden.

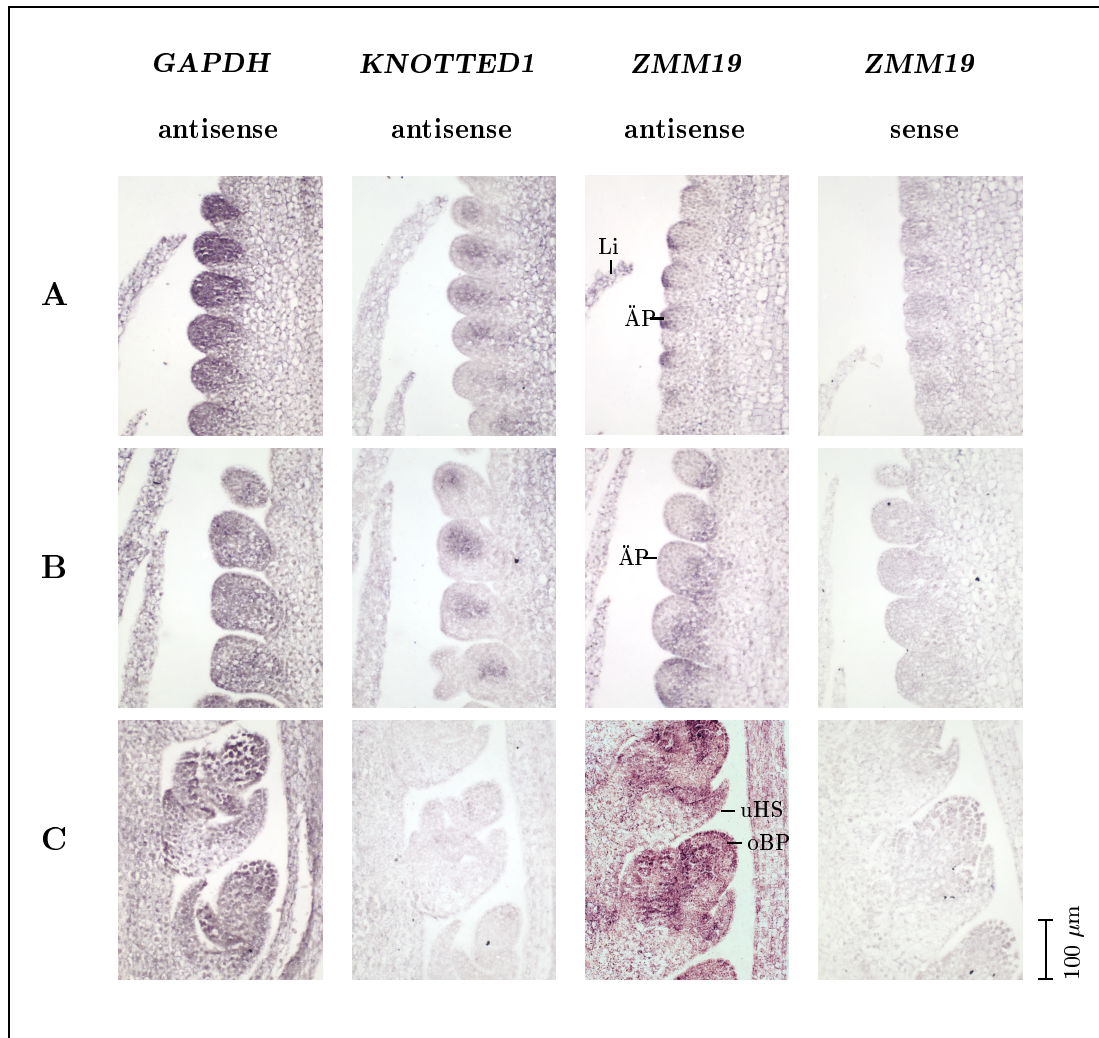


Abbildung 3.9: *In situ*-Hybridisierungen auf Längsschnitten durch Ährchenprimordien in weiblichen Infloreszenzen von *Tu1-A158*-Pflanzen. Als Sonden wurde Digoxigenin-markierte *GAPDH*-antisense-RNA, *KN1*-antisense-RNA, *ZMM19*-antisense-RNA oder -sense-RNA verwendet. Jede Zeile beinhaltet Material gleichen Entwicklungsstadiums. **A**: Ährchenprimordien werden angelegt (entspricht Stadium A nach CHENG [1983]), **B**: Ährchenprimordien beginnen mit Bildung von Organprimordien (entspricht Stadium B bis C nach CHENG), **C**: Ährchenprimordien besitzen Hüllspelzen-Primordien, obere und untere Blütenprimordien bilden sich (entspricht Stadium D bis E nach CHENG). Die Gennamen und Sondenorientierungen beziehen sich auf die darunterliegenden Spalten. Violette Färbungen zeigen Expression an. Der Maßstabsbalken rechts entspricht 100  $\mu$ m. Abkürzungen: Li = Lieschblatt, ÄP = Ährchenprimordium, uHS = untere Hüllspelze, oBP = oberes Blütenprimordium.

Das gefundene räumliche Expressionsmuster konnte keinen Infloreszenz-Strukturen, wie z. B. den Anlagen der Hüllspelzen, zugeordnet werden. Allerdings findet die *ZMM19*-Expression in jungen Stadien nicht an den Orten statt, an denen *KN1* exprimiert wird. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Gen eher für laterale Organe spezifisch ist.

### **3.6 PCR-Nachweis einer veränderten *ZMM19*-Promotor-Region in *Tunicate*-Pflanzen unterschiedlicher Herkunft**

Um den Nachweis zu führen, dass eine genetische Veränderung in einem Locus ursächlich für einen mutanten Phänotyp ist, ist eine zweite unabhängige Mutation in denselben Locus mit ähnlichem mutantern Phänotyp sehr hilfreich. Durch Sequenzierung großer Teile des uns vorliegenden *ZMM19<sup>Tu1-158</sup>*-Allels (W. DELEU, T. MÜNSTER, W. FAIGL UND S. WERTH, persönliche Mitteilung) konnte als mögliche ursächliche Mutation eine Insertion eines Fragmentes eines MuDR-ähnlichen Elementes in die putative Promotor-Region des *ZMM19*-Locus ermittelt werden (s. Kapitel 4.1.5). Mit zwei diagnostischen Oligonukleotiden (s. Anhang C.2), die zum einen in der 5'-untranslatierten Region des *ZMM19*-Gens (Position -215) und zum anderen in der inserierten Sequenz im putativen *ZMM19*-Promotor (Position -1063) oberhalb des Translationsstarts (ATG = 1) banden, konnte zwischen Wildtyp-Allel und dem *ZMM19<sup>Tu1-158</sup>*-Allel unterschieden werden. In dieser diagnostischen *Tu1-A158*-PCR wurde nur dann mit genomischer DNA ein PCR-Fragment erhalten, wenn die MuDR-ähnliche Insertion oberhalb des Translationsstarts vorhanden war.

Mit einer solchen PCR und einer Kontroll-PCR mit Oligonukleotiden, die auf das *ZMM19<sup>W23M14</sup>*-Allel passten, wurden *Tunicate*-Linien aus verschiedenen Quellen untersucht, um möglicherweise ein unabhängiges *ZMM19<sup>Tu1</sup>*-Allel zu entdecken. Folgende Linien wurden untersucht: *Tu1-A158*, *Tu1-l*, *Tu1-d*, *Tu1-md*, *Tu\*5090B*, *TUNICA9*, *CRCHIH*, *ZEA41*, *ZEA48*, *Cornell1*, *Cornell2*, *Cornell3*, *Cornell4* und *TuMPIZ1*.

Die Linien *Tu1-l*, *Tu1-d* und *Tu1-md* sind aus *Tu1-A158* hervorgegangen [MANGELSDORF und GALINAT 1964], zeigen aber einen schwächeren Phänotyp. Es ist daher zu vermuten, dass weitere Mutationen in *TU1* zu einer Abschwächung des Phänotyps geführt haben. Welcher Art diese Mutationen sind, ist allerdings unklar. Es gibt Hinweise aus Kreuzungen dieser Linien, dass in *Tu1-A158* ein Genlocus dupliziert oder sogar verdreifacht in enger Nachbarschaft vorliegt und so einen „zusammengesetzten Locus“ bildet [MANGELSDORF und GALINAT 1964]. Es wurde daher vermutet, dass die abgeschwächten Phänotypen auf den Verlust einer der „Komponenten“ des „zusammengesetzten Locus“ zurückzuführen sind. Die in der

putativen Promotor-Region von *ZMM19<sup>Tu1-158</sup>* gefundene Insertion ließ aber auch andere Deutungen dieser schwächeren Linien zu. Von diesen schwächeren Linien wurde jeweils eine phänotypisch mutante Pflanze untersucht.

*Tu\*5090B* stammt, wie die vorher genannten Linien, aus dem *Maize Genetic Stock Center*. Für diese Linie war nicht bekannt, ob der mutante Genlocus allelisch zu *TU1* ist. Von dieser Linie wurden 10 Pflanzen angezogen, von denen 5 Pflanzen einen *Tuncate*-Phänotyp zeigten.

Die Linien *TUNICA9* und *CRCHIH* stammen aus Sammlungen von Samen durch E. HERNANDEZ-XOLOCOTZI (1968 in Durango und 1975 in Chihuahua, beides in Mexico). Beide Sammlungen stellten sich bei der Anzucht als heterogen heraus, was u.a. an unterschiedlichen Färbung der Narbenfäden und der Körner festgemacht werden konnte. Es wurden von jeder Sammlung 10 Pflanzen untersucht, wobei im Fall von *TUNICA9* 6 Pflanzen mit *Tuncate*-Phänotyp und im Fall von *CRCHIH* nur eine Pflanze mit *Tuncate*-Phänotyp auftraten.

Die Linien *Cornell1* - *Cornell4* stammen aus der Cornell University, wo die Maiskolben mit verlängerten Spelzen als Anschauungsmaterial dienten. Sie sind unbekannter Herkunft. Da die gefundenen Körner nicht mehr keimfähig waren, wurde aus ihnen direkt DNA extrahiert und für die PCR eingesetzt. Dieser Ansatz war nur für die Linien *Cornell1* und *Cornell4* erfolgreich.

Die Linien *IPK-40* und *IPK-41* stammen aus der Samenbank des IPK in Gatersleben, wohin sie 1948 über den botanischen Garten aus Budapest bzw. aus Debrecen gelangt sind. Es wurden jeweils 10 Pflanzen angezogen von denen 6 respektive 5 Pflanzen einen *Tuncate*-Phänotyp zeigten.

Die Linie *MPIZ1* stammte aus dem MPIZ; der Kolben diente als Ausstellungsobjekt; seine Herkunft ist unbekannt. Es wurden 5 Pflanzen angezogen, von denen 3 den *Tuncate*-Phänotyp zeigten.

Mit genomischer DNA aus allen untersuchten Pflanzen, d. h. mit 60 Pflanzen, wurde die diagnostische PCR durchgeführt. Für alle phänotypisch veränderten Pflanzen, d. h. mit 31 Pflanzen, wurde in der diagnostischen PCR ein PCR-Fragment von gleicher Größe erzielt (etwa 850 bp) wie mit *Tu1-A158* genomischer DNA. Bei der PCR mit genomischer DNA aus den wildtypischen Pflanzen trat dieses Fragment nie auf, während in der Kontroll-PCR jeweils ein wildtypisches Fragment erhalten wurde.

Jeweils ein PCR-Fragment jeder Linie wurde sequenziert, wobei die erhaltenen Sequenzen eine sehr hohe Ähnlichkeit untereinander aufwiesen (s. Anhang D.3). Die PCR-Fragmente konnten allerdings nicht durchgängig sequenziert werden. Ein Vergleich mit der bekannten putativen Promotor-Region des *ZMM19<sup>Tu1-158</sup>*-Allels ergab, dass von der Position -395 an, wenn stromauf sequenziert wurde, oder von Position -404 an, wenn

stromab sequenziert wurde, die ermittelte Sequenz abrupt unlesbar war. Das plötzliche Abbrechen der ansonsten recht eindeutigen Sequenz ließ darauf schließen, dass ab den Abbruchstellen zwei verschiedene Sequenzen vorlagen. Da aber die Sequenzierungen aus beiden Richtungen bis zu den entsprechenden Stellen eindeutige Sequenzen ergaben, kann geschlossen werden, dass zwei nahezu identische genomische Sequenzen existieren, die sich nur durch eine Deletion von vermutlich 9 bp unterscheiden. Dies lässt vermuten, dass eine Duplikation zumindest dieser Region auf genomischer Ebene vorhanden ist. Möglicherweise ist aber auch der komplette veränderte Locus dupliziert. Die Duplikation zumindest der untersuchten Sequenz ist aber in allen untersuchten Linien vorhanden und nicht nur in *ZMM19<sup>Tu1-158</sup>*. Eine Klonierung der PCR-Fragmente zur genauen Aufschlüsselung der duplizierten Sequenzen muss noch unternommen werden.

Es wurde in allen 12 untersuchten *Tunicate*-Linien nahezu die gleiche putative Promotor-Region wie im sequenzierten *ZMM19<sup>Tu1-158</sup>*-Allel gefunden. Der Abbruch der Sequenzähnlichkeit zu der in einer wildtypischen Pflanze gefundenen Sequenz liegt in allen Sequenzen an derselben Position. Die veränderte Region wurde nie in den wildtypischen Pflanzen gefunden. Es ist daher zu vermuten, dass alle diese Linien auf das gleiche Mutationsereignis zurückzuführen sind. Möglich ist ebenfalls, dass die beobachtete Korrelation zwischen veränderter Promotor-Region und Phänotyp rein zufällig ist, dagegen spricht aber die Zahl der beobachteten Übereinstimmungen. Es ist eher anzunehmen, dass die auftretende Veränderung mit dem *TU1*-Locus gekoppelt ist. Das bedeutet, dass die beiden Loci entweder nahe beieinander liegen oder identisch sind. Diese Frage kann durch eine Erhöhung der Zahl der untersuchten Pflanzen geprüft werden. Es darf bei einem solchen Test keine Pflanze auftreten, die den *Tu1*-Phänotyp zeigt, aber keine Mutation in *ZMM19* aufweist, wenn gezeigt werden soll, dass die Loci identisch sind.

Ein eindeutiger Beweis durch ein unabhängiges *ZMM19*-Allel, welches ebenfalls den *Tu1*-Phänotyp hervorruft, konnte aus Mangel an solchen Allelen nicht erbracht werden.

### **3.7 Nachweis der unterschiedlichen Expression von *ZMM19*-Allelen in heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanzen durch einen *Single-Nukleotide-Polymorphism***

Das wildtypische *ZMM19<sup>W23M14</sup>*-Allel und das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel unterscheiden sich in ihrer kodierenden Region in einem Basenpaar 243 bp stromabwärts vom Translationsstart (T. MÜNSTER, persönliche Mitteilung). Anhand dieses *Single-Nucleotide-*

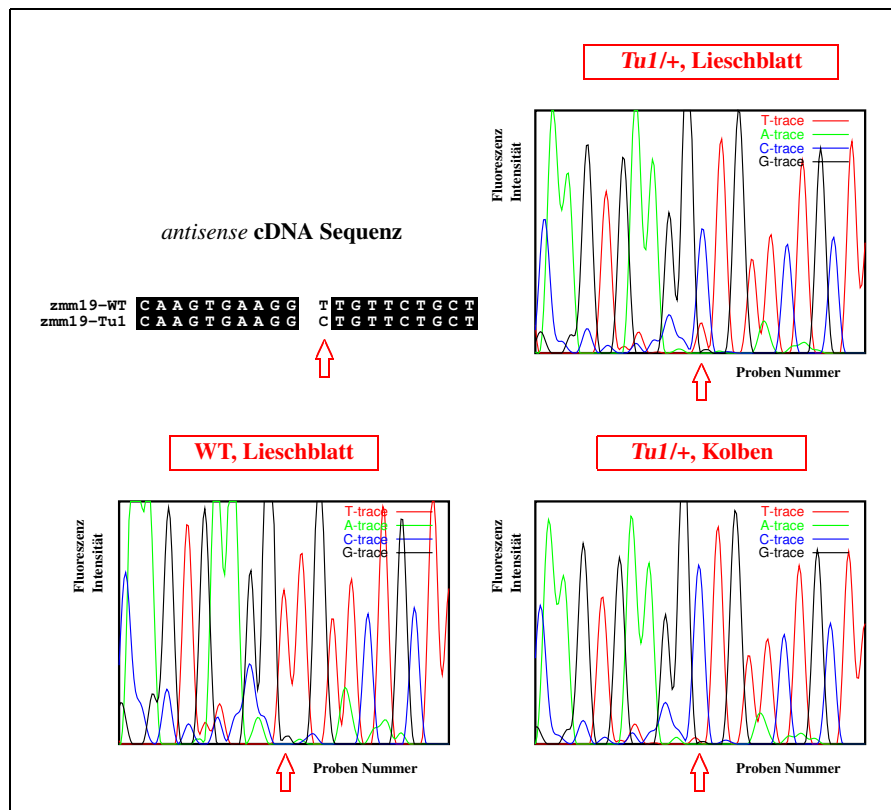


Abbildung 3.10: Unterschiedliche Expression zweier *ZMM19*-Allele in Wildtyp- und heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanzen. Die gezeigten Fluoreszenzintensitätskurven sind das Ergebnis der Sequenzierung des Antisense-Strangs von *ZMM19*-spezifischen PCR-Fragmenten, die auf unterschiedlichen cDNA-Pools amplifiziert wurden. Die für die Herstellung der cDNA verwendeten Pflanzen bzw. Organe sind oberhalb der Kurven angegeben (Wildtyp-Lieschblatt, (*Tu1-A158/+*)-Lieschblatt und (*Tu1-A158/+*)-Kolben). Die drei Kurven unterscheiden sich im wesentlichen nur in der T- bzw. C-Fluoreszenzintensitätskurve an der mit Pfeil gekennzeichneten Position. Die zu den Fluoreszenzintensitätskurven zugehörigen antisense cDNA-Sequenzen sind links oben angegeben, die Position des SNP ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

*Polymorphism* (SNP) können die beiden Allele unterschieden werden. Dies wurde ausgenutzt, um zu untersuchen, welches der beiden Allele in einer heterozygoten *Tu1-A158*-Pflanzen exprimiert wird. Insbesondere war natürlich die ektopische Expression von *ZMM19* in *Tu1-A158*-Kolben von Interesse, aber es wurde ebenfalls die Expression in Lieschblättern von wildtypischen und *Tu1-A158*-Pflanzen untersucht.

Für diese Untersuchung wurde RNA aus Lieschblättern wildtypischer Pflanzen und aus Lieschblättern und Kolben heterozygoter *Tu1-A158*-Pflanzen gewonnen, daraus cDNA hergestellt, und schließlich wurde mit PCR eine Region um den SNP herum, jeweils aus jedem cDNA-Pool, amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden sequenziert und die erhaltenen Fluoreszenzintensitäts-Kurven miteinander verglichen (s. Abb. 3.10).

In den Lieschblättern von *W23M14*-Pflanzen war wie für homozygote Pflanzen erwartet, anhand des SNPs nur die Expression des *ZMM19<sup>W23M14</sup>*-Allels nachzuweisen.

In Lieschblättern der *Tu1-A158*-Pflanze wurden dagegen zwei Allele exprimiert, das *ZMM19<sup>W23M14</sup>*-Allel und das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel. Die Expression beider Allele erfolgte nicht im gleichen Ausmaß, d. h. die Fluoreszenzintensitätskurven im fraglichen Bereich haben unterschiedlich hohe Maxima, wobei die des *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allels höher war. Ein solches Phänomen der ungleichen Expression wird auch von anderen Studien an heterozygoten Pflanzen berichtet, ohne dass die Ursache dafür geklärt wäre.

Im Kolben der *Tu1-A158*-Pflanze, wo also *ZMM19* ektopisch exprimiert wurde, ist praktisch nur ein Allel, das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel, nachzuweisen. Eine Expression des Wildtyp-Allels kann nicht nachgewiesen werden.

Die RNA-Blot-Untersuchungen haben gezeigt, dass nur *ZMM19* ektopisch in den *Tunicate1*-Maiskolben exprimiert wird, nicht aber die nahe verwandten Gene *ZMM20* und *ZMM26*. Es konnte nun zusätzlich gezeigt werden, dass die ektopische Expression spezifisch nur ein Allel betrifft, nämlich das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel, welches die veränderte putative Promotor-Region aufweist.

Eine Erklärung dieses Ergebnisses ist, dass die gefundene Veränderung im *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel die Ursache für die ektopische Expression von *ZMM19* ist, welche daraufhin den veränderten Phänotyp verursacht. Das würde bedeuten, dass *ZMM19* identisch mit *TUNICATE1* ist.

Es gibt noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit. Die ektopische Expression des *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel könnte dadurch hervorgerufen sein, dass ein unbekannter Transkriptionsfaktor, welcher in *Tu1*-Pflanzen verändert vorliegt, dann spezifisch die veränderte Promotor-Region erkennt und die Transkription von *ZMM19* initiiert. Das den Faktor kodierende Gen muss ebenfalls in der *TU1*-Region kartieren. Letztere Erklärung erscheint sehr unwahrscheinlich. Die wahrscheinlichere Erklärung der gefundenen Ergebnisse ist, dass eine Veränderung im *ZMM19*-Locus die Ursache für die ektopische Expression ist.

### 3.8 Sequenzvergleich und phylogenetische Analysen

Da die *ZMM19*-Expressionsstudien nur wenig Information über die Funktion des Gens geben konnten, wurden nahe verwandte Gene identifiziert. Von der Zuordnung von *ZMM19* in eine Subfamilie ließ sich einiger Aufschluss über die Funktion erhoffen.

Die Familie der MADS-Domänen-Proteine aus Pflanzen, d. h. vorrangig die MIKC-Typ-Proteine [MÜNSTER et al. 1997], zu denen auch *ZMM19* gehört, sind insbesondere in der MADS-Domäne konserviert. In vergleichenden Untersuchungen, die mit dieser Genfamilie durchgeführt wurden, z. B. [THEISSEN et al. 1996, MÜNSTER et al. 1997,

RIECHMANN und MEYEROWITZ 1997], hat sich gezeigt, dass nah verwandte Proteine, die in gleiche Subkladen eines phylogenetischen Baumes fallen, oft gleiche oder ähnliche Funktionen erfüllen. So werden z. B. Teile der B-Funktion in der Blütenentwicklung von *AP3* in *Arabidopsis thaliana*, von *DEFICIENS* in *Antirrhinum majus* und von *SILKY1* in *Zea mays* [THEISSEN et al. 2000, AMBROSE et al. 2000] zur Verfügung gestellt. Diese Proteine gehören der gleichen Subklade an.

Ebenso kann auch für verwandte paraloge Genpaare in Mais beobachtet werden, dass diese eine starke Redundanz sowohl in den Expressionsorten [CACHARRÓN 1998], als möglicherweise auch in der Funktion besitzen [THEISSEN et al. 1995, MENA et al. 1996, SCHMIDT und AMBROSE 1998, THEISSEN et al. 2000].

Die Identifizierung von putativen Orthologen wie auch von nahen Paralogen war also gleichermaßen von Interesse. Um möglichst viel über die Funktion von *ZMM19* zu erfahren, sollten daher nah verwandte Gene aus Mais und aus anderen Arten identifiziert werden. Es wurde ein Sequenzvergleich und eine anschließende Stammbaumanalyse durchgeführt. In diese Analysen wurden putative Proteinsequenzen von veröffentlichten MADS-Box-Genen aus den Süßgräsern Reis (*Oryza sativa*), Gerste (*Hordeum vulgare*), Weizen (*Triticum aestivum*), Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*) und Mais (*Zea mays*) eingeschlossen. Außerdem wurden putative Proteinsequenzen von unveröffentlichten Mais-Genen, die am MPIZ neu entdeckt wurden (G. THEISSEN, persönliche Mitteilung) aufgenommen. Weiter wurden auch MADS-Domänen-Proteine aus dikotylen Pflanzen in die Analyse eingeschlossen, z. B. aus den Modellpflanzen Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) und aus zwei Solanaceen, Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Es wurden außerdem *ZMM19*-ähnliche Proteinsequenzen in Gen- und Proteindatenbanken mit dem Programm NetBlast gesucht. Durch diese Suche konnten mehrere *ZMM19*-ähnliche Proteine aus dikotylen Pflanzen gefunden werden, die ebenfalls in die Stammbaumanalyse eingeschlossen wurden.

Die einzelnen verwendeten Gensequenzen und die zugehörigen Artnamen lassen sich Abb. 3.11 entnehmen.

Vor der Stammbaumanalyse wurden die Sequenzen der MADS-Domänen verglichen und anhand ihrer Sequenzähnlichkeit zu einem *Multiple-Sequence-Alignment* zusammengestellt (s. Anhang D.1).

Aus diesem Sequenzvergleich ergibt sich, dass *ZMM19* in die Subfamilie der *STMADS11*-ähnlichen MADS-Box-Gene fällt, eine erst in jüngster Zeit entdeckte Subfamilie [CARMONA et al. 1998, GARCIA-MAROTO et al. 2000, HARTMANN et al. 2000, MAO et al. 2000].



Die Mitgliedschaft in einer Subfamilie kann durch Anwesenheit von charakteristischen Aminosäuren in der MADS-Domänen-Sequenz definiert werden [THEISSEN et al. 1996]. Charakteristische Aminosäuren, sind solche, die sich an derselben Position in mindestens 75% der Mitglieder der Subfamilie finden, aber nur in maximal 5% der Mitglieder anderer Subfamilien. Die charakteristischen Aminosäuren der STMADS11-ähnlichen Proteine wurden näher bestimmt. Da dieser Analyse nicht alle bekannten MADS-Box-Sequenzen zugrunde gelegt wurde, sind nur die wirklich eindeutig erscheinenden Aminosäuren aufgeführt. Nach den momentan verfügbaren Sequenzinformationen sind für die Subfamilie der STMADS11-ähnlichen Proteine die Aminosäuren E an Position 4, A an Position 16, R an Position 26 und D an Position 42 der MADS-Domäne charakteristisch (vgl. Anhang D.1).

Innerhalb der *STMADS11*-Subfamilie sind Untergruppen zu erkennen, die weitere charakteristische Aminosäuren miteinander teilen. So separieren sich die Proteine aus Gräsern von den aus Dikotylen durch die Aminosäuren R an Position 5 und A an Position 15, die Proteine aus Dikotylen sind dagegen durch die Aminosäuren K an Position 10 und D an Position 12 gekennzeichnet. Dies lässt vermuten, dass alle *STMADS11*-ähnlichen Gene der Gräser auf ein gemeinsames Vorgängergen zurückzuführen sind, und ebenso die der dikotylen Pflanzen auf ein ihnen gemeinsames Vorgängergen.

Ein Sequenzvergleich der kompletten Aminosäuresequenzen der STMADS11-ähnlichen Proteine, offenbart ein konserviertes Sequenzmotiv im C-terminalen Bereich der Proteine, welches bei anderen MADS-Domänen-Proteinen nicht gefunden wurde. Das Motiv lautet: DxxDxSD(V,T)SL(K,R)LGLP (s. Anhang D.2, Sequenzvergleich mit anderen Subfamilienvertretern nicht gezeigt). Die starke Konservierung eines solchen Motivs in der ansonsten schwach konservierten C-Region lässt vermuten, dass diese Region von Bedeutung für die Funktion der Proteine ist. Hierzu wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, da diese den Rahmen der Arbeit überschritten hätten.

An den MADS-Domänen-Sequenzvergleich wurde eine Stammbaumanalyse mit der gleichen Auswahl an Proteinen, hauptsächlich aus monokotylen und dikotylen Pflanzen, angeschlossen. Sie wurde nach dem Verfahren des *neighbor-joining* durchgeführt. Es flossen die Sequenzen der ersten 170 Aminosäuren der Proteine, das entspricht in etwa der M-, I- und K-Domäne, in die Analyse ein (vgl. [MÜNSTER et al. 1997]). Die Sequenz der C-Domäne wurde nicht berücksichtigt, da die MIKC-Typ-Proteine in dieser Region stark variieren und es durch Probleme beim *Multiple-Sequence-Alignment* zu Verzerrung der Topologie des Stammbaums kommen kann. Der aus der Analyse resultierende Stammbaum ist in Abb. 3.11 dargestellt.

Wie schon nach dem *Multiple-Sequence-Alignment* zu erwarten, zeigt auch die Phylogenie-Rekonstruktion, dass die Gruppe der STMADS11-ähnlichen Proteine eine

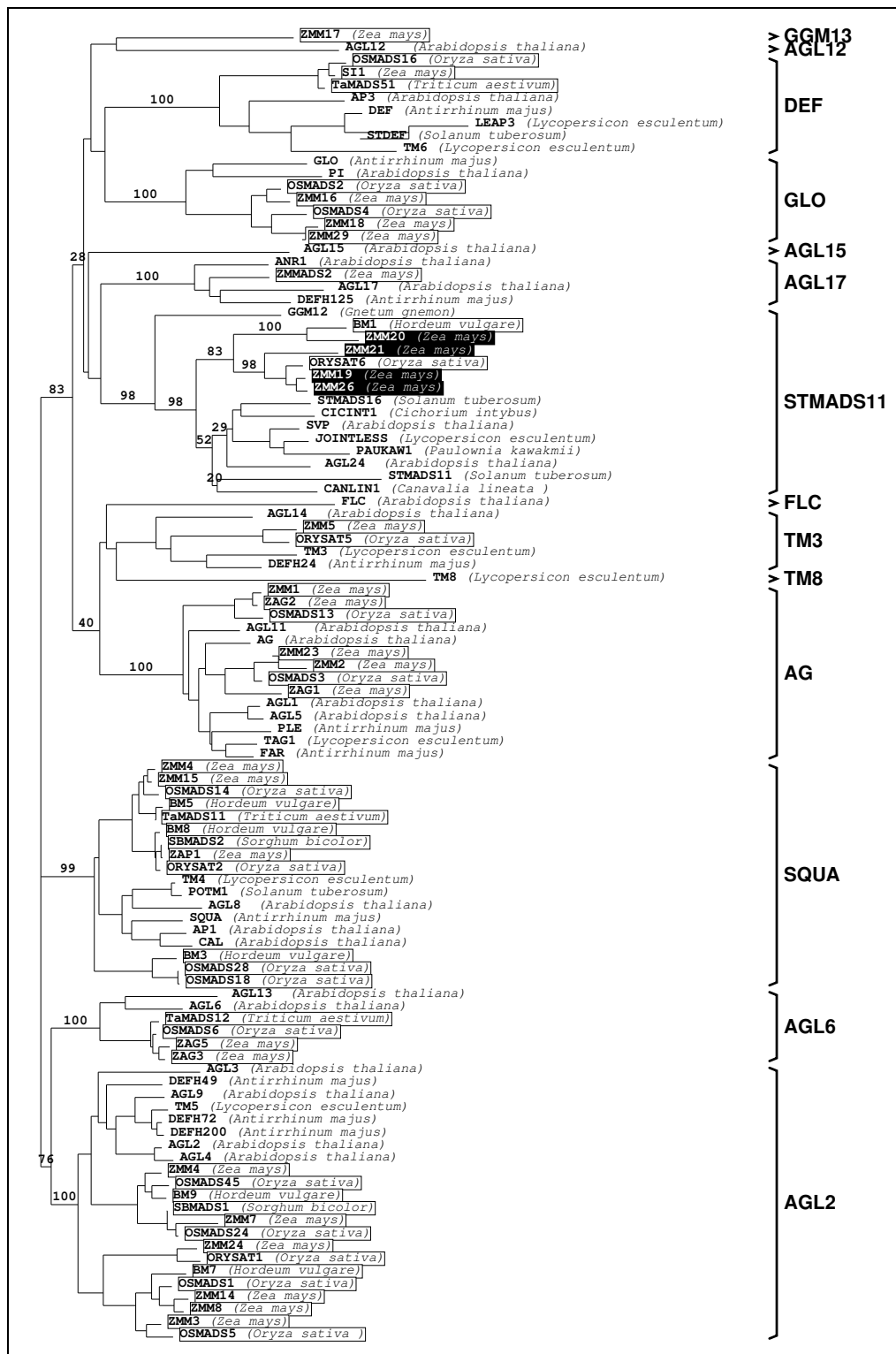


Abbildung 3.11: Der Stammbaum zeigt die phylogenetische Verwandtschaft zwischen verschiedenen MIKC-Typ-Proteinen (MADS-Domänen-Proteine aus Pflanzen). Namen derjenigen Spezies, aus welchen die jeweiligen Gene isoliert wurden, sind in Klammern angegeben. Proteine aus Monokotylen sind durch Boxen gekennzeichnet, die in dieser Arbeit untersuchten STMADS11-ähnlichen Proteine aus Mais sind schwarz hinterlegt dargestellt. Zahlen an manchen Kanten geben *bootstrap*-Werte in Prozent an, Subfamilien sind durch Klammern an der rechten Seite markiert.

eigene Klade bildet. Innerhalb dieser Subfamilie sind zwei weitere Subkladen zu finden. So bilden die Proteine aus Gräsern die eine und die aus dikotylen Pflanzen die andere Subklade.

Die letztgenannten Gruppe enthält die Proteine STMADS11, STMADS16, SVP, JOINTLESS, AGL24 und CICINT1, PAUKAW1 und CANLIN1. Die Gene *STMADS11* und *STMADS16* stammen aus der Kartoffel und besitzen eine für MADS-Box-Gene eher ungewöhnliche Expression in vegetativen Organen [CARMONA et al. 1998, GARCIA-MAROTO et al. 2000]. *SVP* und *AGL24* stammen aus der Acker-Schmalwand. *SVP* wird ebenfalls hauptsächlich in vegetativen Pflanzenteilen exprimiert, die *knock-out*-Mutante besitzt einen Frühe-Blüte-Phänotyp [HARTMANN et al. 2000]. Von *AGL24* ist bislang nur eine cDNA Sequenz veröffentlicht (*accession number*: AF005158). Ebenso liegen die folgenden drei Sequenzen nur als *GenBank*-Veröffentlichung vor: *CICINT1* steht für ein Gen (*accession number*: AF101420) aus Zichorie (*Cichorium intybus*). *CANLIN1* (*accession number*: AF144623) steht für ein Gen aus *Canavalia* (*Canavalia lineata*) und *PAUKAW1* (*accession number*: AF060880) für ein Gen aus dem Blauglockenbaum (*Paulownia kawakmii*), einer Verwandte des Löwenmäulchens. *JOINTLESS* ist ein Gen aus der Tomate mit ubiquitärer Expression [MAO et al. 2000].

Unter den Getreide-MADS-Box-Genen der *STMADS11*-Subfamilie finden sich neben *ZMM19* die drei schon bekannten Mais-Gene: *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26*. Außerdem findet sich hier ein Gen aus Reis (*accession number*: AB003322), welches für diese Studie *ORYSAT6* genannt wurde, und ein jüngst veröffentlichtes Gen aus Gerste, *BM1*, welches ebenfalls in vegetativen Organen exprimiert wird [SCHMITZ et al. 2000]. In der Stammbaumanalyse fallen *ZMM19* und *ZMM26* mit dem Reisprotein *ORYSAT6* eng zusammen, *ZMM20* und *BM1* fallen ebenfalls in eine Subklade.

Ein weiteres zu der Gruppe gehörendes Gen ist *GGM12*, ein MADS-Box-Gen aus *Gnetum gnemon*, einer Gymnosperme ([WINTER et al. 1999] und A. BECKER, pers. Mitteilung). In der Stammbaumanalyse liegt das putative Protein basal in der *STMADS11*-Klade. Nach der hier durchgeführten Stammbaumanalyse ist der *bootstrap-support* für die Zugehörigkeit zu dieser Subfamilie mit 98 % sehr hoch. Betrachtet man zusätzlich die *Multiple-Sequence-Alignments* (vgl. Anhang D.1 und Anhang D.2), so stellt man fest, dass *GGM12* die meisten charakteristischen Aminosäuren in der MADS-Domäne und das Sequenzmotiv am Ende des C-Terminus mit den anderen *STMADS11*-ähnlichen Proteinen teilt. Seine Zugehörigkeit zu dieser Subfamilie wird dadurch ebenfalls bestätigt.

## 3.9 Expression von *ZMM19* und *ZMM20* in vegetativen Organen

### 3.9.1 Expression in verschiedenen Blatt-Typen und Nodien

Die Stammbaumanalysen haben ergeben, dass *ZMM19* zu der Subfamilie der *STMADS11*-ähnlichen Gene gehört. Von diesen ist nur für ein Gen aus monokotylen Pflanzen, für *BMI*, das Expressionsmuster veröffentlicht. Expression wird ausschließlich in vegetativen Organen gefunden, dort besonders in Blattscheiden und in Nodien [SCHMITZ et al. 2000].

Es wurden daher zwei weitere RNA-Gel-Blot-Analysen mit *ZMM19* und *ZMM20* durchgeführt, um die Spezifität dieser Genen besser zu charakterisieren. Die erste Analyse wurde mit RNA aus verschiedenen Blatt-Typen und aus Nodien durchgeführt (s. Abb. 3.12).

Die untersuchten Gene zeigten beide eine fast gleich starke Expression in differenzierten Nodien wie in differenzierten Lieschblättern, während in sehr jungen Maisgeweben (Keimling, Koleoptile, junge Blätter) nur schwache Expression zu finden war. Relativ starke Expression wurde für *ZMM20* – und in einem etwas geringeren Rahmen auch für *ZMM19* – in Blattscheiden gefunden. Die Expression in den Vorblättern der weiblichen Infloreszenz, die ebenfalls wie Lieschblätter hauptsächlich aus Blattscheide bestehen, war von einem ähnlichen Niveau wie die Expression in Blattscheiden.

Diese Expressionsstudien zeigen, dass die beiden Gene *ZMM19* und *ZMM20* nicht spezifisch für ein vegetatives Organ sind, sondern in verschiedenen Organen exprimiert werden. Beide Gene zeigen eine wesentliche Expression in Blattscheiden und in Nodien, und *ZMM19* auch in geringerem Maße in Blättern. Die Expression der Gene ist zeitlich differenziert, in jungen Pflanzen wird kein Transkript bzw. eine nur geringe Transkriptmenge gefunden. In älteren Pflanzen wird ein höheres Expressionsniveau gefunden.

### 3.9.2 Blätter verschiedener Entwicklungsstadien

Nach den vorhergegangenen Untersuchungen und den Studien von [CARMONA et al. 1998, SCHMITZ et al. 2000] war zu vermuten, dass die *STMADS11*-ähnlichen Gene an der Kontrolle der vegetativen Entwicklung beteiligt sind. Insbesondere für Gräser, wo die Gene zeitlich und räumlich differenzierte Expressionsmuster zeigen, kann vermutet werden, dass die Funktionen der Gene mit den verschiedenen zu durchlaufenden Entwicklungsphasen zusammenhängen. Es wurden daher in einer weiteren RNA-Gel-Blot-Analyse die Expression von *ZMM19* und *ZMM20* in verschiedenen Altersstadien untersucht. Dafür wurde aus einer Population von Maispflanzen jeweils im Abstand von

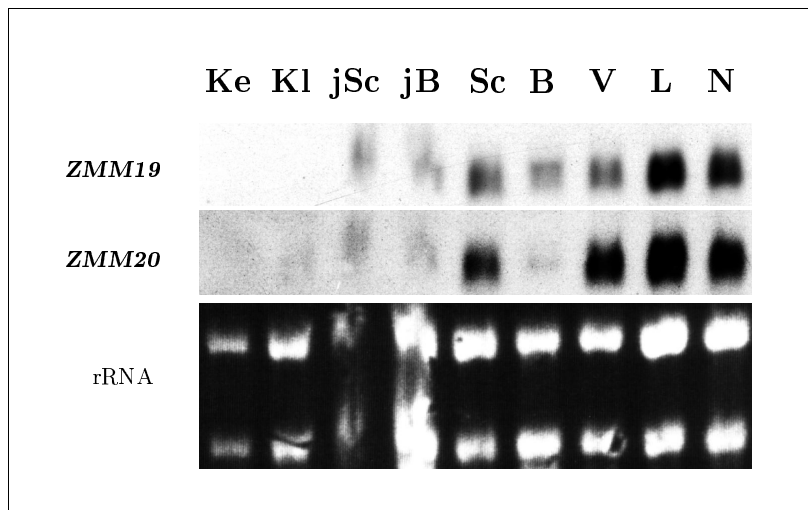


Abbildung 3.12: Expressionsmuster von *ZMM19* und *ZMM20* in vegetativen Organen. RNA-Gel-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA aus Keimling (Ke), Koleoptile (Kl), junger Blattscheide (jSc), junger Blattspreite (jB), ausdifferenzierter Blattscheide (Sc), ausdifferenzierter Blattspreite (B), Vorblatt der weiblichen Infloreszenz (V), jungen Lieschblättern (L) und ausdifferenzierten Nodien (N). Weiteres wie Abb. 3.2.

einer Woche ein Blatt aus gleicher Position, Blatt 4 (von unten gezählt), geerntet. Aus drei Regionen des Blattes, Blattscheide, Blatthäutchen und Blattspreite, wurde RNA gewonnen und für die RNA-Gel-Blots eingesetzt (s. Abb. 3.13).

Es wurde für diese Untersuchungen Blatt 4 ausgewählt, da es relativ früh angelegt wird, d. h. die Expression auch schon in einer frühen Lebensphase studiert werden kann, es aber nicht zu den Blättern gehört, die automatisch eine juvenile Blattidentität haben [MOOSE und SISCO 1996]. Das Blatt erhält die juvenile Blattidentität also erst während der normalen Entwicklung der Maispflanze.

Die 3 Wochen alten Blätter zeigen noch keine äußerlich sichtbare Differenzierung zwischen Blattscheide und Blattspreite, diese ist erst in den 4 Wochen alten Blättern zu erkennen. In diesen 3 Wochen alten Blättern ist keine Expression von *ZMM19* oder *ZMM20* zu erkennen. Offensichtlich ist die Expression von *ZMM19* im jungen Blatt 4 mit beginnender Differenzierung sehr hoch, insbesondere in den sich differenzierenden Blattscheiden. Im älteren Blatt geht die Expression zunächst zurück, nimmt aber in etwa mit Beginn der reproduktiven Phase wieder zu, die Pflanzen sind dann 10 Wochen alt.

Die Expression von *ZMM19* ist also zeitlich schwankend. Die Datenlage reicht allerdings nicht aus, um wesentliche Schlüsse auf eine Funktion von *ZMM19* in den Entwicklungsphasen zu ziehen. Weitere Studien mit Blättern von früheren Phytomeren, die soweit bekannt, immer juvenile Identität tragen, oder von späteren Phytomeren, die z.T. Blätter mit gemischt juveniler/adulter Identität oder nur adulter Identität haben

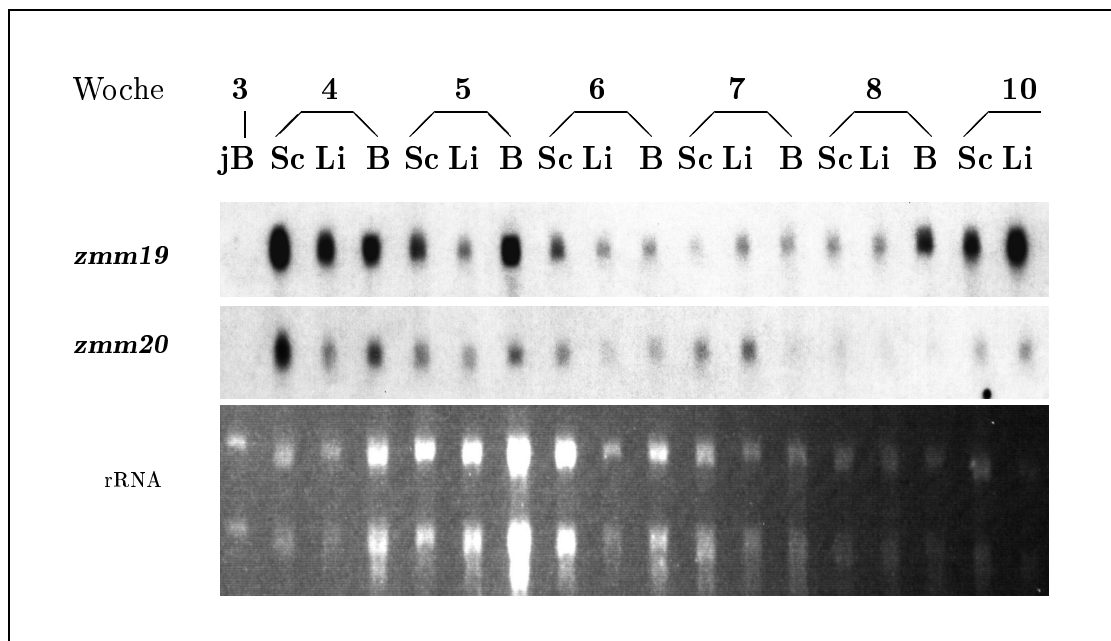


Abbildung 3.13: Expressionsmuster von *ZMM19* und *ZMM20* in Maisblatt 4 in zeitlicher Reihe. RNA-Gel-Blot-Analysen wurden mit Gesamt-RNA aus verschiedenen alten Blättern durchgeführt. Folgende Blattoorgane wurden verwendet: Woche 3: junges Blatt (jB), Woche 4-8: jeweils Blattscheide(Sc), Ligula-Region (Li) und Blattspreite (B) und Woche 10: nur Blattscheide und Ligula-Region. Weiteres wie Abb. 3.2.

[MOOSE und SISCO 1996], wären dafür notwendig.

*ZMM20* wird ebenfalls zeitlich schwankend exprimiert. Es sind in der durchgeführten Analyse allerdings keine zwei Expressions-Maxima wie für *ZMM19* beobachtet worden.

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Belege für die Identität von *TU1* und *ZMM19*

Die hier vorgestellten Untersuchungen zielen auf die Beantwortung der Frage ab, ob *TU1* und *ZMM19* identische Gene sind.

Die hier vorgestellten Untersuchungen erbrachten Belege, die die Identität der beiden Loci unterstützen. Durch die Anzahl dieser Belege wird eine Art Indizien-Beweis geführt, demzufolge der *Tu1*-Phänotyp durch eine ektopische Expression von *ZMM19* in Maiskolben und Maisfahne hervorgerufen wird. Es wird plausibel gemacht, dass die Ursache der ektopischen Expression eine Mutation oder eine Abfolge von Mutationen in der putativen Promotor-Region des *ZMM19*-Locus ist. Durch die Mutation bzw. die Mutationen entstand demzufolge das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel, welches für die ektopische Expression von *ZMM19* in *Tu1*-Pflanzen verantwortlich ist.

Eine endgültige Klärung war im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht zu erreichen, wie in Abschnitt 4.2.1 noch ausgeführt wird.

Die einzelnen Belege werden im Weiteren eingehender beleuchtet.

#### 4.1.1 *Tu1* und *ZMM19* kartieren in der gleichen Region

Die Loci von *Tu1* und *ZMM19* liegen nach Kartierung sehr nahe beieinander. *Tu1* liegt auf der Karte der *University of Missouri, Columbia* (UMC EST-Karte, [DAVIS et al. 1999]) etwa bei Position 118,2 und *ZMM19* etwa bei Position 115, beides auf Chromosom 4. Da die Kartierungsergebnisse in beiden Fällen einen Fehler von  $\pm 3$  cM zulassen ([NEUFFER et al. 1997] und MPIZ-Kartierungsergebnisse) ist eine Identität der Loci gut möglich.

Eine ungefähre Abschätzung der Anzahl der Gene in dieser Region ergibt sich aus der Länge eines cM und der Gendichte. Bei einer Genom-Länge von Mais, von  $2,4 \times 10^9$  bp [SANMIGUEL et al. 2000] und einer Genomkartenlänge von etwa 2000 cM [DAVIS et al. 1999] beträgt die mittlere Länge eines cM 1200 kB. Bei der Sequenzierung der Mais *adh*-Region wurden in 225 kB neun Gene gefunden [TIKHONOV et al. 1999], d. h. etwa ein Gen pro 25 kB. Verallgemeinert man dieses

Ergebnis, ergibt sich ein Erwartungswert von 50 Genen pro cM. Die obige Abschätzung enthält verschiedene starke Vereinfachungen. So sind die Kartierungseinheiten keine physikalische Längeneinheiten, sondern nur relative Abstände der Gene, auf Grund der Rekombinationshäufigkeiten. Die Gendichte ist ebenfalls variabel, so ist das Maisgenom, wie das anderer Gräser, aus genreichen Abschnitten und großen, nahezu genfreien Regionen aufgebaut [BARAKAT et al. 1997]. Die *adh*-Region ist wahrscheinlich ein genreicher Abschnitt, durch die Abschätzung von 50 Genen pro cM wird daher vermutlich die Anzahl an tatsächlich in Mais gefundenen Genen überschätzt. Diese grobe Abschätzung zeigt aber, dass in den kartierten Regionen von *Tu1* bzw. von *ZMM19* vermutlich etliche Gene vorhanden sind, d. h. eine sichere Zuordnung von Gen-Locus zu einem Mutanten-Locus ist durch die durchgeführte Kartierung alleine nicht möglich, sie gibt nur Hinweise auf Kandidaten-Gene.

#### **4.1.2 Überexpression von Transkriptionsfaktoren führt zu dominanten *gain-of-function*-Phänotypen**

Es hat sich gezeigt, dass Mutationen, die die ektopische Expression eines Transkriptionsfaktors hervorrufen, einen dominanten *gain-of-function*-Phänotyp bewirken. Ein solcher Phänotyp konnte z. B. bei den Mais-Mutanten *B-Peru* [RADICELLA et al. 1992], *Knotted1* [HAKE 1992] und in weiteren *knox*-Gen-Überexpressions-Mutanten wie *Gnarley1* [FOSTER et al. 1999] und *Rough Sheath1* [SCHNEEBERGER et al. 1995] beobachtet werden.

Die genetischen Charakteristika von *Tu1* stimmen mit einem solchen Überexpressions-Szenario perfekt überein. *Tu1* ist eine eine codominante Mutante und eine Gendosis-Analyse zeigte, dass der Phänotyp umso stärker ausgeprägt ist, je höher die relative Gendosis von *Tu1* ist [POETHIG 1997]. Das ist mit der Annahme, dass *Tu1* eine *gain-of-function*-Mutation darstellt, gut vereinbar.

Es wurde daher vermutet, dass der *Tu1*-Phänotyp durch eine Mutation in einem Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, verursacht wird. Hierdurch ist das Spektrum an Genen verringert, die Kandidaten-Gene für *TU1* sind, selbst wenn in der Nähe *TU1* weitere Gene identifiziert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass *ZMM19* vom *TU1*-Locus kodiert wird, ist dadurch wesentlich vergrößert.

#### **4.1.3 Korrelation zwischen morphologischer Veränderung und *ZMM19*-Expressionsniveau**

Die wildtypische Expression von *ZMM19* ist im wesentlichen auf vegetative Organe beschränkt (s. Abb. 3.2 und 3.12). Dieses Expressionsmuster ist in *Tu1-A158*-Pflanzen verändert. In diesen Pflanzen wird zusätzlich eine starke ektopische Expression von *ZMM19*



in den weiblichen Infloreszenzen und eine etwas schwächere Expression in den männlichen Infloreszenzen gefunden (s. Abb. 3.3). Die ektopische Expression findet also genau in den Strukturen statt, deren Morphologie in *Tu1*-Pflanzen verändert ist. Die phänotypischen Veränderungen innerhalb einer Pflanze sind umso ausgeprägter, je stärker die Expression von *ZMM19* ist. So ist die weibliche Infloreszenz am auffälligsten verändert und dort ist auch das *ZMM19*-Expressionsniveau am höchsten (s. Abb. 3.3).

Eine entsprechende positive Korrelation zwischen Ausprägung der phänotypischen Effekte und dem *ZMM19*-Expressionsniveau findet man ebenfalls bei der Analyse der schwächeren *Tu1*-Mutanten, *Tu1-md*, *Tu1-l* und *Tu1-d*. Die vier Mutanten zeigen in der genannten Reihenfolge Kolben-Phänotypen abnehmender Ausprägung, und korreliert ein in entsprechender Reihenfolge abnehmendes *ZMM19*-Expressionsniveau in den Kolben (s. Abb. 3.5).

Die unterschiedlich starken phänotypischen Ausprägungen lassen sich als *gain-of-function*-Phänotypen erklären, die durch die verschieden stark ausgeprägte Überexpression des *ZMM19*-Gens hervorgerufen werden.

Ein Vergleich der *Tu1-A158*-Mutante mit einer in der Literatur beschriebenen, transgenen Überexpressions-Mutante macht obige Erklärung noch plausibler. Der Phänotyp der 35S::*STMADS16-sense*-Tabakmutante wird durch die Überexpression des *STMADS16*-Gens aus der Kartoffel hervorgerufen [GARCIA-MAROTO et al. 2000]. Die Stammbaumanalyse hat bereits gezeigt, dass *STMADS16* wie *ZMM19* in die Subfamilie der *STMADS11*-ähnlichen Gene gehört (s. Abb. 3.11). Bei der Analyse verschiedener, unabhängiger transgener Linien der *STMADS16*-Überexpressions-Mutante, stellten die Autoren eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Expressionsniveaus und den phänotypischen Veränderungen in den Infloreszenzen fest, d.h. die Pflanzen mit den stärksten phänotypischen Veränderungen hatten auch die stärkste *STMADS16*-Expression.

Die nahe Verwandtschaft von *STMADS16* zu *ZMM19* lässt vermuten, dass die Überexpression von *ZMM19* einen vergleichbaren *gain-of-function*-Phänotyp hervorrufen sollte, was die Vermutung unterstützt, dass die Überexpression von *ZMM19* die Ursache des *Tu1*-Phänotyps ist.

Angemerkt sei noch, dass die Überexpression des Kartoffelgens in einem heterologen System erfolgte, also nicht in der Kartoffel, sondern in Tabak. Tabak besitzt ein zu *STMADS16* sehr ähnliches Protein, welches sich nur durch den Austausch von vier Aminosäuren unterscheidet [GARCIA-MAROTO et al. 2000]. Es ist daher zu erwarten, dass Artefakte durch die Benutzung des heterologen Systems vernachlässigbar sind.

#### 4.1.4 *ZMM19* wird in vegetativen Strukturen exprimiert, hauptsächlich in Blattscheiden und Nodien

Da die Orte der Expression von MADS-Box-Genen meist identisch mit den Orten der Genfunktion sind, sind die Orte der *ZMM19*-Expression für ein Verständnis der *ZMM19*-Funktion von Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass *ZMM19* in wildtypischen Pflanzen besonders stark in Blattscheiden, in Lieschblättern, welche hauptsächlich aus Blattscheiden bestehen, und in Nodien exprimiert wird (s. Abb. 3.12). Die Funktion von *ZMM19* sollte nach diesen Ergebnissen also in der vegetativen Entwicklung liegen. Insbesondere in der Blattscheiden- und der Nodien-Entwicklung ist die hauptsächliche Funktion zu vermuten.

Die Analyse des *Tu1-A158*-Phänotyps hat gezeigt, dass die wesentlichen Veränderungen in den Infloreszenzen zu finden sind. Dort sind vor allem vegetative Strukturen, hauptsächlich die Hüllspelzen, verändert. Diese besitzen in der *Tu1-A158*-Mutante blattscheidenähnliche Identität. Die reproduktiven Organe der *Tu1-A158*-Pflanzen sind in vielen Fällen unverändert, d. h. Stamina und Karpelle sind, zumindest nach oberflächlicher Analyse, ununterscheidbar vom Wildtyp.

Die vorrangige Veränderung der *Tu1-A158*-Pflanzen ist durch eine Überexpression eines Blatt-Entwicklungskontrollgens gut erklärbar. Die Funktion des Genproduktes könnte die Auslösung und Aufrechterhaltung eines Blatt- oder Blattscheiden-Entwicklungsprogramm sein. Wird das Gen ektopisch in Infloreszenzen exprimiert, so werden nur die Organe beeinflusst, die die Kompetenz besitzen, auf das Signal zu reagieren. Organe die blattähnlich sind, wie z. B. die Hüllspelzen, werden auf dieses Signal anders reagieren, als Organe mit geringerer Ähnlichkeit zu Blättern, wie z. B. Karpelle. In den blattähnlichen Organen könnte das ausgelöste Programm parallel zu dem normalerweise initiierten Programm ablaufen, oder es könnte an seiner Stelle ablaufen. Der Charakter der *Tu1*-Hüllspelzen lässt darauf schließen, dass beides passiert. Die entstehenden Strukturen weisen sehr große Ähnlichkeit zu Blattscheiden auf. Die Expressionsorte von *ZMM19* lassen aber nicht vermuten, dass das Gen für ein einzelnes vegetatives Organ spezifisch ist. Da Hüllspelzen umgestaltete Blattscheiden darstellen [GALINAT 1957], könnte ein ektopisch exprimiertes Blatt-Identitätsprogramm die Bildung von blattscheidenartigen Charakteristiken auslösen, d. h. spezifische Hüllspelzen-Charakteristiken werden nicht ausgeprägt, aber eine Beschränkung auf Blattscheide bleibt bestehen.

Eine Veränderung der vegetativen Pflanzenmorphologie wird vermutlich deswegen nicht beobachtet, weil *ZMM19* in den meisten vegetativen Organen auch im Wildtyp exprimiert wird, und ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhtes Expressionsniveau nur in Infloreszenzen vorliegt (vgl. Blattspuren in Abb. 3.3).

Abhängig von der verwendeten Maislinie und von den Umweltbedingungen werden weitere Veränderungen in den *Tu1*-Infloreszenzen beobachtet. So werden anstelle von Ährchen Kolbenseitenzweige gebildet. Dieses lässt sich als fehlende Determinierung der entsprechenden Meristeme deuten. Besonders ausgeprägt ist der Phänotyp unter Bedingungen, die vegetatives Wachstum befördern [LANGDALE et al. 1994]. Alle diese Effekte kann man folgendermaßen interpretieren: *ZMM19* hat zwei Funktionen. Zum einen befördert es das vegetative Wachstum oder die vegetative Phase. Das könnte bedeuten, dass *ZMM19* z. B. unter schlechten Beleuchtungsbedingungen stärker exprimiert wird und dadurch das vegetative Wachstum verstärkt und die vegetative Phase verlängert wird. Die zweite Funktion ist dann die Determinierung der Organ-Identität. In entsprechenden Organen, d. h. in der Blattscheide, nicht aber im Nodium, wird durch *ZMM19* nicht nur das Wachstum bestärkt, sondern auch ein Blattscheiden-Identitäts-Programm ausgelöst, in dessen Verlauf die Ausbildung der Blattscheiden-Charakteristiken, z. B. entsprechende Behaarung und Nervatur, bewirkt wird.

Ein Vergleich des *Tu1*-Phänotyps mit dem bereits erwähnten *35S::STMADS16-sense*-Überexpressions-Phänotyps in Tabak zeigt auch hier einige Parallelen. Auch für *35S::STMADS16*-Tabakpflanzen wurde keine Veränderung des vegetativen Wuchshabitus beobachtet [GARCIA-MAROTO et al. 2000]. Eine veränderte Morphologie wurde dagegen in den Infloreszenzen beobachtet. Die Veränderungen bestanden in der Verlängerung der Infloreszenz-Internodien, in der Erhöhung der Anzahl der Blüten, im Auswachsen der sonst meist ruhenden Seitenknospen zweiter und dritter Ordnung und in einer längeren Aktivität des Infloreszenzmeristems. Außerdem wurde eine Transformation von Kelchblättern zu Blättern beobachtet, was besonders stark den Veränderungen der Hüllspelzen in *Tu1*-Pflanzen gleicht. Weitere Blütenorgane, wie z. B. Karpelle, entwickelten ebenfalls blattähnliche Charakteristiken.

*Tu1*-Pflanzen und *35S::STMADS16-sense*-Tabakpflanzen weisen Veränderungen von entsprechenden Strukturen auf, z. B. wurden blattähnliche Charakteristiken in blattomologen Strukturen wie Kelchblättern und Spelzen ausgeprägt. Determinierte oder ruhende Strukturen wie Ährchen oder Seitenknospen wurden in beiden Mutanten aktiviert. Die Ähnlichkeit endet allerdings in den bevorzugten phänotypischen Ausprägungen. In *Tu1* sind vor allem die Spelzen verändert, während in *35S::STMADS16-sense*-Pflanzen der Verzweigungshabitus der Infloreszenz am stärksten beeinflusst ist. Die jeweiligen Schwerpunkte der Ausprägung der Phänotypen stimmen jedoch mit den wildtypischen Expressionsorten der jeweiligen Gene überein. *STMADS16* wird in der Kartoffel in allen vegetativen Organen exprimiert, am stärksten jedoch im Stängel und in den Blattspindeln. Dementsprechend ist besonders das Verzweigungsmuster und die Länge der Seitenzweige in der Mutante verändert.

*ZMM19* dagegen wird besonders in Blattscheiden exprimiert, aber auch in Nodien und Blattspreiten, der *Tu1*-Phänotyp betrifft vorrangig die blattähnlichen Organe in den Infloreszenzen, aber es werden auch Veränderungen des Verzweigungsmusters, z. B. im Kolben, beobachtet.

Die Parallelen zwischen 35S::*STMADS16-sense*-Tabakpflanzen und *Tu1-A158*-Pflanzen sprechen für die ektopische Expression von *ZMM19* als Ursache des *Tu1*-Phänotyps.

#### **4.1.5 Die putative Promotor-Sequenz von *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* unterscheidet sich von der eines wildtypischen Allels**

Parallel zu den in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsstudien und morphologischen Charakterisierungen wurde die Sequenzierung des *ZMM19*-Locus von *Tu1-A158*- und Wildtyp-Pflanzen begonnen (T. MÜNSTER, W. FAIGL, W. DELEU und S. WERTH persönliche Mitteilung). Zwischen den beiden Allelen konnten keine wesentlichen Unterschiede in großen Teilen des untersuchten Bereiches gefunden werden (s. Abb. 4.1). Die hier gefundenen Unterschiede sind als Ursache für die beobachtete unterschiedliche Expression wenig wahrscheinlich. Auffällige Sequenzunterschiede sind dagegen in der 5'-Region, stromaufwärts des putativen Transkriptionsstarts, welcher etwa 200 bp stromaufwärts vom ATG-Startcodon liegt (S. WERTH, persönliche Mitteilung), zu finden. Während die Sequenzen der beiden Allele von Position -336 (bezüglich ATG) bis in das erste Intron hinein nahezu identisch sind, bricht diese Sequenzähnlichkeit stromaufwärts abrupt ab (s. Abb. 4.1). Die von Position -336 weiter stromaufwärts gelegene Region aus der *Tu1-A158*-Pflanze zeigt gewisse Sequenzähnlichkeit mit einem Teil eines *MuDR*-Elements (*accession number*: U75360), einem autonomen Mais-Transposon aus der *Mutator*-Familie [HERSHBERGER et al. 1991, LISCH et al. 1995, JOANIN et al. 1997]. Diese *MuDR*-ähnliche Sequenz stellt kein komplettes Mu-Transposon dar, da mindestens an der einen Seite ein für solche Elemente charakteristisches *terminal inverted repeat* (TIR) fehlt. Das Sequenzstück von Position 1952 bis 2179 aus *MuDR*, welches eine Ähnlichkeit von 55% zur 5'-Region von *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* (Position -430 bis -657) aufweist, liegt in dem kodierenden Bereich für MURA, der *MuDR*-Transposase [HERSHBERGER et al. 1991] (s. Abb. 4.1).

Eine mögliche Erklärung für die Mutationsereignisse, die am *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Locus stattgefunden haben, ist eine Integration eines *MuDR*-ähnlichen Transposons in die Promotor-Region des Gens. Anschließend könnte es zu chromosomalen Rearrangements gekommen sein. Möglicherweise wurde dadurch das *MuDR*-Element fragmentiert und die Mutation wurde dadurch irreversibel. Auch eine Duplikation des kompletten veränderten Locus könnte eine Folge der Insertion des Transposons sein.

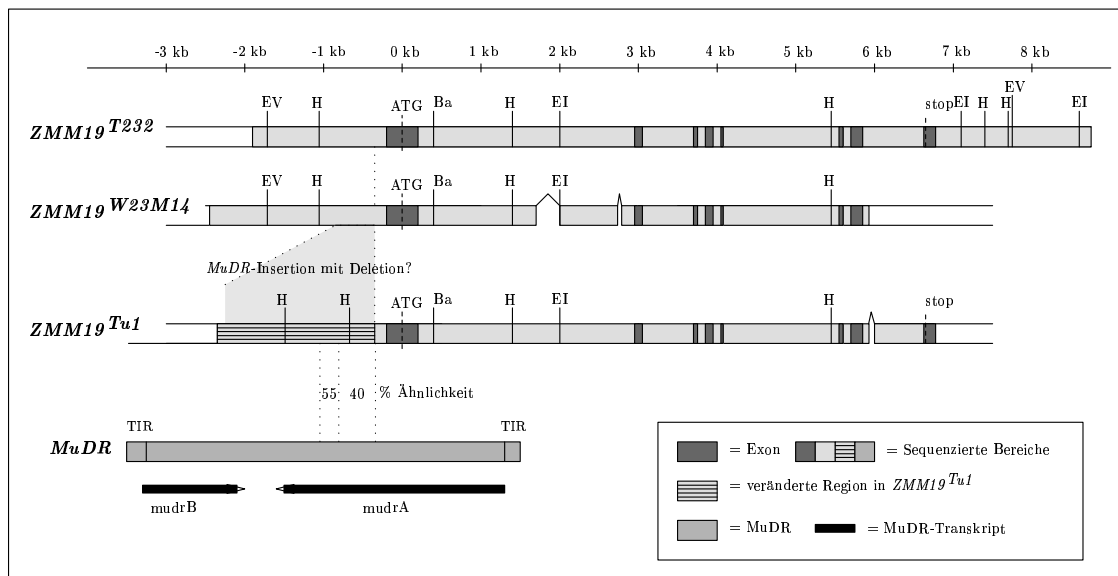


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des *ZMM19*-Locus aus drei verschiedenen Maislinien (Sequenzen: T. MÜNSTER, W. FAIGL, W. DELEU und S. WERTH persönliche Mitteilung). Ganz oben ein Maßstab in 1 kb Schritten. Darunter zwei Allele aus wildtypischen Pflanzen, darunter ein Allel aus einer *Tu1-A158* Pflanze. Ganz unten links ein *MuDR*-Element und rechts Erläuterungen der verwendeten Graustufen und Schraffierungen. Abkürzungen: Restriktionsschnittstellen: E = EcoRI, H = HindIII, EV = EcoRV; ATG = Translationsstart, stop = Translationsstopp.

Welches Ausmaß die DNA-Rearrangements gehabt haben ist unbekannt. Weiter stromauf sollte wieder Sequenzhomologie zu den wildtypischen Allelen gefunden werden. Eine DNA-Gel-Blot-Hybridisierung mit einer Sonde für die wildtypische -1000 Region zeigt eine abweichende Bande in der *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Pflanze, verglichen mit der wildtypischen Pflanze, woraus geschlossen werden kann, dass diese Region in den *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Pflanzen vorhanden ist. Sie ist vermutlich weiter stromauf gelegen als im Wildtyp. Die Sequenzierung des veränderten *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allels wird weiter verfolgt um definitive Aussagen über das Ausmaß der Veränderung machen zu können.

In dieser Arbeit vorgestellte PCR-Untersuchungen zeigten, dass diese veränderte Region von Position -1042 bis Position 307 (Start ATG = 1) in 12 untersuchten *Tu*-Linien nahezu unverändert vorlag (s. Anhang D.3). Regionen weiter stromauf wurden in diesen Linien bislang nicht untersucht. Die Untersuchung von 18 Wildtyp-Allelen unterschiedlicher Herkunft zeigte in keinem Fall eine solche Insertion (W. DELEU, persönliche Mitteilung).

Mais besitzt eine große Anzahl an Transposons. Eine Veränderung von Expressionsstärken und -mustern durch die Insertion eines Transposon in die kodierende Region, in ein Intron oder in die Promotor-Region wurde häufig beobachtet. Vielfach führten die-

se Mutationen zu einem Funktionsverlust. Es wurden aber auch Fälle beobachtet, wo es durch eine solche Insertion zu einer ektoptischen Expression des mutierten Gens kommt. Ein dominanter *gain-of-function*-Phänotyp des Gens *Kn1* wurde z. B. mehrfach unabhängig durch Insertion von Transposons in das dritte Intron des Locus oder durch eine Duplizierung des kompletten Locus gefunden [HAKE 1992]. Im Fall des *B*-Locus, der für ein regulatorisches *helix-loop-helix*-Protein kodiert, existieren mindestens drei verschiedene dominante Allele, *B<sup>Peru</sup>*, *B<sup>Bolivia</sup>* und *B<sup>Mex7b</sup>*, die Transposon-Insertionen stromauf vom Start-ATG aufweisen [SELINGER und CHANDLER 1999]. Der *B*-Locus reguliert die Expression der Gene des Anthocyan-Biosynthesewegs; die drei erwähnten Allele weisen durch die Insertionen eine veränderte Organ- oder Gewebespezifität auf und verursachen dadurch unterschiedliche Pflanzen-Färbungsmuster.

Diese Beispiele zeigen, dass auch die gefundene Insertion im *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Locus der Verursacher der ektoptischen Expression von *ZMM19* sein könnte. Die vollständige Klonierung und Sequenzierungen des Locus ist jedoch noch nicht abgeschlossen. Es gibt Hinweise, dass eine Duplizierung des kompletten veränderten Locus vorliegt, wodurch auch die Überexpression verursacht sein könnte.

#### 4.1.6 Nur *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* wird ektoptisch exprimiert

Durch einen *Single-Nucleotide-Polymorphism* (SNP) zwischen *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* und *ZMM19<sup>W23M14</sup>* konnte nachgewiesen werden, dass in einer heterozygoten *Tu-A158*-Pflanze nur *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* ektoptisch im Kolben exprimiert wird (s. Abb. 3.10). Das ektoptisch exprimierte Allel liegt stromab der veränderten putativen Promotor-Region. Falls der *ZMM19*-Locus jedoch dupliziert sein sollte, muss geprüft werden, ob die putative Promotor-Region der zweiten „Komponente“ ähnlich aufgebaut ist wie *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*, wofür die Sequenzen der diagnostischen PCR sprechen. Es steht dann die Überprüfung noch aus, welche der duplizierten „Komponenten“ mit dem SNP nachgewiesen wird, bzw. ob beide denselben SNP zeigen. In jedem dieser Fälle wird aber durch die alleinige ektoptische Expression des Nicht-Wildtyp-Allels gezeigt, dass es sich nicht um eine generelle Hochregulierung der *ZMM19*-Expression handelt. Es ist dadurch unwahrscheinlich, dass der *Tu1*-Phänotyp auf eine Mutation in einem anderen Gen zurückzuführen ist, welches direkt oder mittelbar die Expression von *ZMM19* beeinflusst, da in einem solchen Fall die Hochregulierung beider Allele zu erwarten wäre.

Es ist nicht vollständig auszuschließen, dass der *Tu1*-Phänotyp ursächlich auf eine Mutation in einem unbekanntem Gen bzw. Genprodukt zurückzuführen ist, welches spezifisch die veränderte putative Promotor-Region erkennt und die Expression nur des

*ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allels induziert. Ein solches Gen muss allerdings in der gleichen Region wie *ZMM19* kartieren, was seine Existenz sehr unwahrscheinlich macht.

Eine endgültige Sicherheit, dass der *Tu1*-Phänotyp ursächlich auf eine Mutation in *ZMM19* zurückgeht, könnte durch eine Eingrenzung der fraglichen Region durch eine bessere Kartierung versucht werden. Eine anschließende Sequenzierung dieses Bereichs sollte allerdings keine weiteren Kandidaten-Gene aufzeigen. Eine andere Option des Nachweises wäre die Suche nach einer Rückmutation (s. Abschnitt 4.2.1).

#### 4.1.7 Korrelierung des *Tu1*-Phänotyps mit einem RFLP

Um die Identität von *TU1* und *ZMM19* zu bekräftigen wurden Pflanzen einer segregierenden *Tu1-A158*-Population analysiert. Es wurde überprüft, ob eine absolute Korrelation zwischen dem Auftreten des *Tu1*-Phänotyps und eines *ZMM19*-RFLP im kodierenden Bereich vorhanden ist. Für 43 Pflanzen konnte eine solche Korrelation bereits gezeigt werden (S. WERTH und L. WINGEN, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Analyse soll auf ca. 240 Pflanzen erweitert werden, um dadurch die Identität der beiden Loci statistisch weiter abzusichern.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass in der putativen Promotor-Region *ZMM19*-HindIII-RFLPs zwischen *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* und zwischen den daraus hervorgegangenen schwächeren *Tu1*-Mutanten auftreten. Dies könnte bedeuten, dass die schwächeren *Tu1*-Mutanten Teil-Revertanten darstellen, d. h. dass die schwächeren Phänotypen auf Annäherungen des *ZMM19*-Locus an den Wildtyp-Zustand zurückgeführt werden könnten. Damit würden sie sehr wichtige Indizien für die Beweisführung der Identität von *TU1* und *ZMM19* liefern. Daher werden die Klonierung und Sequenzierung der kompletten Loci unternommen (T. MÜNSTER, W. FAIGL, Z. MENG, L. WINGEN UND G. THEISSEN). Es wäre außerdem wünschenswert, dass die Bewertung der Phänotypen im gleichen genetischen Hintergrund stattfindet. Bisher wurden die aus dem *Maize Genetic Stock Center* bezogenen Samen für die Untersuchungen verwendet. AFLP-Untersuchungen zeigten, dass die verwendeten Linien nicht vollständig isogen sind (L. WINGEN und S. EFFGEN, unveröffentlichte Daten). Eine mehrfache Einkreuzung des *TU1*-Locus in isogene Maislinien wurde aus Zeitgründen nicht unternommen, wäre aber wünschenswert.

## 4.2 Abschließende Bewertung der Beweise

Die in dieser Arbeit gewonnenen Belege machen die Identität von *TU1* und *ZMM19* hochwahrscheinlich. Als einzige alternative, wenn auch wenig plausible, Erklärung kommt die Existenz eines weiteren Gens, welches seinerseits *ZMM19* reguliert, in Betracht.

Die vorgestellte Form des Beweises ist nicht üblich in der Maisgenetik. Es wurden eine ganze Anzahl an Mais-Gen-Loci durch Nachweis von Mutationen in verschiedenen unabhängigen Allelen mit ähnlichem Phänotyp identifiziert, z. B. *Knotted1* [HAKE et al. 1989], *liguleless2* [WALSH et al. 1997], *terminal ear1* [VEIT et al. 1998], *rough sheath2* [TSIANTIS et al. 1999] und viele andere. Zwei Methoden zu unabhängigen Allelen zu gelangen, und die Gründe warum sie im Rahmen dieser Arbeit nicht anwendbar waren, werden der Vollständigkeit halber weiter unten aufgeführt (s. Abschnitt 4.2.1). Nicht immer werden solche unabhängige Allele als notwendig für die Beweisführung angesehen, wie das Beispiel von *Hooded* aus Gerste zeigt [MÜLLER et al. 1995]. Hier konnten die Autoren auf Grund von verschiedenen Belegen zeigen, dass der dominante *Hooded*-Phänotyp auf einer Mutation in einem *KN1*-ähnlichen Gen beruht, obwohl für *Hooded* kein unabhängiges Allel gefunden werden konnte. Die wesentlichen Hinweise waren das Auftreten einer 305-bp langen Duplikation im vierten Intron des *KNOX3*-Gens und damit korreliert die Ausbildung des *Hooded*-Phänotyps. Ebenso konnte eine Überexpression von *KNOX3* in Gersten-Infloreszenzen nachgewiesen werden.

Da die Expressionsdaten die Identität von *ZMM19* und *TU1* hochplausibel machen, sollte die vollständige Sequenzierung des Locus und die genauere Analyse der Unterschiede der schwächeren Allele zur Abrundung dieses Beweises genügen.

## 4.2.1 Vorgehensweisen zur Generierung unabhängiger Allele

### Transposon-tagging Experimente

Ein Nachweis, ob ein bestimmtes Gen ursächlich für einen mutanten Phänotypen ist, ist relativ aufwändig zu führen. Für die Identifizierung eines Gen-Locus einer Mutante bedient man sich gerne der Transposon-Mutagenese, wobei das gesuchte Gen durch ein bekanntes Transposon mutiert wird und damit durch dieses Transposon markiert ist (Transposon-tagging). Im Falle einer *loss-of-function*-Mutante kann man das Transposon in wildtypische Pflanzen einbringen und nach ähnlichen mutanten Phänotypen suchen. Will man eine *gain-of-function*-Mutante untersuchen, wie es für *Tu1* der Fall wäre, so wird man das Transposon in einer wildtypischen Linie durch Kreuzung mit einer homozygot mutanten Linie in die Nachkommen einbringen. Unter diesen Nachkommen muss nach wildtypischen Pflanzen gesucht werden. In diesen sollte der mutante Locus erneut mutiert sein, wobei die zweite Mutation einen *knock-out* verursacht haben sollte. Man wird daher versuchen, in der chromosomalen Umgebung der Transposons offenen Leseraster zu finden, um dadurch das erneut mutierte Gen zu identifizieren. Wenn natürlich schon ein Kandidaten-Gen bekannt ist, wird bevorzugt in diesem nach Veränderungen gesucht werden.



Dieser Ansatz war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar, da die Anzahl an notwendigen Pflanzen für ein solches Experiment die Möglichkeiten des Instituts überschritten hätten. Außerdem ist die Fertilität der *Tu1*-Pflanzen unter den MPIZ-Anzuchtbedingungen stark verringert, so dass es Schwierigkeiten gemacht hätte, die notwendige Zahl an Pflanzen überhaupt zu erzeugen.

### Überexpression in transgenen Pflanzen

Ein guter Nachweis, dass die Überexpression eines Gens bzw. der Ausfall eines Gens verantwortlich für einen mutanten Phänotyp ist, ist oft mit Hilfe von transgenen Pflanzen zu erreichen. Für ein solches Experiment kloniert man das Gen von Interesse, bzw. bevorzugt die cDNA, unter Kontrolle eines Promotors in einen Transformationsvektor. Diesen bringt man in die Pflanzenspezies ein, aus der es stammt. Es handelt sich also um eine Transformation in einem homologen System. Will man eine Überexpression erreichen, so wird man *sense*-cDNA unter die Kontrolle des Promotors stellen, soll ein Genausfall erreicht werden, so benutzt man *antisense*-cDNA.

Im Idealfall wird das Konstrukt in einer Kopie in das Genom der Pflanze integriert, im Normalfall wird jedoch die Integration von vielen Kopien beobachtet. Als Promotor wurde in vielen veröffentlichten Studien der 35S-Promotor des *Cauliflower Mosaik Virus* benutzt. Dieser Promotor bewirkt meist eine starke ubiquitäre Expression des Transgens, wodurch verschiedene Nebeneffekte, wie z. B. *co-suppression* von *sense*-Konstrukten, auftreten können.

Ein Transformationsexperiment zum Nachweis der Identität von mutantem Locus und Kandidaten-Gen wurde für *JOINTLESS*, einem *STMADS11*-ähnlichen Gen aus der Tomate, erfolgreich durchgeführt [MAO et al. 2000]. Hier handelte es sich allerdings um eine *loss-of-function*-Mutante, und der Nachweis wurde sowohl durch Komplementation der Mutante durch Transformation mit einem 35S::*JOINTLESS sense*-Konstrukt, als auch durch Ausschaltung des Gens im Wildtyp durch ein *antisense*-Konstrukt geführt.

Es wurde bereits ein 35S::*ZMM19 sense*-Konstrukt kloniert, um eine Mais-Überexpressionsmutante zu erzeugen (W. DELEU, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zu *Arabidopsis*, welche relativ einfach zu transformieren ist, ist die Transformation von Gräsern nicht trivial. Unter den Gräsern ist die Transformation von Reis gut etabliert, die Mais-Transformation ist jedoch mit etlichen Problemen behaftet, welche die Transformation zu einer schwierigen Herausforderung machen.

Auch die Versuche der Transformations-Einheit des MPIZs, Mais mit dem 35S::*ZMM19*-Vektor zu transformieren, schlugen mehrfach aus nicht geklärten Gründen fehl. Schließlich gelang es, aus einem transformierten Kallus Pflanzen zu regenerieren (A. SEIDEL, persönliche Mitteilung). Diese transformierten Pflanzen stehen momentan

zur Analyse bereit, es zeigen sich bislang allerdings keine auffällige *Tu1*-ähnlichen Phänotypen. Die Ursache hierfür ist nicht geklärt, da aber noch keine Analysen der putativ transgenen Pflanzen stattgefunden haben, wird hier auf übereilte Spekulationen verzichtet. Sollte sich jedoch herausstellen, dass eine *co-suppression* stattfindet, was bei der Verwendung des 35S-Promotors in Mais nicht selten beobachtet wird (W. WERR und W. DELEU, persönliche Mitteilungen) müsste die Verwendung eines geeigneteren Promotors erwogen werden. Dieser könnte z. B. die Expression nur in floralen Geweben bewirken. Bei einer *co-suppression* wäre ein *loss-of-function*-Phänotyp zu erwarten. Dieser ist im Fall von *ZMM19* möglicherweise nicht zu beobachten, weil *ZMM19* und *ZMM26* redundante Funktionen haben könnten. Dann wäre eine Doppel-*knock-out*-Mutante nötig, um phänotypische Effekte zu erhalten.

### 4.3 Die Rolle der *STMADS11*-Familie in der Pflanzenentwicklung

Am MPIZ konnten vier neue Mais-MADS-Box-Gene isoliert werden, welche Mitglieder der relativ neu entdeckten *STMADS11*-Subfamilie sind. Einem dieser Gene wurde im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen besonders viel Aufmerksamkeit gewidmet, dessen Identität mit *TUNICATE1* plausibel gemacht wurde. Die Untersuchungen waren daher von der Suche nach Hinweisen bestimmt, die diese Vermutung unterstützten oder auch widerlegten. Die dabei entdeckten Eigenschaften der Gene sind aber, über diese Beweisführung hinaus, für ein besseres Verständnis der vegetativen Entwicklung von Mais interessant. Aus Vergleichen mit *STMADS11*-ähnlichen Genen aus anderen Pflanzen sind Rückschlüsse auf generelle Vorgänge der vegetativen Entwicklung von höheren Pflanzen zu erwarten. Dies gibt möglicherweise Einblicke in die Evolution der Entwicklung der Pflanzenbauplänen.

Da dies ein spannendes Thema ist und sich außerdem einige der Indizien für die Identität von *TU1* und *ZMM19* auf die nahe phylogenetische Verwandtschaft verschiedener Gene stützen, wird eine Betrachtung der evolutionären Verwandtschaften und eine Spekulation über die möglichen Aufgaben der Gene im Pflanzen-Entwicklungsprozess hier angestrengt.

#### 4.3.1 Verwandtschaftsverhältnisse der *STMADS11*-ähnlichen Gene

Die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierten MADS-Box-Gene *ZMM19*, *ZMM20*, *ZMM21* und *ZMM26* gehören zu den *STMADS11*-ähnlichen Genen. Diese erscheinen in der Phylogenierekonstruktion als monophyletische Gruppe mit Vertretern aus mono- und dikotylen Angiospermen sowie aus Gymnospermen. Dies führt zu

der Annahme, dass bereits der letzte gemeinsame Vorfahre von Angiospermen und Gymnospermen, der etwa vor 300 Millionen Jahren [GOREMYKIN et al. 1997] existierte, mindestens ein *STMADS11*-ähnliches Gen besessen hat [BECKER et al. 2000].

Diese Monophylie spiegelt sich vermutlich noch in der Ähnlichkeiten der Expressionsmuster wieder. Alle bislang untersuchten Gene werden hauptsächlich in vegetativen Organen exprimiert und haben vermutlich auch dort ihre Funktion. Spekuliert man frei über die Funktion dieser Gene, so wird man eine Beteiligung an der Regulation von Entwicklungsprozessen in den vegetativen Phasen vermuten. Eine solche liegt nahe, da andere MIKC-Typ-MADS-Box-Gene, die bevorzugt in Infloreszenzen und Blüten exprimiert werden, wichtige Funktionen in der Steuerung der Blütenentwicklung übernehmen. Die Gen-Untergruppen der *STMADS11*-Subfamilie aus Dikotylen und Monokotylen erscheinen nach den vorliegenden Sequenzinformationen von acht cDNAs aus Dikotylen (eine davon unvollständig) und sechs cDNAs aus Monokotylen ebenfalls monophyletisch, was vermuten lässt, dass eine Radiation des Vorläufergens erst nach der Divergenz von Monokotylen und Dikotylen vor etwa 160-200 Millionen Jahren passiert ist [WOLFE et al. 1989, GOREMYKIN et al. 1997].

Innerhalb der Eudikotylen hat es eine Radiation der *STMADS11*-Subfamilie gegeben, was daraus ersichtlich ist, dass aus *Arabidopsis* zwei Vertreter der Subfamilie bekannt sind, die sich in zwei Subkladen befinden (s. Abb. 3.11). Es hat vermutlich früh in der Geschichte der Eudikotylen eine Duplizierung stattgefunden, noch vor dem Artbildungsprozess, der zur Entstehung von *Arabidopsis* geführt hat.

Die vier Mais-Gene scheinen in mindestens zwei Subkladen zu fallen, eine Radiation auch innerhalb der Monokotylen ist daher wahrscheinlich (s. Abb. 3.11).

Die Stammbaumanalyse der *STMADS11*-Subfamilie lässt auf eine Radiation der Subfamilie in den Samenpflanzen schließen. Das könnte zusammen mit der angenommenen Funktion in der vegetativen Entwicklung bedeuten, dass diese Familie eine wichtige Rolle in der Evolution der Pflanzenbaupläne gespielt hat, welche sich aus ursprünglich recht einfachen Formen zu der heutigen Vielfalt an unterschiedlichen Strukturen entwickelt hat. Seit der Landeroberung der Pflanzen hat eine Diversifizierung dieser Baupläne stattgefunden, an deren Realisierung Entwicklungskontrollgene maßgeblich beteiligt sein müssen. Von verschiedenen Genfamilien, die an Regulationsprozessen in der vegetativen Entwicklung beteiligt sind, wird ebenfalls vermutet dass sie an dieser Evolution der Baupläne beteiligt waren, so z. B. die Familie der Homöbox-Gene [REISER et al. 2000] und die der *R2R3 Myb*-Gene [RABINOWICZ et al. 2000]. Nach den hier dargestellten Untersuchungen ist auch für die *STMADS11*-Subfamilie eine solche Funktion denkbar.

Weitere Einblicke versprechen die Aufklärung der Funktionen der *STMADS11*-ähnlichen Gene in den Entwicklungsprozessen und die Analyse von Wechselwirkungen

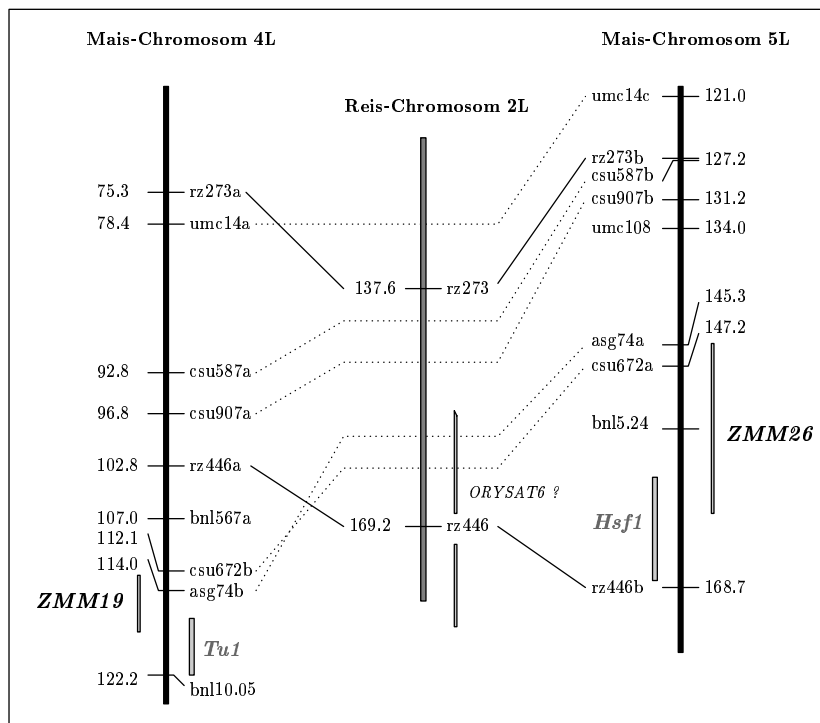


Abbildung 4.2: Die Loci *ZMM19* und *ZMM26* liegen in homologen Bereichen der Mais-Chromosomen 4 und 5 (nur Abschnitte aller Chromosomen gezeigt, Mais-Chromosomen schwarz und Reis-Chromosom 2 grau dargestellt). Die Zuordnung zu chromosomalen Orten beruht auf der *University of Missouri, Columbia* UMC-EST-Karte [DAVIS et al. 1999], für Mais und der *RiceGenes*-Karte (<http://ars-genome.cornell.edu/rice>) für Reis. Die Loci der Maisgene und der vermutete Locus von *ORYSAT6* sind durch vertikale graue Boxen, die Loci der Mutanten *Tu1* und *Hsf1* sind durch breitere vertikale graue Boxen eingezeichnet. Zahlen an den Loci sind *map units* in cM. Homologe Marker sind durch Linien verbunden, gestrichelte Linien verbinden die Mais-Chromosomen, dünne durchgezogene Linien verbinden Mais-Chromosomen mit dem Reis-Chromosom.

untereinander und mit anderen Genen.

### 4.3.2 *ZMM19* und *ZMM26* sind rezente Paraloge

Da *ZMM19* und *ZMM26* einen besonders hohen Grad an Sequenzähnlichkeit aufweisen (s. Tab. 3.1), liegt die Vermutung nahe, dass es sich, wie in verschiedenen anderen Fällen, z. B. *ZMM8* und *ZMM14* [CACHARRÓN 1998], um ein junges Paar paraloger Gene handelt, das bei der Entstehung von Mais durch eine Hybridisierung zweier sehr ähnlicher Genome vor 21 Millionen Jahren entstanden ist [GAUT und DOEBLEY 1997]. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Untersuchung angrenzender molekularer Marker der jeweiligen chromosomalen Regionen (s. Abb. 4.2). Die Marker sind mit der Ausnahme einer Inversion kollinear angeordnet.

Da die Stammbaumanalyse beide Gene zusammen mit *ORYSAT6* in eine Subklade platziert, handelt es sich bei dem Reisingen vermutlich um ein orthologes Gen zu dem Mais-Genpaar. Diese Vermutung könnte durch eine Kartierung des Reisingens geprüft werden. Nach vergleichenden Kartierungen von molekularen Markern im Reis- und Maisgenom [WILSON et al. 1999] sind die Regionen um die Maisgene *ZMM19* und *ZMM26* homolog zu einer Region auf dem langen Arm von Reis-chromosom 2. Nach den Reis-Chromosomenkarten der *RiceGenes*-Gendatenbank (<http://ars-genome.cornell.edu/rice>) sollte *ORYSAT6* in der Nähe von Marker rz446 (Reis-Chromosom 2; Position 169,2 cM) gefunden werden (vgl. Abb. 4.2).

### 4.3.3 Haben *ZMM19* und *ZMM26* redundante Funktionen?

Durch seinen allotetraploiden Ursprung besitzt Mais eine große Anzahl paraloger Genpaare. Für das Paar *ZMM19* und *ZMM26* war an einigen Stellen der Untersuchungen von Interesse, ob sie redundante Funktionen haben. Es stellt sich also die Frage, welche evolutionäre Kräfte auf ein solches Genpaar wirken. Die Gene *ZMM19* und *ZMM26* zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster, was die Vermutung nahelegt, dass die Funktion der beiden Gene sehr ähnlich geblieben ist. Im Fall einer Diversifizierung von durch Polyploidisierung generierten Genpaaren wird beobachtet, dass die stärksten Unterschiede in der Entwicklung von neuen Expressionsmustern zu erwarten sind [WENDEL 2000]. Diversifizierung ist aber nicht die einzige Möglichkeit der Evolution zweier Gene gleicher Funktion, sondern es kann auch ein Gen ausgeschaltet werden bzw. es werden Fälle beobachtet, wo beide Genkopien erhalten bleiben und beide Gene unter Selektionsdruck mit normaler Rate weiter evolvieren. Diese Beobachtung wird darauf zurückgeführt, dass in polyploiden Organismen das Transkript- bzw. Proteinniveau auf das Vorhandensein zweier Genkopien optimiert wird. Fällt später eine Kopie aus, so wird das regulatorische Netzwerk aus dem Gleichgewicht gebracht [WENDEL 2000]. Diese Erklärung wird dadurch plausibel, dass in Polyploiden das Expressionsniveau oft positiv mit der Anzahl an Genkopien korreliert ist. Da beobachtet wird, dass *ZMM19* und *ZMM26* an gleichen Orten exprimiert werden, ist demnach zu erwarten, dass beide Gene relativ redundante Funktionen haben.

Eine Idee über die Funktion von *ZMM19*, nämlich die Auslösung eines vegetativen Programms, wurden aus der Analyse der *Tu1*-Mutante gewonnen. Auch für *ZMM26* ist möglicherweise eine Mutante bekannt, *Hsf1* (vgl. Abb. 4.2). Da auch diese Mutante dominant ist, wäre auch hier eine Überexpression, nämlich von *ZMM26*, Ursache des Phänotyps. Der *Hsf1*-Phänotyp unterscheidet sich vom *Tu1*-Phänotyp. Das muss aber nicht bedeuten, dass beide Gene unterschiedliche Funktionen haben, sondern könnte auch durch unterschiedliche ektopische Expressionsmuster erklärt werden. *Hsf1* zeigt blattscheiden-

artige Auswüchse auf den Blattspreiten. Auch diese Mutante scheint also Blattscheiden-Identität ektopisch zu realisieren. Diese Ähnlichkeit könnte auf eine gemeinsame Funktion von *ZMM19* und *ZMM26* hindeuten, dafür wäre jedoch zuerst nachzuweisen ob *ZMM26* mit *Hsf1* identisch ist und *ZMM19* mit *Tu1*.

Auch durch die Herstellung von *knock-out*-Mutanten könnte die Redundanz der Funktionen überprüft werden. Im Falle der Redundanz sollte eine einfache *knock-out*-Mutante keinen veränderten Phänotyp aufweisen. Erst die Doppel-*knock-out*-Mutante, d. h. sowohl *ZMM19-knock-out* als auch *ZMM26-knock-out*, sollte einen veränderten Phänotyp haben. Auf der Grundlage der vorliegenden Informationen kann über deren Aussehen nur spekuliert werden. Da *ZMM19* möglicherweise die Nodien- und Blattscheiden-Identität determiniert und/oder die vegetative Phase verlängert, könnten die Pflanzen gedrungener sein, weil die Ausbildung von Blattscheiden ausbliebe oder reduziert wäre und die meristematischen Aktivitäten in Blatt und Nodien reduziert wären. Außerdem könnte die Doppelmutante eine weniger prominente vegetative Phase haben und daher früher blühen, wie das für die *SVP-knock-out*-Mutante beobachtet wird [HARTMANN et al. 2000].

#### **4.3.4 Welche gemeinsame Funktion hat die *STMADS11*-Subfamilie, und welche Unterschiede gibt es zwischen den Untergruppen?**

Alle untersuchten *STMADS11*-ähnliche Gene, mit Ausnahme von *AGL24*, besitzen ein konserviertes Sequenzmotiv in der C-Region (s. Anhang D.2). Die Bedeutung dieses Motivs ist nicht bekannt, die starke Konservierung lässt jedoch auf eine wichtige Rolle des Motivs schließen und deutet auf eine Gemeinsamkeit in der Wirkungsweise aller dieser Gene hin, wie z. B. ein gleichartiger posttranslationaler Regulationsmechanismus oder Interaktionen mit Partnerproteinen bei der Bildung größerer Komplexe [EGEA-CORTINES et al. 1999]. Für zwei Mitglieder der Subfamilie, nämlich *SVP* und *BMI*, wurde alternatives Spleißen nachgewiesen. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass *AGL24* das konservierte Motiv in der C-Region nur deswegen nicht aufweist, weil die in *GenBank* vorliegende Sequenz eine kurze Spleißform darstellt und das längere Transkript nicht bekannt ist.

Die untersuchten *STMADS11*-ähnlichen Gene zeigen Expression in vegetativen Pflanzenteilen, eine Funktion an diesen Orten ist wahrscheinlich. Die bisher untersuchten Gene aus Eudikotylen werden in nahezu allen vegetativen Organen exprimiert, d. h. in Wurzel, Stängel und Blättern [CARMONA et al. 1998, HARTMANN et al. 2000, GARCIA-MAROTO et al. 2000, MAO et al. 2000]. Eine zeitliche Differenzierung der Expression ist nicht zu erkennen. Die bekannten Gene aus Monokotylen zeigen eine gewisse Spezialisierung in Bezug auf ihre Expressionsorte. *BMI* wird hauptsächlich in

Nodien und Blattscheiden exprimiert [SCHMITZ et al. 2000]. Eine ähnliche Spezifität wurde auch für *ZMM20* gefunden, allerdings wird dieses Gen als einziges der untersuchten Maisgene auch in Wurzel exprimiert (s. Abb. 3.2). Nach Stammbaumanalyse sind *ZMM20* und *BMI* putative Orthologe (s. Abb. 3.11). Die drei anderen Maisgene werden nicht oder kaum in Wurzel exprimiert (s. Abb. 3.2).

Eine detailliertere Analyse der Expressionsorte der Mais-Gene mittels *in situ*-Hybridisierung ließe weitere Schlüsse auf die Funktion der Gene in monokotylen Pflanzen zu. So ist z.B. die Expression von *ZMM19* in Nodien und Internodien gezeigt, ob aber eine Gewebespezifität innerhalb dieser Organe vorhanden ist, wie für *STMADS11* im Stängel gefunden [CARMONA et al. 1998], ist nicht bekannt. Aus den Untersuchungen an *Tu1-A158*-Kolben bzw. Ährchen ist eine präferentielle Expression in lateralen Regionen der Primordien, zumindest nicht in *KN1*-exprimierenden Meristemen, zu erkennen (vgl. Abb. 3.9). Möglicherweise sind die lateralen Regionen mit den Phytomer-Initialzellen identisch, möglicherweise mit den Blatt-Initialen oder aber mit keiner dieser Zellgruppen.

Weitere Ideen über die Aufgabe der Subfamilie kann man aus der Analyse von Mutanten gewinnen.

Die *short vegetative phase*-Mutante (*svp*) von *Arabidopsis* zeigt, wie der Name andeutet, einen frühblühenden Phänotyp. Die Mutationen wurden durch Insertion eines *En*-Elementes in die kodierende Region bzw. durch ein unvollständiges Ausschneiden des Elementes aus dieser Region verursacht und führten zu Funktionsverlust [HARTMANN et al. 2000]. Durch diese Mutationen wird ein schnelleres Durchlaufen der vegetativen Phase hervorgerufen, was an der geringeren Anzahl an Rosettenblättern und Hochblättern, der schnelleren Transition von juveniler zur adulten Blattform und, damit gekoppelt, der frühen Trichom-Bildung auf den abaxialen Seiten der Rosettenblätter zu erkennen ist. Dieser Phänotyp ist insbesondere unter Kurztagsbedingungen festzustellen, aber in abgeschwächter Form auch unter Langtagsbedingungen. Die Pflanzen bleiben also Photoperioden-sensitiv [HARTMANN et al. 2000].

Die 35S::*STMADS16*-sense-Tabakpflanzen wurden wegen ihrer Parallelen mit der *Tu1*-Mutante schon erwähnt. Die Überexpression von *STMADS16* führt zu keinen phänotypischen Veränderungen während der vegetativen Entwicklung. Die vegetative Phase wird allerdings unter Kurztagbedingungen beschleunigt, es kommt zu früher Blüte. In der Infloreszenz wird eine stärkere Verzweigung und eine Umwandlung von Kelchblättern in Blätter beobachtet [GARCIA-MAROTO et al. 2000].

Eine weitere Mutante ist *jointless*, eine *loss-of-function*-Mutante, die durch eine Deletion des ersten Exons des *JOINTLESS*-Gens der Tomate hervorgerufen wird. Die mutanten Pflanzen bilden keine Abscissionsschichten im Stiel der Früchte. Außerdem revertiert

das Infloreszenzmeristem nach der Bildung von nur wenigen Blüten zurück zu einem vegetativen Meristem [MAO et al. 2000].

Die *Tu1*-Mutante, also vermutlich eine *ZMM19*-Überexpressions-Mutante, hat keinen Einfluss auf Blütezeit. Der Phänotyp der Mutante wurde bereits hinreichend dargestellt.

Vorläufige Überexpressions-Studien von *ZMM19* unter Kontrolle des 35S-Promotors in *Arabidopsis* (T. MÜNSTER, W. FAIGL, W. DELEU, S. WERTH und L. WINGEN) zeigen eine Veränderung der Blattformen in den transgenen Pflanzen. Die Hochblätter zeigen eine Rosettenblatt-ähnliche Form, und die Kelchblätter sind stark vergrößert und wirken ebenfalls blattähnlich. In einigen Fällen konnten spätblühende Mutanten beobachtet werden.

Zusammengefasst kann zu den beobachteten Phänotypen gesagt werden, dass die Überexpression von *STMADS11*-ähnlichen Genen in einigen Organen zu einer Verstärkung des vegetativen Charakter führt. Welche Organe betroffen werden, ist wahrscheinlich von zwei Faktoren abhängig. Der erste Faktor ist die Kompetenz des Organs, ein vegetatives Programm umzusetzen. So werden z. B. Kelchblattprimordien in der *STMADS16*-Mutante stärker beeinflusst als Karpellprimordien. Der zweite Faktor ist die Spezifität des Gens. So verleiht *ZMM19* eher Blattidentität, während *STMADS16* stärker den Verzweigungshabitus beeinflusst.

Weiter wird ein Einfluss der Gene auf die Dauer der vegetativen Phase beobachtet. Die Funktionsverlust-Mutante *svp* wird in ihrer vegetativen Phase beschleunigt, während die Funktionsgewinn-Mutante *35S::STMADS16* unter Kurztagsbedingungen ebenfalls schneller blüht. Die Gene der *STMADS11*-Subfamilie scheinen demnach in den Prozess der Phasentransition involviert zu sein. In welcher Weise der Prozess beeinflusst wird, mag aber von Interaktionspartnern abhängen, die in den verschiedenen Pflanzenarten verschieden sein können, da die Pflanzen auch unterschiedlich auf Umweltbedingungen, wie z. B. Photoperiode, reagieren können. Für eine Abhängigkeit der *ZMM19*-Expression von Entwicklungs-Phasen sprechen die zwei Expressionsmaxima im Verlauf der vegetativen Entwicklung (s. Abb. 3.13).

Die Funktionen der *STMADS11*-ähnlichen Gene kann man also in zwei unterschiedliche Kategorien unterteilen. Zum einen sind sie in die Determinierung der Identität von vegetativen Organen involviert, wie z. B. die der Abscissionsschicht in Tomate [MAO et al. 2000], und zum anderen scheinen sie an der Regulation der Dauer der vegetativen Phasen beteiligt zu sein, wie z. B. die *svp*-Mutante zeigt [HARTMANN et al. 2000]. Die Gene aus Monokotylen zeigen ein stärker differenziertes Expressionsmuster als die aus Dikotylen. Dies kann bedeuten, dass diese Gene stärker an der Regulation der Organidentität beteiligt sind, und ihre Verwandten aus Dikotylen



ihre Aufgaben eher in der Regulation der Phasentransition haben. Der Phänotyp der *jointless*-Mutante spricht jedoch eher gegen diese Deutung, da hier trotz Expression in nahezu allen untersuchten Geweben, der Phänotyp hauptsächlich im Fehlen der Abscissionsschichten besteht. Möglicherweise steckt ein anderer Mechanismus hinter der Aktivität der *STMADS11*-ähnlichen Gene, nämlich die Aktivierung von Meristemen oder meristemartigen Geweben, eventuell mit Ausnahme des SAM. Der Ausfall des Genproduktes in *jointless* führt demnach zum Fehlen der Trennschichten, weil der Bildung der Trennschichten eine Zellproliferation vorausgeht. Die Reversion der Identität des Infloreszenzmeristems könnte darauf schließen lassen, dass in diesem Fall auch das Infloreszenzmeristem des Genproduktes bedarf, was in Einklang mit der Expression von *JOINTLESS* auch im Infloreszenz- und Blütenmeristem steht. Die untersuchten *gain-of-function*-Mutanten zeigen eine verstärkte Meristemaktivität, d. h. in Hochblättern von *Arabidopsis* werden z. B. die meristemartigen Randbereiche aktiviert, wodurch es zu runden anstelle von lanzettlichen Blattformen kommt. In *Tu1* kommt es zur Verlängerung der Hüllspelzen durch die Aktivität der eher basalen Meristemzonen. Ebenfalls durch meristemartige Aktivitäten kommt es zu Verlängerung von Infloreszenz-Seitenverzweigungen in *Tu1* und *35S::STMADS16*-Mutanten. Auch die Wildtyp-Expressionsmuster von *BM1* und *ZMM19* in Blattscheiden, und für *BM1* in einer einzelnen meristematischen Zellschicht des ersten Nodiums [SCHMITZ et al. 2000], mag auf eine Funktion in der Regulation der Meristemaktivität hindeuten, da diese Gewebe besonders stark an Wachstumsprozessen beteiligt sind.

An dieser Stelle kann nur darüber spekuliert werden, welche der erwähnten Aspekte tatsächlich von den *STMADS11*-ähnlichen Genen reguliert werden und welche durch Wechselwirkungen mit anderen Genen zu erklären sind. Sicherlich werden weitere Untersuchungen dieser interessanten Subfamilie einige Einsichten in die Regulation der vegetativen Pflanzenentwicklung vermitteln.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine große Zahl an indirekten Beweisen gesammelt, die die Vermutung unterstützen, dass das MADS-Box-Gen *ZMM19* vom *TUNICATE1*-Locus (*TU1*) kodiert wird.

Die *Tu1*-Mutante, auch Spelzmais genannt, ist eine der bekanntesten Mais-Mutanten überhaupt. Ihr phänotypisches Hauptmerkmal sind die langen, blattartig auswachsenden Hüllspelzen der weiblichen Maisinfloreszenz (Maiskolben), die die reifen Körner umgeben. Im Wildtyp sind diese Hüllspelzen unscheinbar und die Körner sitzen nackt auf dem Kolben. Auch die männliche Infloreszenz (Fahne) besitzt verlängerte Hüllspelzen, wenn auch hier der Phänotyp schwächer ausgeprägt ist. Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass die veränderten Hüllspelzen blattscheidenartige Charakteristiken entwickeln.

Am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung wurden vier bislang unbekannte Mais-MADS-Box-Gene identifiziert. Diese gehören zu der relativ neu entdeckten *STMADS11*-Subfamilie. MADS-Box-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, sie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Regulation der Blütenentwicklung der höheren Pflanzen, sind aber auch an anderen Regulationsprozessen beteiligt.

Die chromosomale Lokalisierung der Gene ergab, dass eines von ihnen, *ZMM19*, in der Nähe von *TU1* auf dem langen Arm des Mais-Chromosoms 4 kartiert.

*Tu1* hat einen codominanten *gain-of-function*-Phänotyp. Solche genetische Eigenschaften werden häufig durch die ektopische Expression von regulatorischen Genen hervorgerufen. Da *ZMM19* für einen mutmaßlichen Transkriptionsfaktor kodiert, wird es als Kandidaten-Gen für den *TU1*-Locus näher analysiert.

RNA-Blot-Experimente zeigten, dass *ZMM19* im Wildtyp stark in Blättern und Nodien exprimiert wird, nicht aber in Infloreszenzen. Für das Gen wurde daher eine Rolle in der vegetativen Entwicklung, mit einer hauptsächlichen Funktion in der Blattscheiden- und Nodien-Entwicklung, postuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens in *Tu1-A158*-Pflanzen verändert ist. In den mutanten Pflanzen findet man eine starke ektopische Expression des Gens in Kolben und Fahne, d. h. genau in den Strukturen, die phänotypisch verändert sind. Das Expressionsniveau von *ZMM19* ist positiv korreliert mit der Stärke der phänotypischen Veränderung.

Es sind mindestens drei aus *Tu1-A158*-Pflanzen hervorgegangene *Tu1*-Linien bekannt, die einen schwächeren Phänotyp zeigen. Auch für diese Pflanzen konnte gezeigt werden, dass es eine positive Korrelation zwischen Ausprägung des Phänotyps und dem ektopischen Expressionsniveau von *ZMM19* gibt.

Eine parallel zu dieser Arbeit durchgeführte DNA-Blot-Untersuchung einer segregierenden *Tu1*-Population (*Tu1/+* x *+/+*) von 43 Pflanzen zeigte, dass ein *ZMM19*-RFLP strikt mit dem Auftreten des *Tu1*-Phänotyps korreliert ist. Des Weiteren wurde begonnen *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* und wildtypische Allele zu sequenzieren, um die für die phänotypischen Effekte ursächlichen Sequenzunterschiede zu finden. Es wurde dabei festgestellt, dass die Allele in großen Teilen des untersuchten Bereichs keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Im 5'-Bereich der Allele aber, 336 bp stromauf vom Start-ATG, endet die Sequenzähnlichkeit zwischen ihnen. Im *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* wird dort eine DNA-Sequenz gefunden, die bis zu 55% Ähnlichkeit zu einem Bereich aus einem *MuDR*-Element besitzt.

Diese veränderte Sequenz wurde nahezu identisch in 12 untersuchten *Tu1*-Linien gefunden, auch in den drei Linien mit schwächer ausgeprägtem Phänotyp. Parallel zu dieser Arbeit durchgeführte DNA-Blot-Untersuchungen mit *Tu1-A158* und den drei schwächeren Linien konnten mit einer weiter stromauf bindenden *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Promotor-Sonde einen RFLP zwischen den Linien detektieren. Das lässt vermuten, dass Unterschiede in der 5'-Region von *ZMM19* verantwortlich für die unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen sind.

Durch einen *Single-Nucleotide-Polymorphism* (SNP) lässt sich das wildtypische *ZMM19<sup>W23M14</sup>*-Allel von einem *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel unterscheiden. Dieser Unterschied wurde ausgenutzt, um nachzuweisen, dass in heterozygoten *Tu1*-Pflanzen nur das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel ektopisch exprimiert wird. Hierdurch wird gezeigt, dass nicht eine allgemeine Hochregulierung von *ZMM19* die Ursache der ektopischen Expression ist, sondern dass nur der veränderte Locus spezifisch hochreguliert ist.

Die Gesamtheit der Ergebnisse ist konsistent mit der Erklärung, dass der *Tu1*-Phänotyp durch die Expression eines vegetativen Entwicklungsprogramms in den Infloreszenzen hervorgerufen wird, dessen Ursache die ektopische Expression von *ZMM19* auf Grund einer Veränderung in der Promotor-Region des *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allels ist. Nach dieser Erklärung ist *TU1* identisch mit *ZMM19*.

## 5.1 Kurz-Zusammenfassung

*Tunicate1* (*Tu1*) ist eine berühmte Mais-Mutante. Der wesentliche Phänotyp ist eine Verlängerung und blattscheidenartige Veränderung der sonst unscheinbaren Hüllspelzen in den Maiskolben.

Das Gen *ZMM19* kartiert in der Nähe von *TU1* auf Mais-Chromosom 4. *ZMM19* kodiert für einen putativen MADS-Domänen-Transkriptionsfaktor. RNA-Blot-Experimente zeigten, dass *ZMM19* im Wildtyp stark in Blattscheiden und Nodien exprimiert wird, nicht aber in Infloreszenzen. Für das Gen wird daher eine Rolle in der Regulation vegetativer Organidentität postuliert. In *Tu1-A158*-Pflanzen wurde eine ektopische Expression von *ZMM19* in Kolben und Fahne nachgewiesen, d. h. genau in den phänotypisch veränderten Strukturen. Das *ZMM19*-Expressionsniveau ist positiv korreliert mit der Stärke der phänotypischen Ausprägung.

Durch die partielle Sequenzierung der *ZMM19*-Allele von WT und *Tu1* wurde gezeigt, dass die putative Promotor-Region des *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allels eine Insertion eines *MuDR*-ähnlichen Fragmentes aufweist.

Mit Hilfe eines *Single-Nucleotide-Polymorphism* der *ZMM19*-Allele ließ sich zeigen, dass in heterozygoten Pflanzen nur das *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allel ektopisch exprimiert wird, d. h. die Hochregulierung von *ZMM19* ist durch die Veränderung der Promotor-Region bedingt.

Die Gesamtheit der Ergebnisse ist konsistent mit der Erklärung, dass der *Tu1*-Phänotyp durch die Expression eines vegetativen Entwicklungsprogramms in den Infloreszenzen hervorgerufen wird, dessen Ursache die ektopische Expression von *ZMM19* auf Grund einer Veränderung in der Promotor-Region des *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*-Allels ist.

## 5.2 Abstract

*Tunicate1* (*Tu1*) or pod corn is a well-known maize mutant. The most prominent phenotype is the elongation and the leaf-sheath-like transformation of the normally minute glumes in the cob.

The gene *ZMM19* is located near *TU1* on maize chromosome 4. *ZMM19* encodes a putative MADS-domain transcription factor. RNA-blot analysis showed that in wildtype *ZMM19* is expressed strongly in leaf-sheaths and nodes, but not in inflorescences. Thus a role in regulation of vegetative organ identity is suggested for *ZMM19*. Ectopic expression of *ZMM19* is found in ear and tassel of *Tu1-A158*-plants, in exactly those structures which are phenotypically altered in the mutant. The expression level of *ZMM19* is positively correlated with the strength of phenotypic change.

*ZMM19* alleles from wildtype and *Tu1* were partially sequenced in parallel to this work, and it was shown that *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* is changed by an insertion of a *MuDR*-like transposon fragment upstream of transcription start site.

Using a single nucleotide polymorphism, it was demonstrated that in heterozygous plants only *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>* is ectopically expressed. Thus it was shown that the upregulation is specific for the altered promoter region.

The most simple and consistent explanation for all these findings is that the *Tu1* phenotype is caused by the expression of a program for vegetative development in the inflorescences, which is caused by the ectopic expression of *ZMM19* due to changes in the promoter region of the *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*.

# Literaturverzeichnis

- [AMBROSE et al. 2000] AMBROSE, B. A., D. R. LERNER, P. CICERI, M. P. CHRISTOPHER, M. PADILLA, M. F. YANOFSKY und R. J. SCHMIDT (2000). *Molecular and Genetic Analyses of the silky1 Gene Reveal Conservation in Floral Organ Specification Between Eudicots and Monocots*. *Molecular Cell*, 5:569–579.
- [BARAKAT et al. 1997] BARAKAT, A., N. CARELS und G. BERNARDI (1997). *The Distribution of Genes in the Genomes of Gramineae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:6857–6861.
- [BEADLE 1939] BEADLE, G. W. (1939). *Teosinte and the Origin of Maize*. *Journal of Heredity*, 30:245–247.
- [BECKER et al. 2000] BECKER, A., K.-U. WINTER, B. MEYER, H. SAEDLER und G. THEISSEN (2000). *MADS-Box Gene Diversity in Seed Plants 300 Million Years Ago*. *Molecular Biology and Evolution*, 17:1425–1434.
- [BELL und BRYAN 1991] BELL, A. D. und A. BRYAN (1991). *An Illustrated Guide to Flowering Plant Morphology*. Oxford University Press.
- [BERTRAND-GARCIA und FREELING 1991] BERTRAND-GARCIA, R. und M. FREELING (1991). *Hairy-sheath-frayed1-0: A Systemic, Heterochronic Mutant of Maize That Specifies Slow Developmental Stage Transitions*. *American Journal of Botany*, 78:747–765.
- [BIRD und NEUFFER 1985] BIRD, R. M. und M. G. NEUFFER (1985). *Location of Four New Dominant Mutants*. *MNL*, 59:42.
- [BURR und BURR 1991] BURR, B. und F. A. BURR (1991). *Recombinant Inbreds for Molecular Mapping in Maize: Theoretical and Practical Considerations*. *Trends in Genetics*, 7:55–60.
- [CACHARRÓN 1998] CACHARRÓN, J. (1998). *MADS-Box-Gene in Zea mays: Vergleichende Expressionsuntersuchung an Modellen paraloger und orthologer Genpaare*. Doktorarbeit, Universität zu Köln.

- [CACHARRÓN et al. 1999] CACHARRÓN, J., H. SAEDLER und G. THEISSEN (1999). *Expression of MADS-Box Genes ZMM8 and ZMM14 During Inflorescence Development of Zea mays Discriminates Between the Upper and the Lower Floret of Each Spikelet*. *Development, Genes and Evolution*, 209:402–411.
- [CARMONA et al. 1998] CARMONA, M. J., N. ORTEGA und F. GARCIA-MAROTO (1998). *Isolation and Molecular Characterization of a New Vegetative MADS-Box Gene from Solanum tuberosum L.* *Planta*, 207:181–188.
- [CHENG et al. 1983] CHENG, P. C., R. I. GREYSON und D. B. WALDEN (1983). *Organ Initiation and the Development of Unisexual Flowers in the Tassel and Ear of Zea mays*. *American Journal of Botany*, 70:450–462.
- [CHUNG et al. 1994] CHUNG, Y.-Y., S.-R. KIM, D. FINKEL, M. F. YANOFSKY und G. AN (1994). *Early Flowering and Reduced Apical Dominance Result From Ectopic Expression of a Rice MADS-Box Gene*. *Plant Molecular Biology*, 26:657–665.
- [CHUNG et al. 1995] CHUNG, Y.-Y., S.-R. KIM, H.-G. KANG, Y.-S. NOH, M. C. PARK, D. FINKEL und G. AN (1995). *Characterization of Two Rice MADS-Box Genes Homologous to GLOBOSA*. *Plant Science*, 109:45–56.
- [CLIFFORD 1987] CLIFFORD, H. T. (1987). *Spikelet and Floral Morphology*. In „*Grass Systematics and Evolution*“, Soderstrom, T. R., Hilu, K. W., Campbell, C. S. and Barkworth, M. E. eds. Smithsonian Institution Press, Washington D. C.
- [COEN und MEYEROWITZ 1991] COEN, E. S. und E. M. MEYEROWITZ (1991). *The War of the Whorls: Genetic Interactions Controlling Flower Development*. *Nature*, 353:31–37.
- [COLANSANTI et al. 1998] COLANSANTI, J., Z. YUAN und V. SUNDARESAN (1998). *The indeterminate Gene Encodes a Zinc Finger Protein and Regulates a Leaf-Generated Signal Required for the Transition to Flowering in Maize*. *Cell*, 93:593–603.
- [COLLINS 1917] COLLINS, G. N. (1917). *Hybrids of Zea ramosa and Zea tunicata*. *Journal of Agricultural Research*, 9:383–413.
- [CONWAY und POETHIG 1993] CONWAY, L. J. und R. S. POETHIG (1993). *Heterochrony in Plant Development*. *Developmental Biology*, 4:65–72.
- [CUTLER 1944] CUTLER, H. C. (1944). *Medicine Men and the Preservation of a Relict Gene in Maize*. *Journal of Heredity*, 35:290–294.

- [DAVIS et al. 1999] DAVIS, G. L., M. D. McMULLEN, C. BAYSDORFER, T. MUSKET, D. GRANT, M. STAEBELL, G. XU, M. POLACCO, L. KOSTER, S. MELIA-HANCOCK, K. HOUCHINS, S. CHAO and E. H. COE JR. (1999). *A Maize Map Standard with Sequenced Core Markers, Grass Genome Reference Points and 932 Expressed Sequence Tagged Sites (ESTs) in a 1736-Locus Map*. *Genetics*, 152:1137–1172.
- [DOEBLEY 1990] DOEBLEY, J. (1990). *Molecular Evidence and the Evolution of Maize*. *Economic Botany*, 44:6–27.
- [EDWARDS et al. 1987] EDWARDS, M. D., C. STUBER und J. F. WENDEL (1987). *Molecular-Marker-Facilitated Investigations of Quantitative-Trait Loci in Maize. I. Numbers, Genomic Distribution and Types of Gene Action*. *Genetics*, 116:113–125.
- [EGEA-CORTINES et al. 1999] EGEA-CORTINES, M., H. SAEDLER und H. SOMMER (1999). *Ternary Complex Formation Between the MADS-Box Proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is Involved in the Control of Floral Architecture in *Antirrhinum majus**. *The EMBO Journal*, 18:5370–5379.
- [FOSTER et al. 1999] FOSTER, T., J. YAMAGUCHI, B. C. WONG, B. VEIT und S. HAKE (1999). *Gnarley1 is a Dominant Mutation in the *Knox4 Homeobox Gene Affecting Cell Shape and Identity**. *The Plant Cell*, 11:1239–1252.
- [GALINAT 1957] GALINAT, W.C. (1957). *The Effects of Certain Genes on the Outer Pistillate Glume of Maize*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 18:57–76.
- [GALINAT 1983] GALINAT, W.C. (1983). *The Origin of Maize as Shown by Key Morphological Traits of its Ancestor, *Teosinte**. *Maydica*, 28:121–138.
- [GANDRILLON et al. 1996] GANDRILLON, O., F. SOLARI, C. LEGRAND, J. P. und J. SAMARUT (1996). *A Rapid and Convenient Method to Prepare DIG-labelled RNA Probes for Use in Non-radioactive In situ Hybridization*. *Molecular Cellular Probes*, 10:51–55.
- [GARCIA-MAROTO et al. 2000] GARCIA-MAROTO, F., N. ORTEGA, R. LOZANO und M.-J. CARMONA (2000). *Characterization of the Potato MADS-Box Gene STMADS16 and Expression Analysis in Tobacco Transgenic Plants*. *Plant Molecular Biology*, 42:499–513.
- [GAUT und DOEBLEY 1997] GAUT, B. S. und J. F. DOEBLEY (1997). *DNA Sequence Evidence for the Segmental Allotetraploid Origin of Maize*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:6809–6814.



- [GOREMYKIN et al. 1997] GOREMYKIN, V.V., S. HANSMANN und W. F. MARTIN (1997). *Evolutionary Analysis of 58 Proteins Encoded in Six Completely Sequenced Chloroplast Genomes: Revised Molecular Estimates of Two Seed Plant Divergence Times*. *Plant Systematics and Evolution*, 206:337–351.
- [GRECO et al. 1997] GRECO, R., L. STAGI, L. COLOMBO, A. G. C., M. SARI-GORLA und PÈ (1997). *MADS-Box Genes Expressed in Developing Inflorescences of Rice and Sorghum*. *Molecular and General Genetics*, 253:615–623.
- [HAGEMANN und GLEISSBERG 1996] HAGEMANN, W. und S. GLEISSBERG (1996). *Organogenetic Capacity of Leaves: the Significance of of Marginal Blastozones in Angiosperms*. *Plant Systematics and Evolution*, 199:121–152.
- [HAKE 1992] HAKE, S. (1992). *Unraveling the Knots in Plant Development*. *Trends in Genetics*, 8:109–114.
- [HAKE et al. 1989] HAKE, S., E. VOLLBRECHT und M. FREELING (1989). *Cloning Knotted, the Dominant Morphological Mutant in Maize Using Ds2 as a Transposon Tag*. *The EMBO Journal*, 8:15–22.
- [HARTMANN et al. 2000] HARTMANN, U., S. HÖHMANN, K. NETTESHEIM, E. WISMAN, H. SAEDLER und P. HUIJSER (2000). *Molecular Cloning of SVP: a Negative Regulator of the Floral Transition in Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 21:351–360.
- [HAYES und CHANG 1939] HAYES, H. K. und M. S. CHANG (1939). *Recent Linkage Studies in Maize. II. Zebra-striped-6 (zb6)*. *Genetics*, 24:60.
- [HECK et al. 1995] HECK, G. R., S. E. PERRY, K. W. NICHOLS und D. E. FERNANDEZ (1995). *AGL15, a MADS-Domain Protein Expressed in Developing Embryos*. *The Plant Cell*, 7:1271–1282.
- [HERSHBERGER et al. 1991] HERSHBERGER, R.J., C. WARREN und V. WALBOT (1991). *Mutator Activity in Maize Correlates with the Presence and Expression of the Mu Transposable Element Mu9*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:10198–10202.
- [HEUER et al. 2000] HEUER, S., H. LÖRZ und T. DRESSSELHAUS (2000). *The MADS-Box Gene ZmMADS2 is Specifically Expressed in Maize Pollen and During Maize Pollen Tube Growth*. *Sexual Plant Reproduction*, 13:21–27.
- [ILTIS 1983] ILTIS, H. (1983). *From Teosinte to Maize: the Catastrophic Sexual Transmutation*. *Science*, 222:886–894.

- [JACKSON et al. 1994] JACKSON, D., B. VEIT und S. HAKE (1994). *Expression of Maize KNOTTED1 Related Homeobox Genes in the Shoot Apical Meristem Predicts Patterns of Morphogenesis in the Vegetative Shoot*. *Development*, 120:405–413.
- [JEON et al. 2000] JEON, J.-S., S. JANG, S. LEE, J. NAM, C. KIM, S.-H. LEE, Y.-Y. CHUNG, S.-R. KIM, Y. H. LEE, Y.-G. CHO und G. AN (2000). *leafy hull sterile1 is a Homeotic Mutation in a Rice MADS-Box Gene Affecting Rice Flower Development*. *The Plant Cell*, 12:871–884.
- [JOANIN et al. 1997] JOANIN, P., J. HERSHBERGER, M.-I. BENITO und V. WALBOT (1997). *Sense and Antisense Transcripts of the Maize MuDR Regulatory Transposon Localized by In situ Hybridization*. *Plant Molecular Biology*, 33:23–36.
- [JOHRI und COE JR. 1983] JOHRI, M. M. und E. H. COE JR. (1983). *Clonal Analysis of Corn Plant Development. I. The Development of the Tassel and the Ear Shoot*. *Developmental Biology*, 97:154–72.
- [KANG et al. 1998] KANG, H.-G., J.-S. JEON, S. LEE und G. AN (1998). *Identification of Class B and Class C Floral Organ Identity Genes From Rice Plants*. *Plant Molecular Biology*, 38:1021–1029.
- [KANG et al. 1995] KANG, H.-G., Y.-S. NOH, Y.-Y. CHUNG, M. A. COSTA, K. AN und G. AN (1995). *Phenotypic Alterations of Petal and Sepal by Ectopic Expression of a Rice MADS-Box Gene in Tobacco*. *Plant Molecular Biology*, 29:1–10.
- [KYOZUKA et al. 2000] KYOZUKA, J., T. KOBAYASHI, M. MORIATA und K. SHIMAMOTO (2000). *Spatially and Temporally Regulated Expression of Rice MADS-Box Genes with Similarity to Arabidopsis Class A, B and C Genes*. *Plant Cell Physiology*, 41:710–718.
- [LANGDALE et al. 1994] LANGDALE, J. A., E. E. IRISH und T. M. NELSON (1994). *Action of the Tunicate Locus on Maize Floral Development*. *Developmental Genetics*, 15:176–187.
- [LISCH et al. 1995] LISCH, D., P. CHOMET und M. FREELING (1995). *Genetic Characterization of the Mutator System in Maize: Behavior and Regulation of Mu Transposons in a Minimal Line*. *Genetics*, 139:1777–1796.
- [LOPEZ-DEE et al. 1999] LOPEZ-DEE, Z. P., P. WITTICH, E. PÈ, D. RIGOLA, I. DEL BUONO, M. S. GORLA, M. M. KATER und L. COLOMBO (1999). *OsMADS13, A Novel Rice MADS-Box Gene Expressed During Ovule Development*. *Developmental Genetics*, 25:237–244.

- [MANGELSDORF 1974] MANGELSDORF, P.C. (1974). *The Nature of the Pod-corn Locus in „Corn, Its Origin Evolution, and Improvement“*. Cambridge Belknap Press of Harvard University Press.
- [MANGELSDORF und GALINAT 1964] MANGELSDORF, P.C. und W. C. GALINAT (1964). *The Tunicate Locus in Maize Dissected and Reconstituted*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 51:147–150.
- [MAO et al. 2000] MAO, L., D. BEGUM, H.-W. CHUANG, M. A. BUDIMAN, E. J. SZYMKOWIAK, E. E. IRISH und R. A. WING (2000). *JOINTLESS is a MADS-Box Gene Controlling Tomato Flower Abscission Zone Development*. Nature, 406:910–913.
- [MCGINNIS und KUZIORA 1994] MCGINNIS und M. KUZIORA (1994). *The Molecular Architects of Body Design*. Scientific American, 270:36–42.
- [MENA et al. 1996] MENA, M., B. A. AMBROSE, R. B. MEELEY, S. P. BRIGGS, M. F. YANOFSKY und R. J. SCHMIDT (1996). *Diversification of C-Function Activity in Maize Flower Development*. Science, 274:1537–1540.
- [MENA et al. 1995] MENA, M., M. A. MANDEL, D. R. LERNER, M. F. YANOFSKY und R. J. SCHMIDT (1995). *A Characterization of the MADS-Box Gene Family in Maize*. The Plant Journal, 8:845–854.
- [MOON et al. 1999] MOON, Y. H., J.-Y. JUNG, H.-G. KANG und G. AN (1999). *Identification of a Rice APETALA3 Homologue by Yeast Two Hybrid Screening*. Plant Molecular Biology, 40:167–177.
- [MOOSE und SISCO 1996] MOOSE, S. P. und P. H. SISCO (1996). *Glossy15 an APETALA2-like Gene From Maize That Regulates Leaf Epidermal Cell Identity*. Genes and Development, 10:3018–3027.
- [MÜLLER et al. 1995] MÜLLER, K. J., N. ROMANO, O. GERSTNER, F. GARCIA-MAROTO, C. POZZI, F. SALAMINI und W. ROHDE (1995). *The Barley Hooded Mutation Caused by a Duplication in a Homeobox Gene Intron*. Nature, 374:727–730.
- [MÜNSTER et al. 1997] MÜNSTER, T., J. PAHNKE, A. DI ROSA, J. T. KIM, W. MARTIN, H. SAEDLER und G. THEISSEN (1997). *Floral Homeotic Genes Were Recruited from Homologous MADS-Box Genes Preexisting in the Common Ancestor of Ferns and Seed Plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94:2415–2420.

- [MÜNSTER et al. 2000] MÜNSTER, T., L. U. WINGEN, W. FAIGL, S. WERTH, H. SAEDLER und G. THEISSEN (2000). *Characterization of Three GLOBOSA-like MADS-Box Genes From Maize: Evidence for Ancient Paralogy in One Class of Floral Homeotic B-function Genes of Grasses*. *Gene*, in press.
- [NEUFFER et al. 1997] NEUFFER, G., E. COE und W. S. (1997). *Mutants of Maize*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- [POETHIG 1987] POETHIG, R. S. (1987). *Dosage Analysis of Tunicate*. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 61:85.
- [POETHIG 1997] POETHIG, R. S. (1997). *Leaf Morphogenesis in Flowering Plants*. *The Plant Cell*, 9:1077–1087.
- [POETHIG und SZYMKOWIAK 1995] POETHIG, R. S. und E. J. SZYMKOWIAK (1995). *Clonal Analysis of Leaf Development in Maize*. *Maydica*, 40:67–76.
- [PURUGGANAN 1997] PURUGGANAN, M. D. (1997). *The MADS-Box Floral Homeotic Gene Lineages Predate the Origin of Seed Plants: Phylogenetic and Molecular Clock Estimates*. *Journal of Molecular Evolution*, 45:392–396.
- [RABINOWICZ et al. 2000] RABINOWICZ, P. D., E. L. BRAUN, A. D. WOLFE, B. BOWEN und E. GROTEWOLD (2000). *Maize R2R3 Myb Genes: Sequence Analysis Reveals Amplification in the Higher Plants*. *Genetics*, 153:427–444.
- [RADICELLA et al. 1992] RADICELLA, J. P., D. BROWN, L. A. TOLAR und V. L. CHANDLER (1992). *Allelic Diversity of the Maize B Regulatory Gene: Different Leader and Promoter Sequences of Two B Alleles Determine Distinct Tissue Specificities of Anthocyanin Production*. *Genes & Development*, 6:2152–2164.
- [REISER et al. 2000] REISER, L., P. SÁNCHEZ-BARACALDO und S. HAKE (2000). *Knots in the Family Tree: Evolutionary Relationships and Functions of Knox Homeobox Genes*. *Plant Molecular Biology*, 42:151–166.
- [RIECHMANN und MEYEROWITZ 1997] RIECHMANN, J. L. und E. M. MEYEROWITZ (1997). *MADS-Domain Proteins in Plant Development*. *Biological Chemistry*, 378:1079–1101.
- [ROUNSLEY et al. 1995] ROUNSLEY, S. D., G. S. DITTA und M. F. YANOFSKY (1995). *Diverse Roles for MADS-Box Genes in Arabidopsis Development*. *Plant Cell*, 7:1259–1269.

- [SAINT-HILAIRE 1829] SAINT-HILAIRE, A. (1829). *Lettre sur une Variété Remarquable de Maïs du Brésil*. Annales des Sciences Naturelles, 16:143–145.
- [SAMBROOK et al. 1989] SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- [SANMIGUEL et al. 2000] SANMIGUEL, P., B. S. GAUT, A. TIKHONOV, Y. NAKAJIMA und J. L. BENNETZEN (2000). *The Paleontology of Intergene Retrotransposons of Maize*. Nature Genetics, 20:43–45.
- [SCANLON und FREELING 1998] SCANLON, M. J. und M. FREELING (1998). *The Narrow Sheath Leaf Domain Deletion: a Genetic Tool Used to Reveal Developmental Homologies Among Modified Maize Organs*. The Plant Journal, 13:547–561.
- [SCHMIDT und AMBROSE 1998] SCHMIDT, R. J. und B. A. AMBROSE (1998). *The Blooming of Grass Flower Development*. Current Opinions in Plant Biology, 1:60–67.
- [SCHMIDT et al. 1993] SCHMIDT, R. J., B. VEIT, M. A. MANDEL, M. MENA, S. HAKE und M. F. YANOFSKY (1993). *Identification and Molecular Characterization of ZAG1, the Maize Homolog of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene AGAMOUS*. Plant Cell, 5:729–737.
- [SCHMITZ et al. 2000] SCHMITZ, J., R. FRANZEN, T. H. NGYUEN, F. GARCIA-MAROTO, C. POZZI, F. SALAMINI und W. ROHDE (2000). *Cloning, Mapping and Expression Analysis of Barley MADS-Box Genes*. Plant Molecular Biology, 42:899–913.
- [SCHNEEBERGER et al. 1995] SCHNEEBERGER, R., P. W. BECRAFT, S. HAKE und M. FREELING (1995). *Ectopic Expression of the Knox Homeobox Gene Rough Sheath1 Alters Cell Fate in the Maize Leaf*. Genes and Development, 9:2292–2304.
- [SCHWARZ-SOMMER et al. 1984] SCHWARZ-SOMMER, Z., A. GIERL, R. B. KLÖSGEN, U. WIENAND, P. A. PETERSON und H. SAEDLER (1984). *The Spm (En) Transposable Element Controls the Excision of a 2-kb DNA Insert at the wx<sup>m-8</sup> Allele of Zea mays*. The EMBO Journal, 3:1021–1028.
- [SCHWARZ-SOMMER et al. 1990] SCHWARZ-SOMMER, Z., P. HUIJSER, W. NACKEN, H. SAEDLER und H. SOMMER (1990). *Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in Antirrhinum majus*. Science, 250:931–936.

- [SELINGER und CHANDLER 1999] SELINGER, D. A. und V. L. CHANDLER (1999). *Major Recent and Independent Changes in Levels and Patterns of Expression Have Occurred at the B Gene, a Regulatory Locus in Maize*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:15007–15012.
- [SHELDON et al. 1999] SHELDON, C. C., J. E. BURN, P. P. PEREZ, J. METZGER, J. A. EDWARDS, W. J. PEACOCK und E. S. DENNIS (1999). *The FLF MADS-Box Gene: A Repressor of Flowering in Arabidopsis Regulated by Vernalization and Methylation*. The Plant Cell, 11:445–458.
- [SMITH und HAKE 1992] SMITH, L. G. und S. HAKE (1992). *The Initiation and Determination of Leaves*. Plant Cell, 4:1017–1027.
- [SYLVESTER et al. 1990] SYLVESTER, A. W., W. Z. CANDE und M. FREELING (1990). *Division and Differentiation During Normal and liguleless-1 Maize Leaf Development*. Development, 110:985–1000.
- [THEISSEN et al. 2000] THEISSEN, G., A. BECKER, A. DI ROSA, A. KANNO, J. T. KIM, T. MÜNSTER, K.-U. WINTER und H. SAEDLER (2000). *A Short History of MADS-Box Genes in Plants*. Plant Molecular Biology, 42:115–149.
- [THEISSEN et al. 1996] THEISSEN, G., J. T. KIM und H. SAEDLER (1996). *Classification and Phylogeny of the MADS-Box Multigene Family Suggest Defined Roles of MADS-Box Gene Subfamilies in the Morphological Evolution of Eukaryotes*. Journal of Molecular Evolution, 43:484–516.
- [THEISSEN und SAEDLER 1999] THEISSEN, G. und H. SAEDLER (1999). *The Golden Decade of Molecular Floral Development (1990-1999): A Cheerful Obituary*. Developmental Genetics, 25:181–193.
- [THEISSEN et al. 1995] THEISSEN, G., T. STRATER, A. FISCHER und H. SAEDLER (1995). *Structural Characterization, Chromosomal Localization and Phylogenetic Evaluation of Two Pairs of AGAMOUS-like MADS-Box Genes From Maize*. Gene, 156:155–166.
- [TIKHONOV et al. 1999] TIKHONOV, A. P., P. J. SANMIGUEL, Y. NAKAJIMA, N. M. GORENSTEIN und J. L. BENNETZEN (1999). *Colinearity and Its Exceptions in Orthologous Adh Regions of Maize and Sorghum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:7409–7414.
- [TIMMERMANS et al. 1999] TIMMERMANS, M. C. P., A. HUDSON, P. W. BECRAFT und T. NELSON (1999). *rough sheath2: a Myb Protein That Represses Knox Homeobox Genes in Maize Lateral Organ Primordia*. Science, 284:151–153.

- [TRÖBNER et al. 1992] TRÖBNER, W., L. RAMIREZ, P. MOTTE, I. HUE, P. HUIJSER, W. E. LÖNNIG, H. SAEDLER, H. SOMMER und Z. SCHWARZ-SOMMER (1992). *GLOBOSA: a Homeotic Gene Which Interacts with DEFICIENS in the Control of Antirrhinum Floral Organogenesis*. The EMBO Journal, 11:4693–4704.
- [TSIANTIS et al. 1999] TSIANTIS, M., R. SCHNEEBERGER, J. F. GOLZ, M. FREELING und J. A. LANGDALE (1999). *The Maize rough sheath2 Gene and Leaf Development Programs in Monocot and Dicot Plants*. Science, 284:154–156.
- [VEIT et al. 1998] VEIT, B., S. P. BRIGGS, R. J. SCHMIDT, M. F. YANOFSKY und S. HAKE (1998). *Regulation of Leaf Initiation by the terminal ear1 Gene of Maize*. Nature, 393:166–167.
- [VEIT et al. 1993] VEIT, B., R. J. SCHMIDT, S. HAKE und M. F. YANOFSKY (1993). *Maize Floral Development: New Genes and Old Mutants*. The Plant Cell, 5:1205–1215.
- [VOLLBRECHT et al. 2000] VOLLBRECHT, E., L. REISER und S. HAKE (2000). *Shoot Meristem Size is Dependent on Inbred Background and Presence of the Maize Homeobox Gen, knotted1*. Development, 171:3161–3172.
- [VOLLBRECHT et al. 1991] VOLLBRECHT, E., B. VEIT, N. SINHA und S. HAKE (1991). *The Developmental Gene Knotted-1 is a Member of a Maize Homeobox Gene Family*. Nature, 350:241–243.
- [WALSH et al. 1997] WALSH, J., C. A. WATERS und M. FREELING (1997). *The Maize Gene liguleless2 Encodes a Basic Leucine Zipper Protein Involved in the Establishment of the Leaf Blade-sheath Boundary*. Development, 11:208–218.
- [WANG et al. 1999] WANG, R.-L., A. STEC, J. HEY, L. LUKENS und J. DOEBLEY (1999). *The Limits of Selection During Maize Domestication*. Nature, 398:236–239.
- [WEATHERWAX 1935] WEATHERWAX, P. (1935). *The Phylogeny of Zea mays*. The American Midland Naturalist, 16:1–71.
- [WENDEL 2000] WENDEL, J. F. (2000). *Genome Evolution in Polyploids*. Plant Molecular Biology, 42:225–249.
- [WILSON et al. 1999] WILSON, W. A., S. E. HARRINGTON, W. L. WOODMAN, M. LEE, M. E. SORRELS und S. R. MCCOUCH (1999). *Interferences on the Genome Structure of Progenitor Maize Through Comparative Analysis of Rice, Maize and the Domesticated Panicoids*. Genetics, 153:453–473.

- [WINTER et al. 1999] WINTER, K.-U., A. BECKER, T. MÜNSTER, J. T. KIM, H. SA-EDLER und G. THEISSEN (1999). *MADS-Box Genes Reveal That Gnetophytes Are More Closely Related to Conifers Than to Flowering Plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:7342–7347.
- [WOLFE et al. 1989] WOLFE, K.H. UND GOUY, M., Y.-M. YANG, P. SHARP und W.-H. LI (1989). *Date of the Monocot-Dicot Divergence Estimated From Chloroplast DNA Sequence Data*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86:6201–6205.



# Anhang A

## Nomenklatur

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur weicht von der von der US-amerikanischen Wissenschaftlergemeinschaft der Maisgenetik vorgeschlagenen ab ([http://www.agron.missouri.edu/maize\\_nomenclature](http://www.agron.missouri.edu/maize_nomenclature)), da diese nicht immer eindeutig ist und dadurch die Verständlichkeit dieser Arbeit gelitten hätte. Es wurden folgende Nomenklatur verwendet:

Begriff	Schreibweise	Beispiel
rezessive Mutante	Kleinbuchstaben; kursiv	<i>silky1, si1</i>
dominante Mutante	Erster Buchstabe groß, weiter in Kleinbuchstaben; kursiv	<i>Tunicate1, Tu1</i>
Protein	Großbuchstaben	ZMM19
Genlocus	Großbuchstaben; kursiv	<i>TUNICATE1, TU1</i>
Allel eines Locus	Genlocus mit hochgestelltem Allelnamen	<i>ZMM19<sup>W23M14</sup></i>

Wenn aus dem Zusammenhang hervorgeht, welcher Locus gemeint ist, werden folgende Vereinfachungen verwendet:

Wildtyp-Allel	Großbuchstaben; kursiv	<i>ZMM19</i>
rezessives Allel	Name der rezessiven Mutante mit Spezifizierung des Allels	<i>silky1-R, si1-R</i>
dominantes Allel	Name der dominanten Mutante mit Spezifizierung des Allels	<i>Tunicate1-A158, Tu1-A158</i>

Fremdsprachige Ausdrücke, mit Ausnahme der englischsprachigen Zusammenfassung, wurden in kursiven Buchstaben wiedergegeben, ebenso wie lateinische Speziesnamen. Personennamen wurden in Kapitälchen dargestellt. Computerprogrammnamen und URLs wurden in Schreibmaschinenschrift gesetzt. Produktnamen wurden in Anführungszeichen gesetzt.

# Anhang B

## Abkürzungen

35S	Promotor des <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
Abb.	Abbildung
al.	alii
bp	<i>base pair(s)</i> , Basenpaar(e)
BNL	Brookhaven National Laboratory
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIMMYT	<i>Centro International para Mejoramiento del Maíz y Triego</i> ; ( <a href="http://www.cimmyt.cgiar.org">http://www.cimmyt.cgiar.org</a> )
cm	Zentimeter
cM	Centimorgan
Denhardtts	Hybridisierungslösung [SAMBROOK et al. 1989]
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
<i>Hsf1</i>	<i>Hairy-sheath-frayed1</i>
IPK	Institut für Kulturpflanzenforschung, Gatersleben; ( <a href="http://www.ipk-gatersleben.de">http://www.ipk-gatersleben.de</a> )
kb	<i>kilo base (pairs)</i> , Kilobasen-(paare)
<i>Kn1</i>	<i>Knotted1</i>
l	liter
MADS	Akronym für eine konservierte DNA-Sequenz
m	meter oder milli

M	Mol
MGSC	<i>Maize Genetic Stock Center</i> , USA; ( <a href="http://w3.aces.uiuc.edu/maize-coop/">http://w3.aces.uiuc.edu/maize-coop/</a> )
MPIZ	Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MuDR	<i>Robertsons' Mutator Element</i> ; [HERSHBERGER et al. 1991]
$\mu$	mikro
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
p.a.	zur Analyse
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s.	siehe
SAM	Sprossapikalmeristem
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
<i>sil</i>	<i>silky1</i>
SNP	<i>Single-Nucleotide-Polymorphism</i>
SSC	Natrium-Citrat-Puffer [SAMBROOK et al. 1989]
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer [SAMBROOK et al. 1989]
TIR	<i>Terminal Inverted Repeat</i>
<i>Tu</i>	<i>Tunicate</i>
UMC	<i>University of Missouri, Columbia, USA</i> ( <a href="http://www.agron.missouri.edu">http://www.agron.missouri.edu</a> )
UTR	untranslatierter Bereich
URL	<i>Unique Resource Lokator</i>
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Allgemein übliche Abkürzungen für den Einbuchstaben-Aminosäurecode, für Nucleotide und chemische Substanzen wurden nicht aufgeführt.

# Anhang C

## Sequenzen

### C.1 cDNAs

Die Nukleinsäuresequenzen sind in den bezifferten Zeilen angegeben, die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen jeweils in der Zeile darunter.

#### C.1.1 cDNA-Sequenz von *ZMM19* (Klon wf4123, Maislinie T232)

```
1      CCTCTCCTCTCCTTCCGCATCACACACCACGACTCCCAACCGCCGGTTGGCTTTGCTGCT
61     CCGAGCTCTTTCCTCTTCCACACCCCGCCCTCTCTCTTGGGTCGGCGGCCGAGTGTCTGCGT
121    CGTCCACGGAGATCAGGGATCGGCGGGCGGGTATGGCGAGGGAGCGACGGGAGATAAAGA
                                     M A R E R R E I K R -
181    GGATAGAGAGCGCGGGCGGCGGCAGGTCAGTTCTCCAAGCGCCGCCGCGGCCTCTTCA
      I E S A A A R Q V T F S K R R R G L F K -
241    AGAAGGCTGAGGAGCTCTCCGTGCTGTGCGATGCCGACGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCT
      K A E E L S V L C D A D V A L I V F S S -
301    CCACGGGAAAGCTCTCCAGTTCGCCAGCTCCAGTATGAATGAGATCATTGACAAGTACA
      T G K L S Q F A S S S M N E I I D K Y S -
361    GCACACATTCTAAAAACCTGGGGAAAGCAGAACAGCCTTCACTTGACTTGAAGTGTAGAAC
      T H S K N L G K A E Q P S L D L N L E H -
421    ATAGCAAATATGCAAATTTGAATGAGCAACTTGTGGAAGCAAGCCTTCGACTCAGGCAGA
      S K Y A N L N E Q L V E A S L R L R Q M -
481    TGAGAGGTGAAGAAGTGTGAGGGATTGAGTGTGGAAGAAGTCCAGCAATTGGAGAAGAATC
      R G E E L E G L S V E E L Q Q L E K N L -
541    TGGAATCTGGTCTGCATAGGGTGTCTCAAACAAGGATCAACAATTCTTGAACAGATCA
      E S G L H R V L Q T K D Q Q F L E Q I S -
601    GCGACCTCGAACAAAAGAGTACACAAGTGGCAGAGGAGAACAGGCAACTGAGGAATCAAG
      D L E Q K S T Q L A E E N R Q L R N Q V -
661    TATCCACATACCCCCAGTTGGCAAGCAATCAGTTGCTGATACTGAAAATGTTATCGCTG
      S H I P P V G K Q S V A D T E N V I A E -
721    AAGATGGGCAATCCTCTGAATCAGTCATGACTGCGTTGCATTCTGGGAGTTCACAGGATA
      D G Q S S E S V M T A L H S G S S Q D N -
781    ATGATGATGGTTCGGATGTCTCTCTAAAATTAGGGCTGCCTTGTGTTGCATGGAAGTGAA
      D D G S D V S L K L G L P C V A W K * -
841    AAAACAAGATGGTCTGTGTTGATCTGGGTGGAGCTGCGGCTTCAGCAGATAGGCACTTGT
901    GTTATTGTCTTATGGACGACCCCGACTACTGCAATAATCTTGCATCGGAAGCGAGATCA
961    GTTAACCTGATTTGTATCCTTGTGGCTTCATGATGCGATGTTGCGCTTGTACCGTTTGC
1021   TAGGATGTTAACTGGACTAGAATCGTGTCTACTTTTGTACTGCTCGTGAATCCTATCTAC
```



### C.1.3 cDNA Sequenz von *ZMM21* (Klon wf4105, Maislinie T232)

```

1      TCGTGGGCGTAGGACGAGAGAGAGGATCGGCGGCGGCGTGTGGGAGATGGCGCGCGAGAG
                                         M A R E R -
61     GCGGGAGATACGGCGGATAGAGAGCGCGGCGGCGGGCAGGTGACCTTCTCCAAGCGCCG
      R E I R R I E S A A A R Q V T F S K R R -
121    GCGCGGGCTGTTCAAGAAGGCGGAGGAGCTCGCCGTGCTGTGCGACGCCGACGTCGCGCT
      R G L F K K A E E L A V L C D A D V A L -
181    CGTCGTGTTCTCCGCCACCGGCAGGCTCTCGCAGTTCGCGAGCTCCAGTGTGAATGACAT
      V V F S A T G R L S Q F A S S S V N D I -
241    CGTTGACAAGTACAGTACACATTCTAAGAATCTGGGGAAATCACATCAGCAGCCTTCTAT
      V D K Y S T H S K N L G K S H Q Q P S I -
301    TGATTTGAATGTAGAGCAGAGCAAATACAGCGGCTTGAACGAGCAACTTGCTGAAGAAAC
      D L N V E Q S K Y S G L N E Q L A E E T -
361    TAATGGACTTAGACAGATGAGAGGTGAAGACCTTGAGGGATTGAGTGTAGAGGAATTGCA
      N G L R Q M R G E D L E G L S V E E L H -
421    CCGAATGGAAAGGAAACTTGAAGCAGGACTGCATAGAGTGATTAGTACAAAGGACCAGCT
      R M E R K L E A G L H R V I S T K D Q L -
481    ATTCATGCAACAAATCGGCGAATTACTGCAAAAGGGCACACAGCTAGAAGATGAGAACAG
      F M Q Q I G E L L Q K G T Q L E D E N R -
541    GCGTCTAAAAGAACAAATGCCTCAGGTGCTAACGGCTGGCACAATGGTGGTTGCTGCTGC
      R L K E Q M P Q V L T A G T M V V A A A -
601    TGCAGAAAATATCCTCACTGAAGACGGGCAGTCGTCTGAATCTGTAATGACTGCATTGCA
      A E N I L T E D G Q S S E S V M T A L H -
661    TTCAGGAAGCTCGCTCGACTGTGATGATGGTTCCGATATATCCTTGAAGTTGTCGTTGCC
      S G S S L D C D D G S D I S L K L S L P -
721    TTGAAAGGAAGGACCATCGCATCGCATGTTATCTGCATGAGTGGGGCTGACACCAGTGCT
      *
781    TCTAAGAAGACAAAGACTGGGATAGTCCCATTTCGCGGCATTATATTGGTTTAACCAGATG
841    TGCTGTCCTTGTGCATGCTGTACTTCAAAGTGGCTAACCGGAAATTTGTATATATAAT.
901    AGTGTATGCGCTGCGTTATCTTCGTTCTAAAAATCTGTATTGTTTCGTTGCTGGTGCTAT
961    ATTTGTTGGTGTATTATATATATGCACCTAACTGTTATCTCTATTCTATTAAGAACATAA
1021   TATAGACACATGATGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

### C.1.4 partielle Sequenz von ZMM26 (Maislinie C)

```

1      CGATGGCGAGGGAGAGGGCGGGAGATAAAGAGGATAGAGAGCGCGGCAGCGAGGCAGGTCA
      M A R E R R E I K R I E S A A A R Q V T -
61     CGTTCTCCAAGCGCCCGCGGCCCTCTTCAAGAAGGCCAGGAGCTCTCCGTGCTGTGCG
      F S K R R R G L F K K A Q E L S V L C D -
121    ATGCCGACGTCGCGCTCATCGTCTTCTCCTCCACGGGGAAGCTCTCCAGTTCGCCAGCT
      A D V A L I V F S S T G K L S Q F A S S -
181    CCAGTATGAATGAGATAATTGACAAGTACAACACGCATTCTAAAAACCTGGGGAAAACAG
      S M N E I I D K Y N T H S K N L G K T E -
241    AACAGCCTTCGCTGGACTTGAACTTAGAGCATAGCAAATATGCAAATTTGAATGAGCAAC
      Q P S L D L N L E H S K Y A N L N E Q L -
301    TTGCGGAAGCAAGCCTTCGACTCAGGCAGATGAGAGGTGAAGAAGCTTGAGGGATTGAATG
      A E A S L R L R Q M R G E E L E G L N V -
361    TTGAAGAACTCCAGCAGTTGGAGAAGAACCTGGAATCTGGTCTGCATAGGGTGCTTCAA
      E E L Q Q L E K N L E S G L H R V L Q T -
421    CAAAGGATTCTCAATTCTTGAACAGATCAATGACCTCGAGCGTAAGAGTACGCAGCTGG
      K D S Q F L E Q I N D L E R K S T Q L A -
481    CAGAGGAGAACATGCAACTGAGAAATCAAGTATCCCAGATACCCCAGCTGGCAAGCAAG
      E E N M Q L R N Q V S Q I P P A G K Q A -
541    CAGTTGCTGATACTGAAAATGTTATTGCTGAAGAAGGGCAATCCTCTGAATCAGTGATGA
      V A D T E N V I A E E G Q S S E S V M T -
601    CTGCGTTGCACTCTGGGAGTTCACAGGATAATGATGGTGGTTCGGATGTATCTCTAAAGT
      A L H S G S S Q D N D G G S D V S L K L -
661    TAGGGCTGCCTTGCCTTGCATGGAAGTAAACAGGAAATGAGGCTCCTTGTGATTCTGGG
      G L P C V A W K *
721    TGTGGATGTGGGTGTGGGTGGAGCTGCGGCCTCAGCGGATAGGCACTTGTGTATGGTTTT
781    ATGGACGACCGGCCCGCCCGACTACGTACTGCAATAATCTTGCATTGGAAGCGAGATCGGTT
841    AACCTGATTTGTCATCCTTGTGGCTTCATGATGCGATGTTCCGCTTGTACCGTTTGCTAG
901    CATGTTAACTGAATTTTTAGAATCGCATATACTTTTGTCTTATATATCACTGTCGTA
961    GCTCGTAAGATGTATCTACTTTTATTCTATCCAATGTTGTAACCTATCACCTACCAACTTC
1021   CCTACTGTTTTGGCGCGCCGCAAGCTTTGCTCAAGCATGCTTCATGTTTGTAAAAAAA
1081   AAAAAAAA

```

## C.2 Oligonukleotide

Die meisten aufgelisteten Oligonukleotide (*Primer*) wurden für PCR-Experimente dieser Arbeit benutzt. Einige *Primer* wurden jedoch für die Erstellung von *in situ*-Hybridisierungs sonden verwendet, die nicht im experimentellen Teil dargestellt wurden. Der Vollständigkeit halber sind sie hier trotzdem erwähnt.

Wenn eine Position angegeben ist, so ist immer die erste/letzte Position der Oligonukleotid-Anbindung bezüglich des Translationsstarts (ATG = 1) des entsprechenden Gens bzw. der entsprechenden cDNA gemeint.

Unterstrichene Sequenzen sind T7- bzw. T3-Promotor-Sequenzen mit einer Verlängerung von 10 bp am 5'-Ende, die für die Anbindung der Polymerasen notwendig ist.

### Erstellung von *in vitro*-Transkriptionsvorlagen von Klonen in „pGEM-T“ und „pBluescriptIIKS/SK+“

pBS\_before\_T3 (5'- cggataacaa ttcacacag g -3')

pBS\_before\_T7 (5'- ggcgattaag ttgggtaacg -3')

Das resultierende PCR-Fragment schließt T3- und T7-Promotor-Sequenzen aus den Vektoren ein.

### Subklonierung von *ZMM19*-cDNA-Fragmenten in pBluescriptIIKS+

<i>Primer</i> -Name	Sequenz	Position
p_wf4123_1	(5'- ggtcggggggc ccagtgtctg c -3')	-55/-35
p_wf4123_2	(5'- cacggagagc tcctcagcc -3')	109/91
p_wf4123_3	(5'- gctgagggggc cctccgtgct g -3')	92/112
p_wf4123_4	(5'- cagaggagag ctcatcttca gcg -3')	584/562
p_wf4123_5	(5'- gctgaagatg ggcctcctc tg -3')	563/584
p_wf4123_6	(5'- catgcttgag ctcagcttac gg -3')	1000/979

Durch die *Primer* wurden Restriktionsschnittstellen eingefügt, wodurch gerichtet in den Vektor kloniert werden konnte (gerade Nummern: SacI, ungerade Nummern: ApaI). Dadurch ergibt sich, dass die *in vitro*-Transkription mit T7-Polymerase *antisense*-RNA-Moleküle und mit T3-Polymerase *sense*-RNA-Moleküle erzeugt.

### Erstellung von *in vitro*-Transkriptionsvorlagen von *ZMM20*-cDNA

<i>Primer</i> -Name	Sequenz	Position
p_wfe7a8_1_t7	(5'- <u>gccgaatggt</u> aatacactc actatagggc gaccggaacg gg -3')	85/94
p_wfe7a8_2_t3	(5'- ccaagcttca ttaaccctca ctaaagggag gctcctcag c -3')	524/514
p_wfe7a8_3_t7	(5'- <u>gccgaatggt</u> aatacactc actatagggc gagctgaagg agc -3')	514/524
p_wfe7a8_t3	(5'- <u>ccaagcttca</u> ttaaccctca ctaaagggag agccatgctg cc -3')	927/917



*In vitro*-Transkription mit T3-Polymerase erzeugt *antisense*-RNA-Moleküle und mit T7-Polymerase *sense*-RNA-Moleküle.

### Erstellung von *in vitro*-Transkriptionsvorlagen von ZMM21-cDNA

Primer-Name	Sequenz	Position
p_wf4105_1_t7	(5'- <u>gccgaatggt aatacgaactc actatagggc</u> gagtgggcgt agg -3')	-43/-33
p_wf4105_2_t3	(5'- <u>ccaagcttca ttaaccctca ctaaagggag</u> gttcaagccg c -3')	297/287
p_wf4105_3_t7	(5'- <u>gccgaatggt aatacgaactc actatagggc</u> gacggcttga acg -3')	285/295
p_wf4105_4_t3	(5'- <u>ccaagcttca ttaaccctca ctaaagggag</u> gcgagcttcc -3')	630/619
p_wf4105_5_t7	(5'- <u>gccgaatggt aatacgaactc actatagggc</u> gaagctcgt cg -3')	620/631
p_wf4105_6_t3	(5'- <u>ccaagcttca ttaaccctca ctaaagggag</u> acagttaagt gc -3')	949/938

*In vitro*-Transkription mit T3-Polymerase erzeugt *antisense*-RNA-Moleküle und mit T7-Polymerase *sense*-RNA-Moleküle.

### Erstellung von *in vitro*-Transkriptionsvorlagen von ZMM26-cDNA

Primer-Name	Sequenz	Position
p_zmm26_1_t7	(5'- <u>gccgaatggt aatacgaactc actatagggc</u> ggagctctcc gtg -3')	101/115
p_zmm26_2_t3	(5'- <u>ccaagcttca ttaaccctca ctaaagggag</u> gcccttctc agc -3')	577/567
p_zmm26_3_t7	(5'- <u>gccgaatggt aatacgaactc actatagggc</u> cctctgaatc agtg -3')	583/596
p_zmm26_4_t3	(5'- <u>ccaagcttca ttaaccctca ctaaagggag</u> ggtaggtgat agg -3')	1014/1002

*In vitro*-Transkription mit T3-Polymerase erzeugt *antisense*-RNA-Moleküle und mit T7-Polymerase *sense*-RNA-Moleküle.

### Primer für die Amplifikation der SNP-Region in ZMM19-cDNAs

Primer-Name	Sequenz	Position
ptm28	(5'- tccacgggaa agctctccca g -3')	147/168
ptm32	(5'- cttgcttcca caagttgctc attc -3')	311/287

### Primer für die diagnostische Tu1-PCR

Primer-Name	Sequenz	Position
allatgds	(5'- gcctgcctca taacatcctt tg -3')	-1063/-1042
wf52	(5'- gcgtggaggg aggacagctg c -3')	307/286
promZMM19700ds	(5'- cctgctgtca tgctgtgcg -3')	-438/-420
mutestus	(5'- gctccaattg gcaggtcggc -3')	-215/-234

Die Primer allatgds und wf52 wurden zum Nachweis der 5'-Region des ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>-Allels verwendet. PromZMM19700ds und wf52 wurden für die Kontroll-PCR eingesetzt, welche das wildtypische Allel nachweist. Allatgds, wf52 und mutestus wurden für die Sequenzierung der Fragmente verwendet.

# Anhang D

## Multiple-Sequence-Alignments

### D.1 MADS-Domäne

```
BM1  GK-ERIA-R- ---LAA---- ---R-F- --E---I--- ---G-AV--A T---FQ----
ZMM20 GK-ERIA-R- -D-LAA---- ---R-F- --E---I--- ---G-VV--A T---FH----
ZMM19 -A-ERR---- --SAAA---- ---R-F- --E----- -D---V--- T---SQ----
ZMM26 -A-ERR---- --SAAA---- ---R-F- --Q----- -D---V--- T---SQ----
ORYSAT6 -A-ERR---- --SAAA---- ---R-F- --E----- -D---V--- T---SH----
ZMM21 -A-ERR--R- --SAAA---- ---R-F- --E-A---- -D---VV--A T-R-SQ----
CANLIN1 -A-Q-IK--K -D-V-A---- ---R-IF- --E----- ---G-----A T---F-YP--
STMADS11 -V-Q-IQ--K -D-L-A---- ---R-F- --Q---T--- -DIG--V--A T---F-YS--
JOINTLESS -A-E-IQ--K -D-S-A---- ---R-F- --E----- -D----- T---FDYS--
PAUKAW1 -A-E-IQ--K -D-A-A---- ---R-IF- --E----- -D-G----- T---F-Y---
SVP -A-E-IQ-RK -D-A-A---- ---R-F- --E----- -D----- T---F--C--
AGL24 -A-E-IR--K -D-I-A---- ---R-IF- --D----- -D-----A T---F--S--
STMADS16 -A-E-IK--K -D-I-A---- ---R-F- --E----- -D----- T---FD---T
CICINT1 -A-E-IK-RK -D-I-A---- ---R- --E-A---- -D---V--A T---F-Y---
GGM12 -A-E-I--K -A-A-A---- ---R-F- --H--I--- ----- T---DYC--
LEAP3 -----F- --N--T---- -K-SIVMI-- T---H--I-P
STDEF -A---IQ--K ---Q----- Y-----F- --N--T---- -K-SIVMI-- T---H--I-P
AP3 -A---IQ--- ---Q----- Y-----F- --H--T---- -R-SI-M--- SN--H-YI-P
DEF -A---IQ--- ---Q----- Y-----F- --H----- -K-SI-MI-- TQ--H-YI-P
TM6 --I---K ---S----- Y-----IF- -RK--T---- -KIS--ML-- TR-YH-YT-P
OSMADS18 ---P-QLR- ---I----- ---H-I----- -D---V--T K-----S-H
OSMADS28 ---P-QLR- ---I----- ---H-I----- -D---V--T K-----S-H
BM3 ---P-QLR- ---I----- ---S----- -H-I----- ---V--P K---Y-TD
BM8 ---QL--- ---I----- ---H-I----- ---V--P K---Y-TD
ZAP1 ---QL--- ---I----- ---H-I----- ---V--P K---Y-TD
SBMADS2 --QL--- ---I----- ---H-I----- ---V--P K---Y-TD
ORYSAT2 ---QL--- ---I----- ---H-I----- ---A--V--P K---Y-TD
POTM1 ---R-QL--- ---I----- ---S----- -H-I----- ---G--V--T K---F-Y-ND
TM4 ---R-QL--- ---I----- ---S----- -H-I----- ---G--V--T K---F-Y-ND
ZMM15 ---QL--- ---I----- ---S----- -H-I----- ---G-----T K---Y-STD
ZMM4 ---QL--- ---I----- ---S----- -H-I----- ---G-----T K---Y-STD
TAMADS11 ---QL--- ---I----- ---S----- -H-I----- ---G-----T K---Y-STE
AGL8 ---R-QL--- ---I----- ---S----- -H-I----- ---V--- K---F-Y-STD
AP1 ---R-QL--- ---I----- ---A----- -H-I----- ---VV--H K---F-Y-STD
SQUA ---QL--- ---I----- ---G----- -H----- ---V--N K---F-Y-STD
OSMADS14 ---QL--- ---I----- ---SK--- -N-I----- ---T----- K---Y-TD
CAL ---R--L--- ---I----- ---T---S--- -Q-I----- ---S--V--H K---F-YS-E
BM5 ---R--QL--- ---I----- ---S----- -H-I---Y- ---G-----T K---Y-STE
ZAG2 ---RI--- ---N-S--- -C----- ---V--- --R---Y-NN
ZMM1 ---RI--- ---N-S--- -C----- ---VV--- --R---Y-NN
OSMADS13 ---RI--- ---T-S--- -C----- ---V--- --R---Y-NN
ZMM2 ---T-S--- -C----- ---VV--- --R---Y-NN
ZMM23 Q----I--- ---T---C----- ---VV--- --R---Y-NN
OSMADS3 ---I--- ---T---C----- ---V--- --R---Y-NN
AG S---I--- ---T---C----- ---V--- --R---Y-NN
AGL1 L---I--- ---T---C----- ---V---T --R---Y-NN
AGL5 I---I--- ---T---C----- ---V---T --R---Y-NN
TAG1 L---I--- ---T---C----- ---VV--N --R---Y-NN
AGL11 ---I--- ---S---C----- ---V--T --R---Y-NN
PLE N---I--- ---I---C----- ---VV--- --R---Y-NN
ZAG1 R-K--T--- ---T---C----- ---V--- --R---Y-NN
FAR I---I--- ---Q---C----- ---VV--- --R---Y-NN
ZAG4 Q---I---H ---T---C---S--- ---VV--- --R---DMP
ORYSAT1 ---VLQ--- ---IS--- -A----- ---I--- ---VL--H A-R--Q-S--
ZMM24 ---VLQ--- ---IS--- -A----- ---VL--H A-R--Q-S--
```

```

OSMADS5 -----L-- ----IS---- -A----- -----T --R-F--ST-
ZMM3 -----L-- ----IS---- -A----- -----R-F--ST-
OSMADS1 -----L-- ----IS---- -A----- -----L--- -----G --R-F--S--
ZMM14 -----L-- ----IS---- -A----- -----L--- -----G --R-F--S--
ZMM8 -----L-- ----IS---- -A----- -----L--- -----G --R-F--S--
BM7 -----MR- ----IS---- -A----- -----L--- -----G --R-F--S--
OSMADS6 -----R--L-- ----I----- -----G-A
TAMADS12 -----R--L-- ----I----- -----G-A
ZAG3 -----R--L-- ----I----- -----G-A
ZAG5 -----R--L-- ----I----- -----G-A
AGL6 -----R--M-- ----I----- -----G-V
OSMADS24 -----I----- -A- .----- -----N -----C-G
ZMM7 -----I----- -A- .----- -----V--N -----C-G
SBMADS1 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C-G
BM9 -----R--L-- ----I----- -A----- -----V--N -----C-T
OSMADS45 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C-T
AGL4 -----R--L-- ----I----- -A----- -----S--V--N -----C-T
AGL2 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C--
AGL9 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C--
DEFH200 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C--
DEFH49 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C--
DEFH72 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----C-N
AGL3 -----L-- ----I----- -A----- -----I--L--N -----C--
TM5 -----R--L-- --G-I----- -A----- -----N -----C--
ZMM6 -----R--L-- ----I----- -A----- -----N -----S-T
AGL13 -----V----- -IT----- --KS----- --S-----T G-----SNV
ORYSAT5 -V---TQM-- ---P-S----- -F----- --V---P-----A
ZMM5 -V---TQM-- ---P-S----- -F----- --VV---P-----G
DEFH24 -V---TQMR- ---A-S----- -F----- --S-----P-----
TM3 -V---TQMR- ---A-S----- -F----- --G-----P-----
AGL14 -M----- -A-S----- -F----- --P-----S--
TM8 -----L-- --Q----- --I----- --LL--P S--A-H--H
ANR1 -----IV-R- -D-S-S----- -S----- -K--I--- --GV----- T---DY--N
DEFH125 -----IV-Q- -DKS-S----- -S----- -K--AI--- --GVV--- T---YS--T
ZMMADS2 -----IV-R- -D-S-S----- -IF----- -K--AI--- --G-V--- T-R---YS-T
AGL17 -QK -DDS-S----- -K--I--- -K--AI--- --C-----N TD---D---
ZMM29 -----I----- -S----- --A--V--- -R-IG--- --GVV--- G---DYC-P
ZMM18 -----IK--- -S----- --A--V--- -R-IG--- T--GVV--- G---DYC-P
OSMADS2 -----I----- -S----- --S--I--- -R-I----- --GVV--- A---DYC-P
ZMM16 -----I----- -S----- --I--- -R-I----- --GVVV--- A---DYC-P
OSMADS4 -----I----- -S----- --S--I--- -R-IG--- R--GVV--- A---SDYCTP
ZMM17 -----I----- -S----- --G--- -N--A--- -R-GVV--- T--MF--YC-P
OSMADS16 -----I----- -K-A----- Y---T-IM- --R--T--- -Q--I-M--- T--YH--C-P
SI1 -----I----- -A----- Y---T-IM- --R--T--- -Q--I-M--- T--YH--C-P
TAMADS51 -----I----- -A----- Y---S-IM- --R--T--- -Q--I-M--- T--YH--C-T
GLO -----I----- -SS----- Y---IM- --K-I--- -H-SV---A S--MH--C-P
PI -----I----- -AN-V--- -V----- -K-IIT--- -K-----A N--MIDYCCP
AGL15 -----I----- -ANS----- -S----- -R----- --V-V--K S---F-YS-T
AGL12 -A---IQL-- ---PVH--- -C---T--- -K----- --IGVV---P Q---F-L-TK
FLC ---K-L--- ---SS--- -IE--- -RQ--- -S---LVV-A S---S-S-G
Konsensus MGRGKVEIKR IENKTNRQVT FSKRRNGLLK KAYELSVLCD AEVALIIFSS RGKLYEFASS

```

Abbildung D.1: *Multiple-Sequence-Alignment* der Aminosäuresequenzen der MADS-Domänen aller in der Phylogenie-Rekonstruktion (s. Abschnitt 3.8) verwendeten Proteine. Das *Alignment* wurde mit dem Computerprogramm *PileUp* (Parameter: gap creation penalty = 8, gap extension penalty = 2) erstellt, konservierte Aminosäuren sind durch eine Linie (-) repräsentiert, Unterschiede durch die Aminosäure-Abkürzung und Lücken durch einen Punkt (.)





tul	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	423
ze48	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	424
cor4	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	418
chih	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	418
tul	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	423
tu50	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	425
tu9	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	418
tud	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	423
ze41	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	418
tump	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	435
promref	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	469
tumd	AGTCCTTAAAT	GATTCGTTGGT	AGAAATAACCC	CTTCCATCTT	TCTTGAAAATT	GTTCTCCTAA	426
tul	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	483
ze48	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	484
cor4	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	478
chih	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	478
tul	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	483
tu50	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	485
tu9	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	478
tud	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	483
ze41	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	478
tump	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	495
promref	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	529
tumd	CATCCCACCTT	CTTCATAAATA	AGTTGTGCGTA	TATTGTCAAG	CAAGTCATCC	AAATTC AAGC	486
tul	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	543
ze48	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	544
cor4	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	538
chih	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	538
tul	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	543
tu50	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	545
tu9	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	538
tud	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	543
ze41	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	538
tump	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	555
promref	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	589
tumd	CCTTATACCTT	CTTAAATCCAA	TTGTTAAAAAC	ACTCGGCCAA	ATTGTTGGTTC	ACATAATCAA	546
tul	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	603
ze48	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	604
cor4	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	598
chih	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	598
tul	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	603
tu50	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	605
tu9	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	598
tud	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	603
ze41	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	598
tump	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	615
promref	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	649
tumd	CCTTACAATG	AGTCCCAAAT	TGGCTTCTTG	TCCATATCCT	AGTATGGTTT	TGCCTTATGT	606
tul	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	653	
ze48	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	629	
cor4	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	617	
chih	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	622	
tul	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	627	
tu50	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	629	
tu9	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	622	
tud	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	653	
ze41	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	624	
tump	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	643	
promref	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	699	
tumd	ACGCCATTGC	TGCCGGCATA	GCTTCATCCA	TGCGCGTCCA	GTGCTTCTCA	647	

Abbildung D.3: *Multiple-Sequence-Alignment* der DNA-Sequenzen der in der diagnostischen PCR erhaltenen Fragmente. Es wurde von *Primer* allatgds aus in Richtung des *ZMM19*-Transkriptionsstarts sequenziert. Die Namen links sind Abkürzungen der verwendeten Linien: promref = sequenziertes Referenzallel von *ZMM19 Tu1-A158*, tu1 = *Tu1-A158*, tul = *Tu1-l*, tud = *Tu1-d*, tumd = *Tu1-md*, tu9 = *TUNICA9*, chih = *CRCHIH*, ze41 = *ZEA41*, ze48 = *ZEA48*, cor4 = *Cornell4*, tump = *TuMPIZ1* und tu50 = *Tu\*5090B*. Das *Alignment* wurde mit dem Computerprogramm PileUp (Parameter: gap creation penalty = 8, gap extension penalty = 2) erstellt, abweichende Nukleotide sind grau hinterlegt. Der Abbruch des *Alignments* zeigt den mutmaßlichen Beginn einer 9 bp Deletion an.

### D.3.2 Sequenzierung mit *Primer mutestus*

```

promref G C C A T T G C T G C C G C A T A G C T T C A T C C A T T G C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 710
tud G C C A T T G C T G C C G C A T A G C T T C A T C C A T T G C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 483
mtum G C C A T T G C T G C C G C A T A G C T T C A T C C A T T G C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 791
tul G C C A T T G C T N G C C G C A T A G C T T C A T C C A T T G C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 492
cor4 . . . . . G C C N G C A N A G C N N G N A N N N N T T C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 884
tu50 . . . . . G C C N G C A N A G C N N G N A N N N N T T C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 952
tul . . . . . G C C N G C A N A G C N N N A N N N N N T T C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 417
ze48 . . . . . G C C N G C A N A G C N N G N A N N N G N T T C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 926
tu9 . . . . . G C C N G C A N A G C N N N A N N N N N T N C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 1058
tump . . . . . G C C G C C N N N G C T G G N A N N N G N G N C N G T G C A G T G C T T G T C N N A A N A G T A N G G 1029
chih . . . . . G C C N G C A N A G C N N G A A N N N N T N C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 1046
ze41 . . . . . G C C N G C A N A G C N N G N A N N N N T T C C G T C C A G T G C T T C T C A A A C A A G T A T G G 1255

promref G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 770
tud G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 543
mtum G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 851
tul G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 552
cor4 G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 944
tu50 G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 1012
tul G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 477
ze48 G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 986
tu9 G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 1118
tump G C T N C A N A A N C A A T G G C T G T A N A C A T G G A G N C C A T A G G T C N G C N T T T C C C T C T C C C A G N T 1089
chih G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 1106
ze41 G C T C C A T A A A C A A T G A C T G T A T A C A T G G A G C C C A T A C G T C T G C C T T T C C C T C T C C C A G T T 1315

promref T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 830
tud T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T N G C C G G G N C 603
mtum T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 911
tul T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 612
cor4 T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1004
tu50 T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1072
tul T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G G G G C C G N G C C 537
ze48 T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1046
tu9 T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1178
tump N C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T N A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1149
chih T N C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1166
ze41 T C C G T T T T T T T T A A T G C T T T T G T T T A C T C G C G G G G A T C A T G G G G T A A T C G C G T G G G C C G T G C 1375

```

Abbildung D.4: *Multiple-Sequence-Alignment* der DNA-Sequenzen der in der diagnostischen PCR erhaltenen Fragmente. Es wurde von *Primer mutestus* aus weiter stromauf (bezüglich des *ZMM19*-Transkriptionsstarts) sequenziert. Die Namen links sind Abkürzungen der verwendeten Linien: promref = sequenziertes Referenzallel von *ZMM19<sup>Tu1-A158</sup>*, tu1 = *Tu1-A158*, tul = *Tu1-l*, tud = *Tu1-d*, tumd = *Tu1-md*, tu9 = *TUNICA9*, chih = *CRCHIH*, ze41 = *ZEA41*, ze48 = *ZEA48*, cor4 = *Cornell4*, tump = *TuM-PIZ1* und tu50 = *Tu\*5090B*. Das *Alignment* wurde mit dem Computerprogramm *PileUp* (Parameter: gap creation penalty = 8, gap extension penalty = 2) erstellt, abweichende Nukleotide sind grau hinterlegt. Der Abbruch des *Alignments* zeigt den mutmaßlichen Beginn einer 9 bp Deletion an.

## Anhang E

# 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.

(Luzie Ursula Wingen)

Teilpublikationen:

keine



# Anhang F

## Danksagung

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

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

Mein besonderer Dank gilt Günter Theißen für die gute Betreuung mit vielen anregenden Diskussionen und hilfreichen Vorschlägen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, für Einweisungen in Techniken (besonders durch Thomas Münster) und für sonstige technische Unterstützung. Insbesondere gilt hier mein Dank Susanne Werth. Allen Korrekturlesern dieser Arbeit sei ebenfalls gedankt.

Aus anderen Arbeitsgruppen möchte ich folgenden Personen danken: Zsuzsanna Schwarz-Sommer für die Einführung in das REM, Peter Huijser für die Erklärung des Photomikroskops, Sieglinde Effgen für die Durchführung der AFLPs, Anja Seidel für die Maistransformationen, Michael Kröpelin für die Betreuung der Maispflanzen und Maret-Linda Kalda für Fotografien der Phänotypen.

Jan T. Kim danke ich für die Einführungen in UNIX/Linux und die Bioinformatik, für gute fachliche Diskussionen, für Hilfen bei der Administration der Linux-PCs „tulip“ und „unicornia“ und außerdem natürlich für alle Ermunterungen und für vieles anderes mehr.

# Anhang G

## Lebenslauf

Name: Wingen  
Vornamen: Luzie Ursula  
Geburtsdatum und -ort: 11. April 1965 in Vechta  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Schulbesuch: 1971 - 1975, katholische Grundschule, Bensberg-Refrath  
1975 - 1984, Otto-Hahn-Gymnasium, Bergisch Gladbach  
Abitur: 15.5.1984  
Studium: 1984 - 1991, Studium der Biologie an der Universität zu Köln  
Vordiplom: 10.10.1986  
Diplomarbeit: Nov. 1989 - Jan. 1991, Institut für Biochemie, Universität zu Köln  
Abschluss: 17.1.1991, Diplom-Biologe  
Promotionsstudium: 16.5.1997 - 17.1.2001, Universität zu Köln  
Promotionsarbeit: 16.5.1997 - 31.10.2000, Abteilung „Molekulare Pflanzengenetik“, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln  
Disputation: 17.1.2001  
Berufliche Tätigkeiten: 1.8.1991-31.7.1994, wissenschaftliche Mitarbeiterin, Abteilung „Angewandte Genetik der Mikroorganismen“, Universität Osnabrück  
29.5.1995 - 29.7.1995, Praktikum, „Akademie für Jugend und Beruf“ (ajb), Hattingen  
Okt. 1995 - Feb. 1996, freie Mitarbeiterin, ajb, Hattingen  
26.2.1996 - 15.5.1996, Sekretariatsangestellte, „Pallas GmbH“, Brühl  
16.5.1996 - 15.5.1997, wissenschaftliche Außendienstmitarbeiterin, „invitro diagnostika GmbH“, Mainz-Kastel  
Berufliche Weiterbildung: 1.9.1994 - 31.8.1995, Qualifikationsmaßnahme: „Betriebswirtschaftliches Umwelt-Controlling“, „EPS GmbH“, Bonn