

Untersuchungen zur  
Isolierung von Regulator-Genen des  
floralen Meristem-Identitäts-Gens *FLORICAULA*  
aus *Antirrhinum majus*

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

vorgelegt von  
**Winfried Hofmann**  
aus Frankfurt am Main

Köln 1999

Druck: Copy Team GmbH Köln

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Saedler  
Prof. Dr. H. Bothe

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.99

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1 BLÜTENENTWICKLUNG - EIN BEISPIEL VON PFLANZLICHER MUSTERBILDUNG .....	5
1.2 MÖGLICHE ANWENDUNGEN VON ERKENNTNISSEN AUS DER BLÜTENENTWICK- LUNG IN NUTZPFLANZEN .....	6
1.3 DIE BLÜTENBILDUNG WIRD ÜBER DIE WECHSELWIRKUNG VON ÄUßEREN BEDINGUNGEN MIT ENDOGENEN FAKTOREN KONTROLLIERT .....	7
1.4 DIE GENETISCHE KONTROLLE DES GENERATIVEN WACHSTUMS.....	8
1.4.1 Drei Gruppen von Genen sind für die Blütenbildung wichtig .....	8
1.4.2 Blütezeit-Gene.....	9
1.4.3 Sind Blütezeit-Gene Phasen-Umschalt-Gene? .....	12
1.5 DER ÜBERGANG VOM VEGETATIVEN ZUM GENERATIVEN WACHSTUM IN <i>ANTIRRHINUM MAJUS</i> .....	13
1.6 <i>ANTIRRHINUM</i> ALS GEEIGNETE MODELLPFLANZE ZUR UNTERSUCHUNG DES PHASENÜBERGANG VON VEGETATIV ZU GENERATIV .....	14
1.7 STRATEGIE ZUR ISOLIERUNG VON PHASEN-UMSCHALT-GENEN .....	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1 BIOMATERIAL .....	17
2.1.1 <i>Antirrhinum majus</i> Pflanzenmaterial .....	17
2.1.2 <i>E. coli</i> Stämme .....	17
2.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm .....	18
2.1.4 Plasmide und Vektoren.....	18
2.1.5 Oligonucleotide.....	19
2.1.6 cDNA-Banken .....	19
2.1.7 Enzyme.....	20
2.2 MATERIAL .....	20
2.2.1 Chemikalien, Radiochemikalien und sonstige Materialien .....	20
2.3 METHODEN .....	21
2.3.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	21
2.3.2 Hybridisierung von Northern blots .....	21
2.3.3 In situ-Hybridisierungen .....	21
2.3.4 Screening von cDNA Banken.....	21
2.3.5 Klonierung von 5'-cDNA-Enden mittels PCR aus einer cDNA-Population.....	22

2.3.6 Herstellung und radioaktive Markierung von <i>FLO</i> -Promotorregion-Fragmenten für EMSA .....	22
2.3.7 Extraktion von Kernproteinen.....	22
2.3.8 Native Polyacrylamidgelelektrophorese zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen.....	23
2.3.9 Überexpression von Proteinen mit 'Histidin-tag' in <i>E. coli</i> und Aufreinigung ..	23
2.3.10 South-western-screening.....	23
2.3.11 Radioaktive Markierung von DNA als Sonde für South-western-screening ....	24
2.3.12 Hypokotyltransformation und Regeneration von <i>Antirrhinum</i> .....	24
2.3.13 Sequenzierungen.....	24
2.3.14 Sequenzanalysen.....	25
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
3.1 DETEKTION VON <i>CIS</i> -REGULATORISCHEN ELEMENTEN IN DER <i>FLO</i> -PROMOTORREGION .....	27
3.2 DAS AT-REICHE <i>FLO</i> -PROMOTORREGION-FRAGMENT (-94/-213) INTERAGIERT SPEZIFISCH MIT KERNPROTEINEXTRAKTEN .....	28
3.3 ZWEI VERSCHIEDENE CDNAS WURDEN IN EINEM SOUTH-WESTERN-SCREENING MIT DEM <i>FLO</i> -PROMOTORREGION-FRAGMENT (-94/-213) ISOLIERT .....	29
3.4 SEQUENZANALYSE DER CDNAS, DIE AUS DER <i>ANTIRRHINUM</i> INFLORESZENZ-EXPRESSIONSBANK ISOLIERT WURDEN .....	31
3.4.1 Die 1,6 kb lange cDNA, <i>HMR1</i> zeigt hohe Homologie zu pflanzlichen HMG-I/Y-DNA-Bindeproteinen.....	31
3.4.2 Die 1,1 kb lange cDNA, <i>SAP1</i> besitzt außer einem 'AT-hook' keine bekannten Sequenzmotive .....	37
3.5 <i>SAP1</i> -VERWANDTE PROTEINE AUS <i>ANTIRRHINUM</i> , <i>ARABIDOPSIS</i> , <i>SINAPIS</i> UND <i>ORYZA</i> .....	39
3.5.1 Isolierung von <i>SAP1</i> -homologen Genen aus <i>Antirrhinum</i> .....	39
3.5.2 Isolierung von mutmaßlichen <i>SAP1</i> -homologen Genen aus <i>Arabidopsis</i> .....	40
3.6 DIE EXPRESSION VON <i>HMR1</i> UND <i>SAP1</i> IN <i>ANTIRRHINUM</i> .....	48
3.6.1 Northern blot-Analysen von <i>HMR1</i> und <i>SAP1</i> .....	48
3.6.2 In situ-Hybridisierung von <i>HMR1</i> .....	51
3.7 PROTEINEXPRESSION VON <i>HMR1</i> UND <i>SAP1</i> IN <i>E. COLI</i> .....	53
3.8 BINDESTUDIEN MIT <i>SAP1</i> .....	55
3.8.1 <i>SAP1</i> bindet im nativen Zustand und mit sehr hoher Affinität an das <i>FLO</i> -Promotorregion-Fragment (-213/-94) .....	55
3.8.2 <i>SAP1</i> bindet scheinbar kooperativ an das <i>FLO</i> -Promotorregion-Fragment (-94/-213) .....	56

3.9 HERSTELLUNG VON TRANSGENEN PFLANZEN, DIE <i>HMR1</i> UND <i>SAP1</i> KONSTITUTIV EXPRIMIEREN .....	58
3.9.1 Transformation von <i>pHyg35S::HMR1se</i> und <i>pHyg35S::HMR1as</i> .....	59
3.9.2 Transformation von <i>pHyg35S::SAP1se</i> und <i>pHyg35S::SAP1as</i> .....	59
3.9.3 Beobachtete phänotypische Veränderungen an den Pflanzen die <i>pHyg35S::HMR1as</i> enthalten .....	60
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>63</b>
4.1 DER BEREICH (-213/-94) DER <i>FLO</i> -PROMOTORREGION ENTHÄLT <i>CIS</i> -ELEMENTE, DIE MÖGLICHERWEISE AN DER REGULATION VON <i>FLO</i> BETEILIGT SIND .....	63
4.2 SOWOHL <i>HMR1</i> ALS AUCH <i>SAP1</i> ENTHALTEN CHARAKTERISTIKEN VON NUKLEAREN PROTEINEN WIE KERNLOKALISATIONSSIGNALE UND AT-HOOKS.....	64
4.3 <i>HMR1</i> UND <i>SAP1</i> SCHEINEN TROTZ IHRER UNTERSCHIEDLICHEN STRUKTUR UND AT-HOOK-KOPIENZAHL ÄHNLICHE EIGENSCHAFTEN IN BEZUG AUF DNA-BINDUNG ZU BESITZEN .....	66
4.3.1 Mögliche Interaktionen von <i>HMR1</i> mit Chromatin und Kern-Proteinen .....	70
4.3.2 <i>HMR1</i> und <i>SAP1</i> binden präferentiell, aber wahrscheinlich nicht sequenzspezifisch an DNA.....	71
4.4 ES KONNTEN IN <i>ARABIDOPSIS</i> KEINE ORTHOLOGEN GENE VON <i>SAP1</i> AUS <i>ANTIRRHINUM</i> GEFUNDEN WERDEN .....	72
4.5 SIND <i>HMR1</i> UND <i>SAP1</i> AN DER REGULATION VON <i>FLO</i> UND AN DEM PHASENWECHSEL VON VEGETATIVEM WACHSTUM ZU GENERATIVEM WACHSTUM BETEILIGT?.....	73
4.6 MÖGLICHE FUNKTION VON <i>HMR1</i> IN DER REPRIMIERUNG VON KLASSE B-GENEN IM ÄUßEREN WIRTEL .....	74
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>77</b>
<b>6 AUSBLICK</b> .....	<b>79</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>81</b>
<b>8 ANHANG</b> .....	<b>91</b>
8.1 CDNA-SEQUENZEN.....	91
8.2 OLIGONUCLEOTIDSEQUENZEN .....	93
8.3 FACHBEGRIFFE.....	94
8.4 NOMENKLATUR VON GENEN UND GENPRODUKTEN.....	94
8.5 ABKÜRZUNGEN .....	94



# 1 Einleitung

## 1.1 Blütenentwicklung - ein Beispiel von pflanzlicher Musterbildung

Die zentrale Frage in der Entwicklungsbiologie der Vielzeller ist, wie aus einer Zelle, der Zygote, durch geordnete Zellteilung und -differenzierung ein komplex gegliederter Organismus entsteht. Dieser *Musterbildung* genannte Vorgang ist vererbbar und wird durch genetische Netzwerke kontrolliert. Er beruht darauf, dass jede Zelle die für ihre Position spezifischen Signale empfängt und darauf individuell reagiert.

Pflanzen sind sessile Organismen und müssen deshalb in der Lage sein, auf Veränderungen der Umwelt flexibel zu reagieren. Diese im Vergleich zu Tieren völlig andere Überlebensstrategie resultiert auch in Unterschieden während der Ontogenie. Adulte Pflanzen sind, auf das Wachstum bezogen, 'offene Systeme' und in der Lage *de novo* Organe wie Blätter, Blüten oder Wurzeln aus teilungsfähigen Stammzellen, den Meristemen, zu bilden. Im Gegensatz dazu ist die Organogenese in Tieren generell mit Beendigung der Embryonal- oder Larvalentwicklung abgeschlossen. Demnach lassen sich die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse nicht auf Pflanzen übertragen, was die Erforschung von pflanzlicher Entwicklung notwendig macht.

Trotz dieser entscheidenden Unterschiede in ihrer Entwicklung gibt es auch prinzipielle Gemeinsamkeiten in der Musterbildung von Pflanzen und Tieren. Zum Beispiel werden die Blütenorgan-Identitäten in Angiospermen analog zu den Segment-Identitäten in Insekten über das kombinatorische Wirken von Transkriptionsfaktoren festgelegt (Theissen und Saedler, 1995). Diese Rolle als homöotische Entwicklungskontrollgene wurde bei Angiospermen, entsprechend der Funktion der Homeobox-Transkriptionsfaktoren bei Tieren, weitgehend durch die Familie der MADS-box-Transkriptionsfaktoren übernommen (eine Ausnahme ist *AP2*, das einer eigenen Genfamilie angehört, s. u.). Dabei wird nach dem ABC-Modell, das auf der Basis von Untersuchungen homöotischer Mutanten in *Arabidopsis* beruht (Weigel und Meyerowitz, 1994), die Identität des äußeren Wirtels (Sepalen) durch Klasse A-Gene festgelegt, die des zweiten Wirtels (Petale) durch die Kombination aus Klasse A- und Klasse B-Genen, die des dritten Wirtels (Stamen) durch Kombination von Klasse B- und Klasse C-Genen und die des vierten Wirtels (Karpelle) durch Klasse C-Gene festgelegt. Die Klasse A-Gene werden in *Arabidopsis* durch *API* (*APETALA1*; Mandel et al., 1992) und *AP2* (*APETALA2*; Jofuku et al., 1994), die Klasse B -Gene durch *DEF* (*DEFICIENS*; Sommer et al., 1990; Schwarz-Sommer et al., 1992) aus *Antirrhinum* bzw. *AP3* (*APETALA3*; Jack et al., 1994) aus *Arabidopsis* und *GLO* (*GLOBOSA*; Tröbner et al., 1992) aus *Antirrhinum* bzw. *PI* (*PISTILLATA*; Goto und Meyerowitz,

1994) aus *Arabidopsis* repräsentiert. *PLE* (*PLENA*; Bradley et al., 1993) aus *Antirrhinum* bzw. *AG* (*AGAMOUS*; Yanofsky et al., 1990) aus *Arabidopsis* stellen Klasse C-Gene dar. Die Klasse A-Gen-Funktion ist, abgesehen von *Arabidopsis*, generell nicht auf andere Pflanzen übertragbar, weil in keiner anderen Spezies bislang Klasse A-Mutanten, d. h. Pflanzen mit Blüten mit karpellen-artigen Sepalen und stamen-ähnlichen Petalen gefunden worden sind. Die Klasse A-Gene aus *Arabidopsis* besitzen darüber hinaus eine zweite Funktion als florale Meristem-Identitäts-Gene (siehe 1.4.1).

## 1.2 Mögliche Anwendungen von Erkenntnissen aus der Blütenentwicklung in Nutzpflanzen

Die Blütenentwicklung ist nicht nur für die Grundlagenforschung interessant. Die Kenntnis über die ihr zugrunde liegenden Mechanismen könnten der Verbesserung von Nutzpflanzen zugute kommen. Zwei Beispiele werden im Folgenden kurz behandelt.

Im Modellsystem *Arabidopsis* kann die vegetative Phase durch konstitutive Expression von floralen Meristem-Identitäts-Genen (s. u.) bzw. derer mutmaßlicher Aktivatoren verkürzt werden (Mandel und Yanofsky, 1995; Weigel und Nilsson, 1995; Simon et al., 1996; Cardon et al., 1997). Dieser experimentelle Ansatz kann auch im heterologen System angewandt werden: Wird *LEAFY*, ein florales Meristem-Identitäts-Gen aus *Arabidopsis* in der Zitterpappel konstitutiv exprimiert, reduziert sich die vegetative Phase von einigen Jahren auf wenige Monate (Weigel und Nilsson, 1995). Eine Anwendung solcher frühblühenden Pflanzenlinien könnte durch ihre kürzere Generationsdauer die klassische Züchtung beschleunigen. Außerdem wäre es möglich, Nutzpflanzen in Gebieten mit kurzer Vegetationsperiode, in denen sonst kein Anbau möglich wäre, zu kultivieren.

Ein spektakuläres Beispiel, wie Blütenentwicklungsgene nutzbar gemacht werden könnten, zeigt die gentechnische Erzeugung von parthenokarpen (samenlosen) Früchten. Bei Unterdrückung von Selbstbestäubung konnten in Tabak, Aubergine und Tomate durch die Expression des *iaaM*-Gens aus *Pseudomonas syringae* unter der Kontrolle der Ovulen-spezifischen *DEFH9*-Promotorregion (*DEFH9* = *DEFICIENS HOMOLOG 9* ist ein MADS-box-Gen aus *Antirrhinum*) samenlose Früchte erzeugt werden (Rotino et al., 1997). Das Transgen imitiert ein für die Fruchtentwicklung notwendiges, Ovulen-spezifisches Auxin-Signal, das normalerweise nur nach der Bestäubung ausgelöst wird. Die korrekte Funktion der *Antirrhinum-DEFH9*-Promotorregion im heterologen System zeigt außerdem eindrucksvoll, wie konserviert Regulationsmechanismen über systematische Grenzen hinaus sein können.



### **1.3 Die Blütenbildung wird über die Wechselwirkung von äußeren Bedingungen mit endogenen Faktoren kontrolliert**

Die Angiospermen sind, besonders in geographischen Breiten mit Jahreszeitwechsel, auf den richtigen Zeitpunkt ihrer Blütenbildung angewiesen, weil z. B. die Bestäuber wie Insekten vorhanden sein müssen und die Vegetationsperiode für die Samen- und Fruchtbildung optimal ausgenutzt werden muß, um die Vermehrung und Verbreitung der Pflanze zu sichern. Ein synchrones Blühen gleicher Arten ist außerdem für die Gewährleistung genetischer Rekombination notwendig.

Nicht zuletzt sind viele Samen und Früchte unverzichtbare und lebenswichtige Komponenten in der Ernährung von Mensch und Tier.

Die Umschaltung vom vegetativen zum generativen Wachstum wird durch äußere Einflüsse wie Temperatur, Tageslänge, Lichtqualität und Bodenfeuchte in Wechselwirkung mit endogenen, d. h. genetisch bedingten Faktoren der Pflanze, kontrolliert. Die Blüteninduktion kann von Spezies zu Spezies unter völlig unterschiedlichen Bedingungen stattfinden (Übersicht bei Bernier, 1988). Diese Unterschiede können sogar innerhalb einer Art auftreten. Beispielsweise blühen manche Tabak-Kultivare nur unter Kurztagbedingungen, andere nur unter Langtagbedingungen. Die Perzeption dieser Signale findet in verschiedenen Teilen der Pflanze statt (Übersicht bei Bernier et al., 1993). Zum Beispiel wird die Lichtperiode in den Blättern wahrgenommen, die Bodenfeuchte in den Wurzeln und Kälte im Apikalmeristem.

Da das Umschalten zum reproduktivem Wachstum in der Sproßspitze stattfindet, muß es ein Signal geben, das dorthin transduziert wird. Über die Natur dieses Signals gibt es verschiedene Theorien. Drei wichtige Theorien seien hier kurz erwähnt.

Die „Hypothese der Nährstoffumverteilung“ postuliert, daß induktive Bedingungen zu einer besseren Versorgung der Sproßspitze mit Assimilaten führt. Dieser Stimulus löst dann die Blütenbildung aus (Sachs und Hackett, 1983).

Die „Florigen-Hypothese“, die lediglich auf Untersuchungen an photoperiodisch sensitiven Pflanzen basiert, besagt, daß bei induktiver Photoperiode ein Signal von den Blättern in das Apikalmeristem in Form eines universalen Blühhormons (Florigen) übertragen wird (Chailakhyan, 1936). Später wurde diese Theorie durch einen Antagonisten des Florigens, das Antiflorigen ergänzt. Angesichts der Vielfalt in der Art und Weise, wie in verschiedenen Spezies die Blütenbildung induziert wird, erscheint die Annahme eines universellen Signalüberträgers aus heutiger Sicht naiv. Umso fragwürdiger ist in diesem Zusammenhang, daß das erst kürzlich identifizierte *INDETERMINATE1*-Gen (*IDI*) aus Mais, das für ein Zinkfingerprotein kodiert, als

Komponente eines Florigen-Signalweges diskutiert wird (Colasanti et al., 1998; Aukerman und Amasino, 1998). Grund für diese Annahme ist lediglich, daß das *IDI*-Transkript unter induktiven Bedingungen in unreifen Blättern, jedoch nicht im Apikalmeristem exprimiert und zum Umschalten der Maispflanze auf generatives Wachstum benötigt wird.

Die „Theorie der multifaktoriellen Kontrolle“ von Bernier (siehe Bernier, 1988) trägt der Tatsache Rechnung, daß die florale Transition in der Modellpflanze *Sinapis alba* von einer Reihe von Signalen, bestehend aus Hormonen, wie beispielsweise Gibberelline, Polyamine, Cytokinine und Auxine sowie Assimilaten wie Saccharose abhängig ist (Bernier et al., 1993).

## **1.4 Die genetische Kontrolle des generativen Wachstums**

Wie gerade behandelt, ist einiges über die chemische Natur der Signale, die an der Blütenbildung beteiligt sind, bekannt. Leider sind die Erkenntnisse, die die Physiologie der Blütenbildung mit der Genetik der Blütenbildung verbinden, noch eher lückenhaft.

### **1.4.1 Drei Gruppen von Genen sind für die Blütenbildung wichtig**

Die an der Blütenbildung beteiligten Gene lassen sich, gemäß der zeitlichen Abfolge ihrer Aktivierung, in drei Gruppen einteilen.

#### 1. Phasen-Umschalt-Gene:

Sie bewirken ein Umschalten des Apikalmeristems von vegetativem auf Infloreszenz-Wachstum. Das Vorhandensein dieser Gene wurde von verschiedenen Autoren vorgeschlagen (Poethig, 1990; Schultz und Haughn, 1993; Klein, 1994). Es konnten bis heute keine Mutanten gefunden werden, die in diesem Schritt völlig blockiert sind, also unbegrenzt vegetativ wachsen. Dies legt den Schluß nahe, daß mehrere Gene mit redundanten Funktionen diesen Schritt kontrollieren müssen.

#### 2. Florale Meristem-Identitäts-Gene:

Die Identität der lateralen Meristeme, die sich von den Randzonen des apikalen Infloreszenzmeristems abteilen, wird durch sogenannte florale Meristem-Identitäts-Gene bestimmt (Überblick bei Ma, 1998). Beispiele für florale Meristem-Identitäts-Gene sind *FLO* (*FLORICAULA*; Coen et al., 1990) und *SQUA* (*SQUAMOSOSA*; Huijser et al., 1992) aus *Antirrhinum* sowie die orthologen Gene *LFY* (*LEAFY*; Weigel et al., 1992) und *API*

(*APETALA1*; Mandel et al., 1992) aus *Arabidopsis*. Aus *Arabidopsis* wurden außerdem *CAL* (*CAULIFLOWER*; Kempin et al., 1995) und *AP2* (*APETALA2*; Jofuku et al., 1994) isoliert. Alle genannten Gene kodieren für mutmaßliche Transkriptionsfaktoren, wobei *SQUA*, *API* und *CAL* MADS-Box-Gene sind. In Mutanten der floralen Meristem-Identitäts-Gene schalten die floralen Meristeme von determiniertem Wachstum zu Infloreszenz-ähnlichem indeterminiertem Wachstum um. *CAL* stellt dabei eine Ausnahme dar. *Cal*-Mutanten zeigen keinen zum Wildtyp abweichenden Phänotyp, verstärken jedoch den *ap1*-Phänotyp in Doppelmutanten. Die Funktion von *CAL*, das zu *API* in der Sequenz sehr ähnlich ist, ist redundant und kann durch *API* übernommen werden.

### 3. Organ-Identitäts-Gene:

Diese Gene legen die Identität der einzelnen Blütenwirtel fest und halten den terminierten Charakter der Blüte aufrecht (Übersicht in 1.1).

Die vorliegende Arbeit wird sich mit den frühen Phasen der Blütenentwicklung beschäftigen. Das Hauptinteresse wird darin bestehen, die bislang nicht charakterisierten Phasen-Umschalt-Gene zu isolieren (Näheres dazu in 1.7).

Zur gleichen Zeit, als von einigen Autoren Phasen-Umschalt-Gene postuliert wurden, wurden aus *Arabidopsis* Blütezeit-Mutanten isoliert. Von einigen sind die korrespondierenden Gene inzwischen bekannt. Blütezeit-Gene bestimmen den Zeitpunkt des Umschaltens von vegetativem zu generativem Wachstum, stellen grundsätzlich durchaus Kandidaten für Phasen-Umschalt-Gene dar. Aus diesem Grund soll zunächst ein kurzer Überblick über die wichtigsten aus *Arabidopsis* isolierten Blütezeit-Gene gegeben werden.

#### **1.4.2 Blütezeit-Gene**

Unter die Bezeichnung Blütezeit-Gene fällt jedes Gen, welches die Blütezeit beeinflusst. Der Begriff 'Blütezeit' läßt sich dabei in diesem Zusammenhang verschieden definieren. Bei einer möglichen Definition wird der Zeitraum zwischen Keimung und Öffnen der ersten Blüte (= Anthesis) als Blütezeit bezeichnet. Nach einer anderen Definition werden die Blattzahl bzw. die Anzahl der Nodien als Maß für die Blütezeit zugrundegelegt (weniger Blätter/Nodien entspricht früherer Blüte). Generell kann man Repressoren von Aktivatoren der Blütenbildung unterscheiden.

### Repressoren der Blütenbildung

In *Arabidopsis* lassen sich anhand des photoperiodischen Verhaltens von Mutanten zwei Typen von Blüte-Repressoren unterscheiden (Haughn et al., 1995):

a) Frühblühende Mutanten, die photoperiodisch sensitiv sind:

Mutanten dieses Typs blühen bei jeder Lichtperiode früher als der Wildtyp. Sie sind jedoch, wie der Wildtyp, in der Lage, Tageslängen wahrzunehmen und blühen deshalb unter Kurztagbedingungen später als unter Langtagbedingungen.

Gene aus dieser Gruppe sind *ELF1* und *ELF2* (*EARLY FLOWERING 1/2*; Zagotta et al., 1992) und *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*; Shannon und Meeks-Wagner, 1991; Alvarez et al., 1992).

Von diesen Genen wurde bislang lediglich *TFL1* über seine Homologie zu dem orthologen Gen *CEN* (*CENTRORADIALIS*) aus *Antirrhinum* (Bradley et al., 1996; Bradley et al., 1997) bzw. über T-DNA-tagging (Ohshima et al., 1997) identifiziert.

*TFL1* wie *CEN* zeigen Homologien zu tierischen Phosphatidylethanolamin-Bindeproteinen, stellen demnach möglicherweise Komponenten zellulärer Signaltransduktion dar. Sowohl *Antirrhinum cen*-Mutanten als auch *Arabidopsis tfl1*-Mutanten besitzen im Gegensatz zum Wildtyp eine terminale Blüte. Dieser Phänotyp wird durch ektopische Expression von *FLO* (Bradley et al., 1996) und *SQUA* (P. Huijser, persönliche Mitteilung) bzw. *LFY* (Bradley et al., 1997) und *API* (Gustafson-Brown et al., 1994) im apikalen Meristem verursacht. *CEN* und *TFL1* haben demnach die Funktion, die Infloreszenz-Identität des apikalen Meristems aufrecht zu erhalten, indem sie dort die floralen Meristem-Identitäts-Gene unterdrücken. Während *TFL1* in *Arabidopsis* auch während der vegetativen Phase exprimiert wird, was mit seinem mutanten Phänotyp als frühblühende Pflanze in Einklang steht, ist die Expression von *CEN* in *Antirrhinum* ausschließlich auf die generative Phase beschränkt. *Cen*-Mutanten sind demnach in ihrer Blütezeit unverändert (Cremer et al., 1998). Diese Unterschiede verdeutlichen, daß die die Blüte reprimierenden Mechanismen interspezifisch offensichtlich nicht strikt konserviert sein müssen.

b) Frühblühende Mutanten, die photoperiodisch insensitiv sind:

Mutanten dieser Gruppe blühen in Lang- sowie Kurztag gleich, aber in jedem Fall früher als der Wildtyp.

Eine äußerst frühe Blütenbildung zeigen die Mutanten von *EMF1* und *EMF2* (*EMBRYONIC FLOWER*; Sung et al., 1992; Yang et al., 1995). Diese blühen zwar nicht, wie der Name suggeriert, im Embryonalstadium, jedoch ohne eine vegetative Phase zu durchlaufen direkt nach der Keimung. Die Funktion von *EMF1/2* scheint deshalb die

Aufrechterhaltung der vegetativen Phase zu sein. Aus dem Phänotyp der *emf*-Mutanten kann geschlossen werden, daß „Blühen“ ein Grundzustand der Pflanze ist, der von *EMF1/2* unterdrückt wird. Von einigen Autoren wird deshalb *EMF1/2* als zentraler Bestandteil in der Regulation der Blüte in *Arabidopsis* dargestellt (Martinez-Zapater et al., 1994; Haughn et al., 1995). In diesem Modell wird davon ausgegangen, daß die *EMF*-Aktivität mit dem Alter der Pflanze nachläßt und von anderen Blütezeit-Genen direkt oder indirekt verstärkt oder inhibiert wird. Leider sind *EMF1/2* bis heute nicht kloniert worden und es wäre interessant zu erfahren, welcher Klasse von Genen sie angehören.

Weitere Gene dieser Gruppe sind *ELF3* (*EARLY FLOWERING 3*; Zagotta et al., 1992), *COP1* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC LOCUS 1*; Deng et al., 1991), *HY1*, *HY2* und *HY3* (*LONG HYPOCOTYL*; Koornneef et al., 1980). Diese Gene sind nicht spezifisch an der Kontrolle der Blütezeit beteiligt, denn deren Mutanten zeigen neben einer Reduzierung der Anzahl der Rosettenblätter und Infloreszenznodien auch andere Abnormalitäten: *hy1*-, *hy2*- und *hy3*-Pflanzen besitzen bei verschiedenen Tageslängen, *elf3*-Pflanzen lediglich unter Kurztag ein verlängertes Hypokotyl (Koornneef et al., 1980; Zagotta et al., 1992), während *cop1*-Pflanzen im Dunkeln in der Lage sind, sich wie Wildtyp-Pflanzen im Licht zu entwickeln (Deng et al., 1991).

#### Aktivatoren der Blütenbildung

Die Aktivator-Gene der Blütenbildung sind an drei verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt.

##### a) Aktivatoren, die dem autonomen Signaltransduktionsweg angehören

Die Gene dieser Gruppe agieren autonom, d. h. sie kontrollieren die Blütenbildung unabhängig von äußeren Bedingungen.

*LD* (*LUMINIDEPENDENS*) kodiert ein mutmaßliches Kernprotein (Lee et al., 1994). *FCA* kodiert für ein RNA-bindendes Protein und wird deshalb als posttranskriptioneller Regulator diskutiert (Macknight et al., 1997). Darüber hinaus sind noch *fpa*, *fve*, *fy* als spätblühende Mutanten des autonomen Signalwegs beschrieben worden (Martinez-Zapater et al., 1994)

##### b) Aktivatoren, die dem Langtag-Signaltransduktionsweg angehören

Mutanten dieser Gene blühen unter Langtagbedingungen verspätet, zeigen jedoch ein dem Wildtyp ähnliches Verhalten bei Kurztag. Aus dieser Gruppe sind *CO* (*CONSTANS*; Putterill et al., 1995), und *FHA* (Guo et al., 1998) kloniert. *CO* kodiert für ein Zinkfingerprotein, ist deshalb möglicherweise ein Transkriptionsfaktor und *FHA* ist ein

Blaulichtrezeptor (auch als *CRY2* bekannt). Die Klonierung der Gene *FD*, *FE*, *FT*, *FWA*, und *GI* ist noch nicht veröffentlicht worden.

c) Aktivatoren, die dem GA-Signaltransduktionsweg angehören

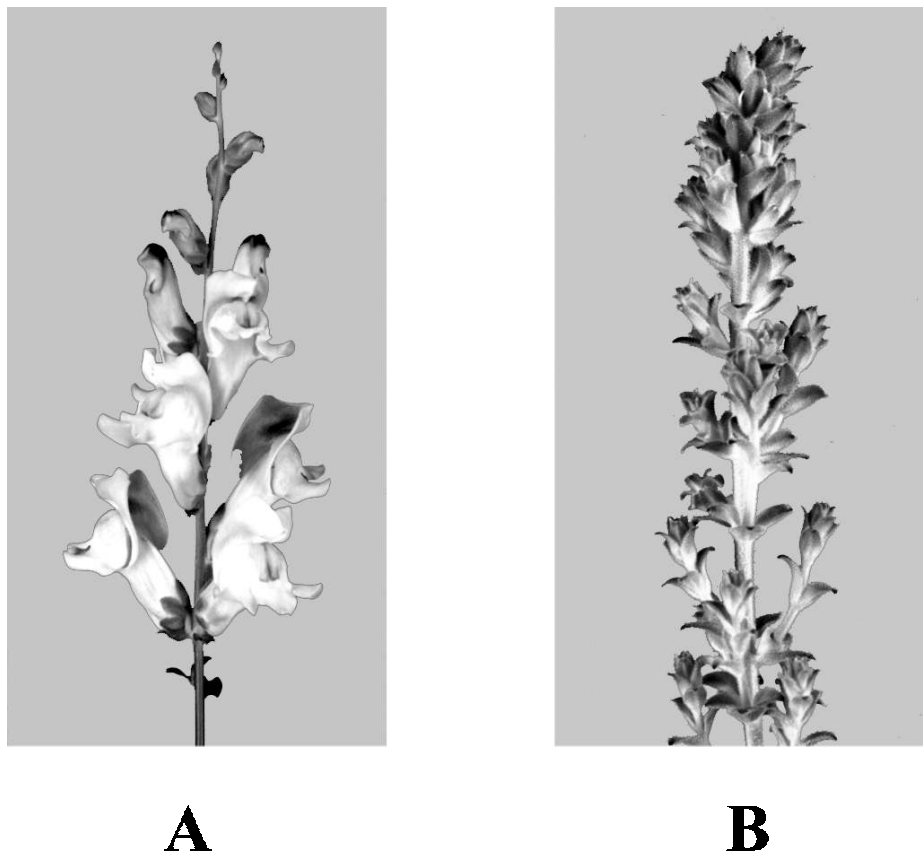
Zu dieser Gruppe gehören verschiedenen Gene, die an der Gibberellinsäure -Synthese beteiligt sind (GA = Gibberellic Acid). Eine Mutante aus dieser Klasse, *gal-3*, blüht unter Langtagbedingungen später als der Wildtyp, während sie unter Kurztagbedingungen vegetativ verbleibt. Demnach wird Gibberellinsäure für die Blüte unter Kurztagbedingungen benötigt (Wilson et al., 1992).

### 1.4.3 Sind Blütezeit-Gen Phasen-Umschalt-Gen?

Die gerade behandelten Blütezeit-Gen kontrollieren den Zeitpunkt der Blütenbildung. Wie sich anhand der bereits klonierten Gene zeigt, erfüllen mit Sicherheit nicht alle Gene dieser Gruppe das Kriterium eines Phasen-Umschalt-Gen, weil sie lediglich indirekt an der Zeitpunktbestimmung der Blüte beteiligt sind. Einige dieser Gene sind allgemeine Signaltransduktionskomponenten wie z. B. der von *FHA* kodierte Blaulichtrezeptor. Für die noch nicht klonierten Gene läßt sich keine Aussage darüber treffen, ob es sich um Phasen-Umschalt-Gen handelt, dennoch scheinen viele davon nicht spezifisch an den Umschaltprozess von vegetativ zu generativ beteiligt zu sein (zum Beispiel die *LONG HYPOCOTYL*-Gene). Unter 1.4.1 wurde beschrieben, welche Gene während der Blütenbildung aktiviert werden. Eine Schlüsselrolle dabei spielen die floralen Meristem-Identitäts-Gen, weil sie für die florale Identität der lateralen Meristeme unverzichtbar sind. Sie stellen demnach Markergene dar, die das Ende des Übergangs von vegetativem zu generativem Wachstum abschließen. Demnach sollten Phasen-Umschalt-Gen Gen sein, die den Zeitpunkt der Expression von floralen Meristem-Identitäts-Gen direkt bestimmen, also sie demnach als „molekulare Schalter“ regulieren. Den besten Kandidaten aus der Gruppe von Blütenzeit-Genen stellt *CO* dar: Im Wildtyp wird *CO* unter Langtag, also induktiven Bedingungen angeschaltet (Putterill et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, daß Aktivierung von *CO* vor allen Dingen die Expression des floralen Meristem-Identitäts-Genes *LFY* erhöht (Simon et al., 1996). *CO* kodiert wahrscheinlich für einen Transkriptionsfaktor, was ebenfalls zu der Rolle eines Umschalt-Gen passen würde. Leider konnte bis heute auf molekularer Ebene noch keine Interaktion zwischen *CO* und *LFY* nachgewiesen werden.

## 1.5 Der Übergang vom vegetativen zum generativen Wachstum in *Antirrhinum majus*

In 1.4.1 wurden die einzelnen Phasen beim Übergang vom vegetativem zum generativen Wachstum und ihre genetische Kontrolle kurz geschildert. Am Beispiel der in dieser Arbeit verwendeten Modellpflanze *Antirrhinum majus* soll kurz auf die morphologischen Veränderungen während dieses Phasenwechsels eingegangen werden. Die vegetative Phase ist unter anderem durch Laubblätter charakterisiert, die in dekussierter Phyllotaxis angeordnet sind. Während des Phasenwechsels ändert sich diese Blattstellung graduell von dekussiert zu spiral, die Blattform geht in kleine Schuppenblättern (Brakteen) über und die Trichomdichte erhöht sich (Meijer et al., 1995; Meijer, 1996). In den Achseln der Brakteen wachsen, kontrolliert durch *FLO* (Coen et al., 1990) und *SQUA* (Huijser et al., 1992), und später durch die Kontrolle von Organ-Identitäts-Genen schließlich determinierte Sprosse, die Blüten. Mutationen in *FLO* oder *SQUA* führen zu Sprossen mit indeterminierten, Infloreszenz-ähnlichem Wachstum anstelle von Blüten (Abbildung 1-1, am Beispiel von *flo*).



**Abbildung 1-1.** Vergleich der Infloreszenzen von Wildtyp (A) mit der *flo*-Mutante (B).

## 1.6 *Antirrhinum* als geeignete Modellpflanze zur Untersuchung des Phasenübergang von vegetativ zu generativ

*Antirrhinum* ist neben *Arabidopsis* eine hervorragende Modellpflanze für Untersuchungen aus dem Bereich der Blütenentwicklung. Es gibt umfangreiche Mutantensammlungen (Stubbe, 1966), die auch zahllose Blütenentwicklungs-Mutanten umfassen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit von Mutagenese mittels endogener Transposons (Carpenter und Coen, 1990), wodurch die Charakterisierung von Genen anhand 'reverser Genetik' ermöglicht wird. *Antirrhinum* ist systematisch relativ weit von *Arabidopsis* entfernt. Ein Vergleich dieser beiden Modellsysteme mit weiteren wie z. B. *Petunia* bietet deshalb die Möglichkeit artenspezifische von allgemeingültigen Entwicklungsmechanismen zu unterscheiden.

Nicht zuletzt wurde *Antirrhinum* gewählt, weil es aufgrund seiner Größe sich für biochemische Arbeiten (z. B. Kernprotein-Extraktionen) gut eignet.

## 1.7 Strategie zur Isolierung von Phasen-Umschalt-Genen

Aufgabe dieser Arbeit ist es, Phasen-Umschalt-Gene zu isolieren, die den Übergang von vegetativem zu generativem Wachstum steuern. Gute Kandidaten für Phasen-Umschalt-Gene sind Regulatoren von floralen Meristem-Identitäts-Genen, weil florale Meristem-Identitäts-Gene das Ende des Übergangs von vegetativem zu generativem Wachstum abgrenzen und andererseits die frühesten Gene sind, die spezifisch Blütenwachstum festlegen.

Als Ausgangspunkt für diese Arbeit diene das florale Meristem-Identitäts-Gen *FLO*, dessen mutanter Phänotyp in Abbildung 1-1 dargestellt ist. *FLO* wird schon sehr früh in der Blütenentwicklung angeschaltet und seine Expression ist auf florale Meristeme und Brakteen beschränkt (Coen et al., 1990). Ein analoger Versuchsansatz wurde bereits mit *SQUA* als Ausgangsgen erfolgreich durchgeführt (Klein, 1994; Klein et al., 1996).

Die Aktivierung eines Genes geschieht über sogenannte *trans*-aktive Faktoren (= Transkriptionsfaktoren), die spezifisch an sogenannte *cis*-aktive Elemente binden. Die *cis*-aktiven Elemente eines Genes befinden sich meist an seinem 5'-Ende, der Promotorregion.

Um die Isolierung von Aktivatoren von *FLO* zu ermöglichen, sollten zuerst deren Bindestellen, die *cis*-aktiven Elemente, identifiziert werden um dann in einem South-western-screening zur Klonierung der korrespondierenden DNA-Bindeproteine zu ermöglichen. Diese Methode war schon bei der Klonierung von einigen DNA-Bindeproteinen und mutmaßlichen Transkriptionsfaktoren erfolgreich. Aktuelle



Beispiele sind die Klonierung von *SBP1* und *SBP2* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN 1* und *2*), die aufgrund ihrer Bindung an ein Element in der *SQUA*-Promotorregion isoliert wurden und deren Expressionmuster eine Beteiligung an der Aktivierung von *SQUA* nahelegen (Klein, 1994; Klein et al., 1996) und die Klonierung der *WRKY*-Gene, die vermutlich einen wichtigen Teil der Signaltransduktionskette in der Pilzabwehr darstellen (Rushton et al., 1996).

Schließlich könnte dann die Isolierung einer entsprechenden Mutante einen Einblick in die Funktion der isolierten Faktoren geben (= 'reverse Genetik').



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Biomaterial

#### 2.1.1 *Antirrhinum majus* Pflanzenmaterial

##### Material für Kernproteinextraktionen:

Infloreszenzen wurden von Pflanzen der Linie 'Snow man' (Walz, Stuttgart) geerntet, die den Sommer über im Freien kultiviert wurden. Vegetatives Gewebe wurde von 3 Wochen alten, in Flüssigkultur (1 x MS Salze, 1 x B5 Vitamine, 1 % Saccharose, 16 h Licht, 22°C) gehaltenen Pflanzen geerntet. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

##### Material für Transformationsexperimente (2.3.12, Seite 24)

Es wurden die Linien *niv::Tam3* (165E) aus der Sammlung des John Innes Center Norwich, UK und Yellow monarch (Crestensen Erfurt) verwendet.

#### 2.1.2 *E. coli* Stämme

##### DH5 $\alpha$ (life technologies, USA)

Genotyp: F *Phi80* $\Delta$ *lacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)*U169 endA1 recA1 hsdR17*(rK- mK+) *deoR thi-1 supE44*  $\lambda$ -*gyrA96 relA1*

Zur Amplifikation von Konstrukten, die vom binären Vektor pHyg35S (siehe 2.1.4) stammen, verwendet.

##### MC1061 (Casadaban und Cohen, 1980)

Genotyp: *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)*7696*  $\Delta$ (*lac*)*l74 galU galK hsdR2*(rK-mK+) *mcrB1 rpsL*(Str<sup>r</sup>)

Für einfache Plasmidamplifikationen verwendet.

##### M15[pREP4] und SG13009[pREP4] (Gottesman et al., 1981)

Beide Stämme sind Derivate von *E.coli* K12 und Bestandteil des Qiaexpress-Systems (Qiagen, Hilden).

XL0LR (Statagene Cloning Systems, USA)

$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F}^{\prime}$   
 $\text{proAB lacIqZ}\Delta M15 \text{ Tn10 (Tetr)]c Su}^{-} \lambda^{\dagger}$

Dieser Stamm ist gegen den Phagen  $\lambda$  resistent. Er wurde zur 'in vivo-Exzision' von Plasmid DNA (2.1.6, Seite 19) aus den Phagen  $\lambda$ ZAP und  $\lambda$ ZAP Express verwendet.

XL-1blueMRF' (Stratagene Cloning Systems, USA)

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96}$   
 $\text{relA1 lac [F}^{\prime} \text{ proAB lacIqZ}\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^{\dagger}\text{)]}$

Für einfache Plasmidamplifikationen und als Wirtstamm für die  $\lambda$ ZAP und  $\lambda$ ZAP-Express cDNA-Banken.

Y1090r (Young und Davis, 1983)

Genotyp:  $\Delta(\text{lac})U169 \Delta(\text{lon})? \text{ araD139 strA supF mcrA trpC22::Tn10 (Tet}^{\dagger}\text{)}$   
 $[\text{pMC9 Amp}^{\dagger} \text{ Tet}^{\dagger}] \text{ mcrB hsdR}$

Wurden als Wirtszellen für die  $\lambda$ gt22A cDNA-Expressionsbank verwendet.

### 2.1.3 *Agrobacterium tumefaciens* Stamm

GV3101[pMP90] (Koncz und Schell, 1986)

Für die Transformation von *Antirrhinum* verwendet.

### 2.1.4 Plasmide und Vektoren

pGC4

pGC4 enthält ein 3,5 kb großes genomisches *Bam*H1-Fragment, das die *FLO*-Promoterregion umfaßt. Es wurde von I. Leitner aus einer genomischen DNA-Bank der *Antirrhinum* Linie T53 (von Dr. Zs. Schwarz-Sommer zur Verfügung gestellt), unter Verwendung der *FLO*-cDNA (950 bp in pJAM101, von Dr. E. Coen zur Verfügung gestellt) als Sonde, isoliert. Die Subklonierung des 3,5 kb *Bam*H1-in pUC18 Fragmentes erfolgte durch Dr. G. Cardon (Plasmid pGC4). Die Sequenzierung (Methode nach Sanger) des Fragmentes erfolgte durch G. Cardon, unter der Verwendung des T7 Sequenzierungskits (Pharmacia).

pBluescript KS+ (Stratagene Cloning Systems, USA)

Verwendung für Subklonierungen.

pHyg35S

Das pHyg35S-Konstrukt wurde freundlicherweise von Frau Dr. Zs. Schwarz-Sommer zur Verfügung gestellt. pHyg35S ist ein Derivat des binären Pflanzenvektors pGPTV-HPT (Becker et al., 1992). Er trägt das Selektionsmarkergen Hygromycinphosphotransferase, daß die Selektion auf Hygromycin-haltigen Medien ermöglicht. In pHyg35S wurde das Glucuronidase-Gen durch eine 35S-Promotor-Terminator-Kassette ersetzt. Der CaMV35S-Promotor (= cauliflower mosaic virus 35S promoter) erlaubt konstitutive Genexpression in Pflanzen (Odell et al., 1985).

pQE60 (Bujard et al., 1987, Stüber et al., 1990)

Zur Überexpression von Protein in *E.coli*, Bestandteil des Qiaexpress-Systems (Qiagen, Hilden).

### **2.1.5 Oligonucleotide**

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden bei MWG Biotech, Bayern hergestellt. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide sind im Anhang dargestellt (siehe 8.2).

### **2.1.6 cDNA-Banken**

$\lambda$ gt22A *Antirrhinum*-Infloreszenz cDNA-Expressionsbank (Klein et al., 1996)

Die Bank wurde von Herrn Dr. J. Klein mit dem Superscript Synthesis kit (Katalog-Nr. 8256SA, BRL/Life Technologies Inc., USA) mit aus *Antirrhinum* 'Snow man' Infloreszenzen stammender RNA hergestellt und ist gerichtet kloniert (Han und Rutter, 1987). Für das 'South-western-screening' wurde die nach Herstellerangaben amplifizierte Bank verwendet.

$\lambda$ ZAP Express (Statagene, USA) *Antirrhinum majus* 165 E Gesamtpflanzen-cDNA-Bank

Diese amplifizierte Bank wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. Sommer zur Verfügung gestellt. Sie repräsentiert die mRNA-Population aus *Antirrhinum* 165E-Gesamtpflanzen aus verschiedensten Stadien.

$\lambda$ ZAP II (Statagene, USA) *Arabidopsis Landsberg erecta* Infloreszenz-cDNA-Bank

Diese amplifizierte cDNA-Bank repräsentiert die Infloreszenz-mRNA aus *Arabidopsis thaliana*, ssp. *Ler*, die jünger als Stadium 11 waren (Weigel et al., 1992). Die Bank wurde aus den allgemeinen Beständen des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Enzyme

Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, NEB (USA) und Promega (USA), *Pfu*-Polymerase wurde von Stratagene Cloning Systems (USA) bezogen.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Chemikalien, Radiochemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien des Reinheitsgrades p.A. wurden von Faust (Köln), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) verwendet.

Nylon-Membranen und Radiochemikalien wurden Amersham-Buchler (Braunschweig) geliefert. Die spezifische Aktivität von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP und  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP betrug 3000 Ci/mmol, die des  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 5000 Ci/mmol.

Antibiotika stammten von Bayer (Leverkusen) und Duchefa (Niederlande).

Das Reagenz für Proteinbestimmungen (Art.-Nr 500-0006) wurde von BioRad (USA) gekauft.

Nitrozellulosemembranen BA85 wurden von Schleicher und Schuell (Dassel) geliefert.

3MM Filterpapier stammte von Whatman (UK).

Säulen zur Aufreinigung von DNA wurde von Qiagen (Hilden) verwendet.

Röntgenfilme für Autoradiographie wurden von Kodak (USA) bezogen.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. SSPE, Denhardts Reagenz und Heringssperma-DNA wurden ebenfalls nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.

### 2.3.2 Hybridisierung von Northern blots

Hybridisierungen von Northern blots wurden nach Sommer et al. (1990) durchgeführt.

### 2.3.3 *In situ*-Hybridisierungen

*In situ*-Hybridisierungen wurden nach Huijser et al. (1992) durchgeführt. Abweichend davon wurde Digoxigenin-markierte RNA (Boehringer Mannheim) nach Perbal et al. (1996) hergestellt und detektiert. Um Kreuzhybridisierungen mit anderen HMG-Y-ähnlichen mRNAs auszuschließen, wurde für *HMR1* eine Probe hergestellt, die der HMR1-cDNA ab Nukleotid 800 entspricht.

### 2.3.4 Screening von cDNA Banken

#### Screening nach vollständige cDNAs

Die Prähybridisierung der Filter erfolgte bei 65°C in 6 x SSPE, 0,1 % SDS, 200 mg/l Ficoll, 200 mg/l PVP und 100 µg einzelstränge Heringssperma-DNA für eine Stunde.

Die Hybridisierung erfolgte üN bei gleicher Temperatur in gleicher Lösung, jedoch in 3 x SSPE und unter Zusatz von  $2 \times 10^6$  cpm/ml radioaktiver Sonde (50 ng markierte DNA; Hybridisierungsvolumen 10 ml/6 Nitrozellulosefilter Ø 14,5 cm). Es wurde 3 mal 10 min lang in 1 x SSPE, 0,1 % SDS, 1 x 10 min in 0,2 x SSPE bei 65°C gewaschen. Die Filter wurden bei -70°C üN auf einem Röntgenfilm in Kassetten mit Verstärkerfolien (3M Trimax) exponiert.

#### Heterologes cDNA-Screening

Die Prähybridisierung erfolgte pro 6 Filter (Durchmesser 14,5 cm) eine Stunde bei 58°C in 20 ml 5 x SSPE, 5 x Denhardt, 0,5 % SDS und 100 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA.

Die Hybridisierungen wurden unter gleichen Puffer- und Temperaturbedingungen über Nacht mit  $2 \times 10^6$  cpm/ml Sonde (50 ng markierte DNA; Hybridisierungsvolumen 10 ml/6 Nitrozellulosefilter Ø 14,5 cm) durchgeführt.

Das Waschen der Filter erfolgte 1 x 15 min, 1 x 20 min und 1 x 15 min in 2 x SSPE bei 58°C. Die Filter wurden bei -70°C üN auf einem Röntgenfilm in Kassetten mit Verstärkerfolien (3M Trimax) exponiert.

### **2.3.5 Klonierung von 5'-cDNA-Enden mittels PCR aus einer cDNA-Population**

Die hier verwendete Methode basiert auf dem SMART™-cDNA-Synthese-Protokoll der Firma Clontech. Es wurde eine cDNA-Population aus *Antirrhinum* Wildtyp-Pflanzen verwendet (von Dr. G. Cardon zur Verfügung gestellt). Diese cDNA wurde als Matrize für eine lineare PCR mit einem genspezifischen 3'-Primer verwendet. In diesem Schritt wird genspezifische Einzelstrang-DNA angereichert. Eine zweite Reaktion erfolgte mit dem für die Herstellung der cDNA verwendeten 5'-Primer und demselben 3'-Primer wie zuvor. Eine dritte 'nested PCR' mit demselben 5'-Primer wie zuvor, jedoch einem mehr zum 5'-Ende liegenden 'nested Primer' erlaubte dann die Amplifikation von spezifischen Banden, die subkloniert und sequenziert wurden.

### **2.3.6 Herstellung und radioaktive Markierung von *FLO*-Promotorregion-Fragmenten für EMSA**

*FLO*-Promotorregion-Fragmente für die Analyse mittels 'Electrophoretic Mobility Shift Assay' (EMSA) wurden mittels PCR hergestellt. Als Matrize diente das Plasmid pGC4 (siehe 2.1.4), das die *FLORICAULA*-Promotorregion enthält.

Die Aufreinigung und radioaktive Markierung erfolgte nach Klein et al. (1996).

### **2.3.7 Extraktion von Kernproteinen**

Kernproteine wurden nach Klein et al. (1996) isoliert. Die Qualität der Kernextrakte wurde mittels Inkubation mit einem dsDNA-Fragment, die die 'cAMP response element binding site' (CREB; Inamdar et al., 1991) enthielt, überprüft. Kernproteinextrakte wurden aus Infloreszenzen oder aus vegetativem Gewebe gewonnen (siehe 2.1.1).



### 2.3.8 Native Polyacrylamidgelelektrophorese zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen

Der Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen erfolgte über 'Electrophoretic mobility shift assay' = EMSA nach Klein et al. (1996).

### 2.3.9 Überexpression von Proteinen mit 'Histidin-tag'in *E. coli* und Aufreinigung

Zur Überexpression von Proteinen in *E. coli* wurde das pQE-System von Qiagen (Hilden) verwendet. Inserts wurden 'in frame' in den Vektor pQE60 kloniert, sodaß das resultierende Konstrukt für ein Protein mit C-terminalen Histidin-tag kodiert. Die überexprimierten Proteine wurden nach Herstellerangaben über einer NTA-Säule unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Die Qualität des überexprimierten Proteins wurde mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western blot überprüft, wobei der immunologische Nachweis mit dem Anti-penta-His-Antikörper (Qiagen) und dem Vectastain ABC-Kit (Vector Laboratories, USA) als Detektionssystem erfolgte. Für die Farbreaktion wurde als Peroxidasesubstrat DAB Tabletten, Artikelnr. D-4293 von Sigma (München) verwendet.

Vor Verwendung der Imidazol enthaltenden Proteinextrakte wurden diese gegen gegen den Elutionspuffer, jedoch ohne Imidazol mittels Tropfdialyse (Marusyk und Sergeant, 1980) unter Verwendung des Filters Millipore „V“ (Durchmesser 25 mm, Porengröße 0,025 µm ; Millipore, USA) dialysiert.

### 2.3.10 South-western-screening

South-western-screenings wurden, mit einigen Abweichungen, wie in Klein et al. (1996) beschrieben, nach einem Protokoll von Singh et al. (1989) durchgeführt.

Es wurden  $8 \times 10^5$  Phagen einer nach Herstellerangaben amplifizierten *Antirrhinum* Infloreszenz λgt22A cDNA-Expressionsbank (Klein et al., 1996), verteilt auf 24 Platten von 145 mm Durchmesser ausplattiert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde eine 30°C üN-Kultur von *E. coli* Y1090r<sup>-</sup> verwendet. Nach 5-stündiger Inkubation bei 42°C waren deutliche Plaques zu erkennen.

Anschließend erfolgte die Induktion und Immobilisierung der Proteine durch 6-stündiges Auflegen von Nitrozellulosefiltern (Schleicher und Schuell BA 85) bei 37°C, die zuvor jeweils halbstündig bei RT in 10 mM IPTG inkubiert und auf Whatman 3MM Filterpapier getrocknet wurden. Ein ebenso behandelter zweiter Filtersatz wurde für 2 h

bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde der erste Filtersatz für 15 min bei RT getrocknet.

Falls nicht abweichend angegeben, wurden folgende Waschschrirte und Bindungsreaktionen unter leichtem Schütteln bei 4°C durchgeführt. Der erste Filtersatz wurde für 10 min in Waschpuffer (7.5 mM Hepes/KOH pH 7.3, 35 mM NaCl, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM EDTA, 0.75 mM DTT, 7 % Glycerol) gewaschen.

Durch 10-minütige Inkubation in Waschpuffer, der 6 M Guanidiniumhydrochlorid enthielt wurden die Proteine denaturiert. Die Filter wurden in fünf weiteren Schritten gewaschen, wobei die Guanidiniumhydrochlorid jeweils halbiert wurde. Schließlich wurden die Filter 2 x für 10 min in Waschpuffer gewaschen. Der zweite Filtersatz wurde lediglich 15 min bei RT getrocknet.

Alle folgenden Schritte waren für beide Filtersätze identisch. Die Filter wurden für 10.5 Stunden in Blockierungspuffer (5 % Magermilchpulver in Waschpuffer) inkubiert.

Die Bindereaktion mit 3,5 x 10<sup>5</sup> cpm/ml radioaktiv markierter DNA erfolgte pro Filtersatz (= 24 Filter) in 150 ml Bindungspuffer (= 1 mM Spermidin, 5 µg/ml denaturierte Heringsperm-DNA, 0.25 % Magermilchpulver in Waschpuffer) für 4 Stunden. Anschließend wurde 2 x 30 min 1 x 60 min 1 x 30 min und schließlich 1 x 30 min bei RT gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte über Autoradiographie bei -70°C über Nacht in Kassetten mit Verstärkerfolien.

### **2.3.11 Radioaktive Markierung von DNA als Sonde für South-western-screening**

Die Markierung von DNA erfolgte wie in Klein et al. (1996) beschrieben, jedoch lediglich unter Verwendung von <sup>32</sup>P-markiertem dATP und dCTP.

### **2.3.12 Hypokotyltransformation und Regeneration von *Antirrhinum***

Transgene *Antirrhinum* Pflanzen wurden nach dem Protokoll von Heidmann et al. (1998) hergestellt.

### **2.3.13 Sequenzierungen**

DNA-Sequenzierungen in der MPI-Sequenziereinheit (ADIS) mit einem automatischen DNA-Sequencer (model 377, Applied Biosystems) durchgeführt.

### **2.3.14 Sequenzanalysen**

Die Verarbeitung von Nucleinsäure -und Proteinsequenzen wurde mit den Programmen assemble, bestfit, gap, map, pileup, pretty, publish und translate, aus dem Wisconsin Packet Version 9.1 von Genetics Computer Group (GCG), (Madison, Wisc, USA) für Digital UNIX Version 4.0 (Digital Equipment) durchgeführt.

Kernlokalisierungssignale wurden mittels PSORT, Version 6.3 (Nakai und Kanehisa, 1992) im WWW unter der Adresse <http://psort.nibb.ac.jp:8800/> identifiziert.

Sequenzvergleiche mit den Nucleinsäure- und Proteindatenbanken mit BLAST (Altschul et al., 1990) wurden ebenfalls im WWW unter der Adresse <http://www.blast.genome.ad.jp/SIT/BLAST.html> durchgeführt.

Mehrere Proteinsequenzen wurden mit Clustal W (Thompson et al., 1994) aus dem dem MacVector™ Packet Version 6.0 verglichen.

Proteinstrukturen wurden mit dem Programm 'protein toolbox' aus MacVector™ Version 6.0 nach Chou-Fasman (Chou und Fasman, 1978) und Robson-Garnier (Garnier et al., 1978), vorhergesagt. Bei diesen Methoden ist zu beachten, daß die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Vorhersage 60 % oder weniger ist.



### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, Gene aus *Antirrhinum* zu isolieren, die das Umschalten von vegetativem Wachstum zu generativem Wachstum steuern. Nach der hier verfolgten Strategie (1.7, Seite 14) sollten solche sogenannten Phasen-Umschalt-Gene auch Aktivatoren des *FLO*-Gens umfassen.

Die Regulation eines Gens geschieht über sogenannte *cis*-aktive Elemente, die sich häufig in der Promotorregion befinden. Das 5'-Ende des *FLO*-Gens, die Promotorregion, wurde von Herrn Dr. G. Cardon isoliert, sequenziert und zur Verfügung gestellt.

#### 3.1 Detektion von *cis*-regulatorischen Elementen in der *FLO*-Promotorregion

Zunächst sollten in der *FLO*-Promotorregion *cis*-aktive Elemente identifiziert werden, die später als Sonde in einem South-western-screening einer cDNA-Expressionsbank dienen sollten.

Eine gängige Methode, *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren, stellt die *in vivo*-Charakterisierung durch *in planta*-Expression von Promotorregion-Reportergenfusions-Konstrukten dar. Diese Experimente waren zu Beginn der Arbeit nicht realisierbar, da sich *Antirrhinum* nur mit geringer Effizienz transformieren bzw. regenerieren ließ (Eneva, 1995). Es wurde die Möglichkeit erwogen, entsprechende Reporter-Gen-Konstrukte in das leicht transformierbare heterologe System *Nicotiana tabacum* einzubringen.

Bezüglich der Verwendung von Tabak war jedoch folgendes zu beachten: Die homologen Gene von *FLO* aus Tabak, *NFL1* und *NFL2* werden in floralen und vegetativen Meristemen exprimiert (Kelly et al., 1995). Die Expression von *FLO* ist jedoch auf die floralen Meristeme begrenzt (Coen et al., 1990). Offensichtlich werden *NFL1/2* in Tabak über andere *trans*-aktive Faktoren reguliert als *FLO* in *Antirrhinum*.

Demnach erschien eine *in vivo*-Studie mit der *Antirrhinum FLO*-Promotorregion in Tabak, letztendlich mit dem Ziel, die auf diese Weise identifizierten *cis*-regulatorischen Elemente für die Isolation korrespondierender Faktoren zu verwenden, nicht geeignet.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von potentiellen *cis*-regulatorischen Elementen bestand darin, *in vitro*-Bindestudien von Promotorregion-Fragmenten mit Kernproteinextrakten durchzuführen. Die Detektion der DNA-Protein-Komplexe erfolgt durch Trennung von der ungebundenen DNA im Acrylamidgel unter nicht denaturierenden Bedingungen (EMSA = Electrophoretic Mobility Shift Assay). Der Vorteil dieser Methode ist, daß mit nativem, aus *Antirrhinum* relativ einfach isolierbarem Kernprotein gearbeitet wird

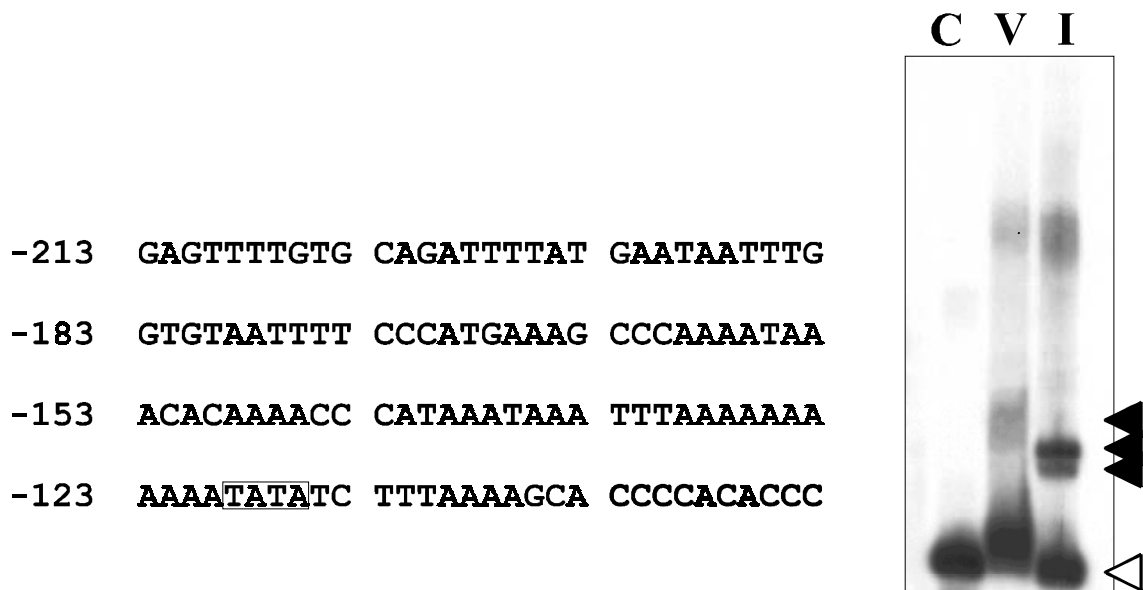
und daß keine transgenen Pflanzen hergestellt werden müssen. Dennoch muß auf einen Nachteil dieser Methode hingewiesen werden: Interagiert ein Nuklearprotein *in vitro* mit einem mutmaßlichen *cis*-regulatorischen Element, läßt sich noch nicht entscheiden, ob es *in vivo* regulatorische Funktion hat.

Aus früheren Untersuchungen, die mit Kernproteinextrakten aus vegetativem Gewebe bzw. aus Infloreszenzen durchgeführt wurden, war bekannt, daß DNA/Protein-Wechselwirkungen lediglich in den Bereichen -62 bis -251 und -768 bis -1074 stromaufwärts vom Start-ATG des *FLO*-Gens (Coen et al., 1990) nachweisbar waren (G. Cardon, persönliche Mitteilung). Die entsprechenden Experimente wurden mit relativ großen Fragmenten (ca. 200 bp) durchgeführt (Pabst, 1995). Meist waren mehrere DNA-Protein-Komplexe unterschiedlicher Größe entstanden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß an die DNA verschiedene Proteine gebunden hatten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Bereiche der Promotorregion zur genaueren Lokalisierung der Komplexe in kleinere Einheiten unterteilt. Im Folgenden soll insbesondere auf eine DNA-Protein-Interaktion im Bereich -94 bis -213 eingegangen werden. Dieses Fragment erschien deshalb interessant, weil es im Vergleich zu allen anderen untersuchten *FLO*-Promotorregions-Fragmenten (nicht gezeigt) am stärksten mit Nuklearproteinen interagiert hat.

### **3.2 Das AT-reiche *FLO*-Promotorregion-Fragment (-94/-213) interagiert spezifisch mit Kernproteinextrakten**

Das Fragment (-94/-213) der *FLO*-Promotorregion (auf das Startcodon des *FLO*-Gens bezogen, Coen et al., 1990) enthält in der Nähe seines 3'-Endes eine mutmaßliche TATA-Box und ist AT-reich (Abbildung 3-1). Mit diesem Fragment wurden Bindeexperimente, sowohl mit Infloreszenz-Kernproteinextrakten als auch mit Kernproteinextrakten aus vegetativem Gewebe durchgeführt. Das entsprechende Retardationsgel zeigt, daß in dem Ansatz mit Kernproteinextrakt aus vegetativem Gewebe verhältnismäßig schwache Bindung, in dem mit Infloreszenz-Kernproteinextrakt starke Interaktion stattfand (Abbildung 3-1). Da in diesen Ansätzen ein 1250-facher Überschuß an Plasmid-DNA (pUC18 mit *Hae*III geschnitten) als unspezifischer Kompetitor vorhanden ist, sind die beobachteten Interaktionen spezifisch.



**Abbildung 3-1.** links: Sequenz des Fragmentes (-94/-213) der *FLO*-Promotorregion (gerechnet vom Startcodon, Coen et al., 1990.). Die mutmaßliche TATA-box ist eingerahmt. Rechts: Autoradiogramm des EMSA, durchgeführt mit dem Fragment (-94/-213) und Kernproteinextrakten. C = Kontrolle, DNA mit Elutionspuffer, V = Reaktionsansatz mit Kernproteinextrakten aus vegetativem Geweben, I = Reaktionsansatz mit Kernproteinextrakten aus Infloreszenzen. Die ungebundene DNA ist mit weiß gefülltem Pfeilkopf, spezifische Komplexe mit schwarz gefüllten Pfeilköpfen markiert.

### 3.3 Zwei verschiedene cDNAs wurden in einem South-western-screening mit dem *FLO*-Promotorregion-Fragment (-94/-213) isoliert

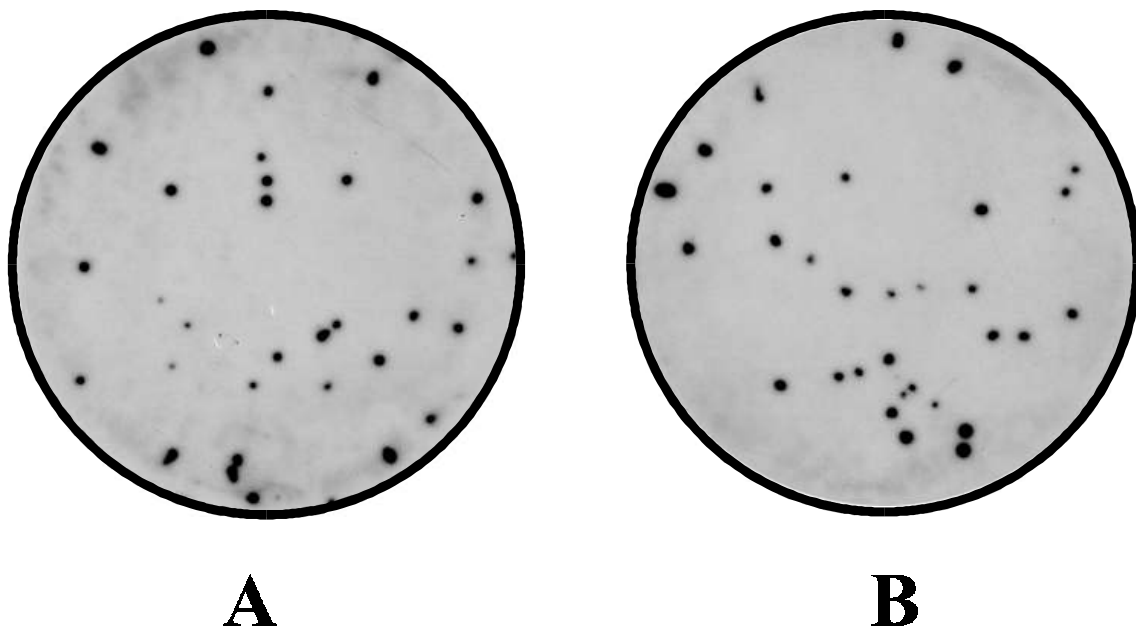
Anhand der Unterschiede in den Bindungsintensitäten in dem in 3.2 beschriebenen Experiment konnten keine sicheren Aussagen über die etwaigen Bindeaffinitäten *in vivo* getroffen werden (siehe Diskussion, 4.1).

In Übereinstimmung mit der hier verfolgten Strategie und der Expression von *FLO* wurde davon ausgegangen, daß sich Aktivatoren von *FLO* in den Infloreszenzen befinden müssen. Zur Klonierung des korrespondierenden DNA-Bindeproteins bzw. der DNA-Bindeproteine wurde deshalb ein South-western-screening einer *Antirrhinum majus* 'Snowman'-Infloreszenz- $\lambda$ gt22A-cDNA-Expressionsbank (Klein et al., 1996) mit dem Fragment (-94/-213) als Sonde durchgeführt.

Bei einem Screening von 800 000 Phagen konnten 12 Signale von vergleichbar starker Intensität auffindig gemacht werden (Abbildung 3-2). Diese Signale traten lediglich auf den Nitrozellulosefiltern auf, die vor der Hybridisierung mit Guanidiniumhydrochlorid behandelt wurden (zur Behandlung der South-western-Filter: siehe Seite 24). Die hierfür ursächlichen DNA/Protein-Interaktionen waren auch nach langem und stringentem

Waschen, d. h. über 3 Stunden und bis zu Raumtemperatur, stabil. Der zweite Filtersatz, auf dem die Proteine nativ gebunden waren, zeigte keinerlei Interaktion mit der angebotenen Sonde.

Nach Subklonierung der korrespondierenden Phagen-DNA-Inserts in pBluescript-Plasmide zeigte sich, daß deren Größen unterschiedlich waren: 6 cDNAs zeigten eine Größe von ungefähr 1,6 kb und 6 cDNAs von ungefähr 1,1 kb. Die Sequenzierung ergab, daß es sich tatsächlich um zwei unterschiedliche cDNAs handelt.



**Abbildung 3-2.** Autoradiogramme von South-western-Filtern des ersten Rescreenings. Phagen-Klone in die die 1,6 kb-cDNA inseriert war (A) verursachten die gleiche Signal-Intensität wie Phagenklone, die die 1,1 kb-cDNA enthielten (B). Die Signale konnten nur auf Filtern detektiert werden, die mit Guanidiniumhydrochlorid behandelt wurden.



### 3.4 Sequenzanalyse der cDNAs, die aus der *Antirrhinum* Infloreszenz-Expressionsbank isoliert wurden

#### 3.4.1 Die 1,6 kb lange cDNA, *HMRI* zeigt hohe Homologie zu pflanzlichen HMG-I/Y-DNA-Bindeproteinen

In der cDNA-Sequenz des *HMRI* (für *HMG-Y/I Related 1*, zur Namensgebung s. u.) genannten Gens fällt der hohe GC-Anteil auf, wodurch Sequenzierung und PCR-Amplifikationen erheblich erschwert wurden.

Das mutmaßliche Leseraster dieser cDNA kodiert für ein 400 Aminosäuren langes Polypeptid (Abbildung 3-3). Northern blot-Hybridisierungen zeigten, daß die *HMRI*-mRNA ungefähr 1,7 kb groß ist (siehe 3.6.1). Demnach ist die cDNA am 5'-Ende unvollständig. Deshalb wurde, unter Verwendung der *HMRI*-cDNA als Sonde, ein Screening einer *Antirrhinum* 165E Gesamtpflanzen-cDNA-Bank (von Herrn Dr. H. Sommer zur Verfügung gestellt) nach vollständigen *HMRI*-cDNAs durchgeführt. Leider konnten nur cDNAs isoliert werden, die am 5'-Ende noch stärker verkürzt waren als der ursprüngliche, aus der cDNA-Expressionsbank isolierte Klon. Auch der Versuch, das 5'-Ende mit Hilfe eines PCR-Protokolls (2.3.5) zu synthetisieren, schlug fehl.

Dennoch ist es wahrscheinlich, daß die *HMRI*-cDNA im Hinblick auf ihre kodierende Sequenz vollständig ist. Das in Abbildung 3-3 dargestellte Startcodon zeigt nämlich eine gute Übereinstimmung mit dem Konsensus eukaryotischer Startcodons (Kozak, 1981).

**Legende zu Abbildung 3-3 (Seite 32).** Die *HMRI* cDNA-Sequenz mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Das dargestellte Startcodon ist zwar mutmaßlich, jedoch wahrscheinlich, weil es gute Übereinstimmung mit dem Konsensus eukaryotischer Startcodons zeigt (Kozak, 1981). Die Familienzugehörigkeit von HMR1 zu den pflanzlichen HMG-Y/I bzw. HMG-Y/I-ähnlichen DNA-Bindeproteinen wird durch die für diese Faktoren charakteristische Histon H1-Domäne (unterbrochen unterstrichen) und die AT-hook-DNA-Bindemotive (unterstrichen) bestimmt. Die GRP-'core'-Motive der AT-hooks sind konserviert (fett dargestellt). Mutmaßliche Kernlokalisierungssignale sind mit Kreuzen versehen. In den Positionen AS 283 bzw. 284 bis AS 299 wurde ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (Dingwall und Laskey, 1991), in den Positionen AS 282 bis 285, AS 296 bis AS 299 und AS 319 bis AS 322 einfache Kernlokalisierungssignale (Raikhel, 1992) gefunden. Zwei potentielle Leucine-zipper-Motive wurden in den Positionen AS 95 bis AS 109 bzw. AS 336 bis AS 350 identifiziert (entsprechende Leucine sind mit Pfeilen markiert).

## Ergebnisse

1	TTTTTTTTTTCTCTTCTCTCTCTGCTTTCGAAATTCCTCCCTTTCTTTCTCTCTCTCTCTCTATATCAGATATT	80	
81	TGAAGATGGACTCACAAACAGCAACCGCAACAGCAACTGGATCCAGCACCACAAGCAGCCCCCTGTTCCTGTTCCTGTT	160	
1	M D S Q Q Q P Q Q Q L D P A P Q A A P P V P V P V	25	
161	CCTACTACTACTGCTGAGGCCCTATCCCCAACCCCGTGCCTAACCCCAACCCCAAAACGCGCCCCGCCACAACCACCC	240	
26	P T T T A E A P I P N P V A N P T P K R A P A H N H P	52	
241	CCCTTATGCTGAGATGATAACATCCGCCATATCCGCGTTGAACGAGCGCAACGGGTCGAGCAAGAGGGCCATAGCCAAGT	320	
53	P Y A E M I T S A I S A L N E R N G S S K R A I A K Y	79	
321	ACGTTGAGTCCAACCTCACTGGCCTCCAGCCACTCAGCCTCCCTCTGGCCACCCATCTCAAGAGGCTCAAAGACACC	400	
80	V E S N F T G L P A T H A S L L A T H L K R L K D T	105	
	↑ ↑		
401	GGCGATATTCTCATGGTCAAGCACTCCTACAAGTCCCCAGACTGCCCCATCAAACGGCGCGTTTCTGCTGATCCATC	480	
106	G D I L M V K H S Y K L P R S A P S N G A V S A D P S	132	
	↑		
481	CACCAAGAGGCGACCGGGACGCCCGCAAGGACAACCCCAAGAACCTCCAAGCGCGTCCCGTTTTGCCCCGCAGG	560	
133	T <u>K R R P G R P R K</u> D N P Q N L Q A A V P V F A P Q V	159	
561	TCGACATCAACGCCGACCGGAGATTGCTGTGCAACAGGGTCCGTTTATGTGCAACTTGGCCGATAAAACGGGCCTTCT	640	
160	D I N A A P E I A V E Q G S V Y V E L G P I N G P S	185	
641	CCCCAAGAGGGCGTGGCCGTCGCGCAAGCAGGGTGGGAGGGGAGAGGGCGTGGCGTCCACCAAGACTGCTGTGTC	720	
186	P <u>P R G R G R P P K</u> Q G G R <u>G R G R G R P P K</u> T A V A	212	
721	TCCTCTGCTGCTGCTGCTGCGCTGTTCTGTTGCTCCTGCTGCTGCTGCGTTCGCGCCAGCTGCCCAAGTTAAGGGGCCG	800	
213	P P A A A A A A V P G A P A A A V A P A A Q <u>V K G P G</u>	239	
801	GGAGACCACGAGGCCGACCACCAAGCCCATTAATGTGGTTGAAGGCGGGCGTGGCAGCTCCCGTTGCTGTACCTGCT	880	
240	<u>R P R G R P P K</u> P I N V V E G G A V A A P V A V P A	265	
881	GGTGGTGTTTTGCCTGGCTGGTGGAAAGTGTGTTGTCGGGGTGGCACCAAAGCGTAGAGGGCGCCCCCAAAGGCCG	960	
266	G G V L P V A G G S V V A G V A <u>P K R R G R P P K</u> A G	292	
	x x x x		
961	TGGTGAAGCGAAAAACCGAGGTTGCAGACTGTTGTCAAACCAAGACTCCAAGAAAGCTATCTGAAAGCCTTTGGGCC	1040	
293	G E A K K P R L Q T V V K P K T P R K L S <u>G K P L G R</u>	319	
	x x x x	x	
1041	GGCCCAAGAAGAATGCGCGGCGAGCTGTATCTCAAGTTGCAGACACCAGCTGCTAGTGGCCTATCTTGATCTCAAAGGA	1120	
320	<u>P K K N A A A A V S Q V A D T Q L L V A Y L D L K G</u>	345	
	x x x	↑	↑
1121	AAACTTGAAAATTTGCAATCAAGAGTCAAACCTAGCAGCGAACGTGATCAAACCGTGTCTGACCACTGAGGATGCAGTTAA	1200	
346	K L E N L Q S R V K L A A N V I K P C L T T E D A V N	372	
	↑		
1201	TGCTTTTCAAGAACTAGAAAATGTTGGCAACTGAATACAACAGCACCACCGAACGTTCAACCCAGCAGCCTCAGCCCC	1280	
373	A F Q E L E M L A T L N T T A P P N V Q P Q Q P Q P Q	399	
1281	AAAGCTGAAAAGAGTTGCTAACTTGCAGAGAGAAGTGAAGTGTATGTAGTGTGACTTCTGGATGAAGAATTTGAAATT	1360	
400	S *	400	
1361	CTGTAGGAGGTACTGTTAAAATTAGGATGAGTTGTAGAGGGAACAGAAAATTGATGTTATATATGGATGAAGGCCAGCTC	1440	
1441	CATTGCACAATCTCTGTTGCTGTGTTTTAGTTTGGAAAACATTTAGAGAGTATGATTAAGACTCTGGTGGTGTATTG	1520	
1521	TTATTTGTACTTTAGTTAGAAAACCTGCAGTGTAGTGTATTGTTAAGTGAATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAA	1592	

**Abbildung 3-3.** Sequenz der *HMRI*-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Legende siehe Seite 31.

In der abgeleiteten HMR1-Proteinsequenz wurde mit Hilfe von PSORT (Nakai und Kanehisa, 1992) ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (Dingwall und Laskey, 1991) und weitere einteilige Kernlokalisierungssignale (Raikhel, 1992) gefunden (Abbildung 3-3).

Weitere Sequenzvergleiche mit den Gen- und Protein-Datenbanken wurden mit BLAST durchgeführt (Altschul et al., 1990).

Auf Nucleotidebene wurden in der Nähe des 5'-Endes von *HMR1* vor allem Ähnlichkeiten zu dem Tabak-DNA-Bindeprotein *PABF* (Genbank-Zugangsnr. U06712), ferner zu *Histon H1* aus *Triticum aestivum* und zu einem *Arabidopsis* EST-Klon (Genbank-Zugangsnr. AA394712) gefunden. Der EST-Klon AA394712 korreliert weder mit HMG-Y noch mit Histon H1 aus *Arabidopsis* und kodiert anscheinend wie *HMR1* für eine Histon H1-Domäne und AT-hooks (s. u.).

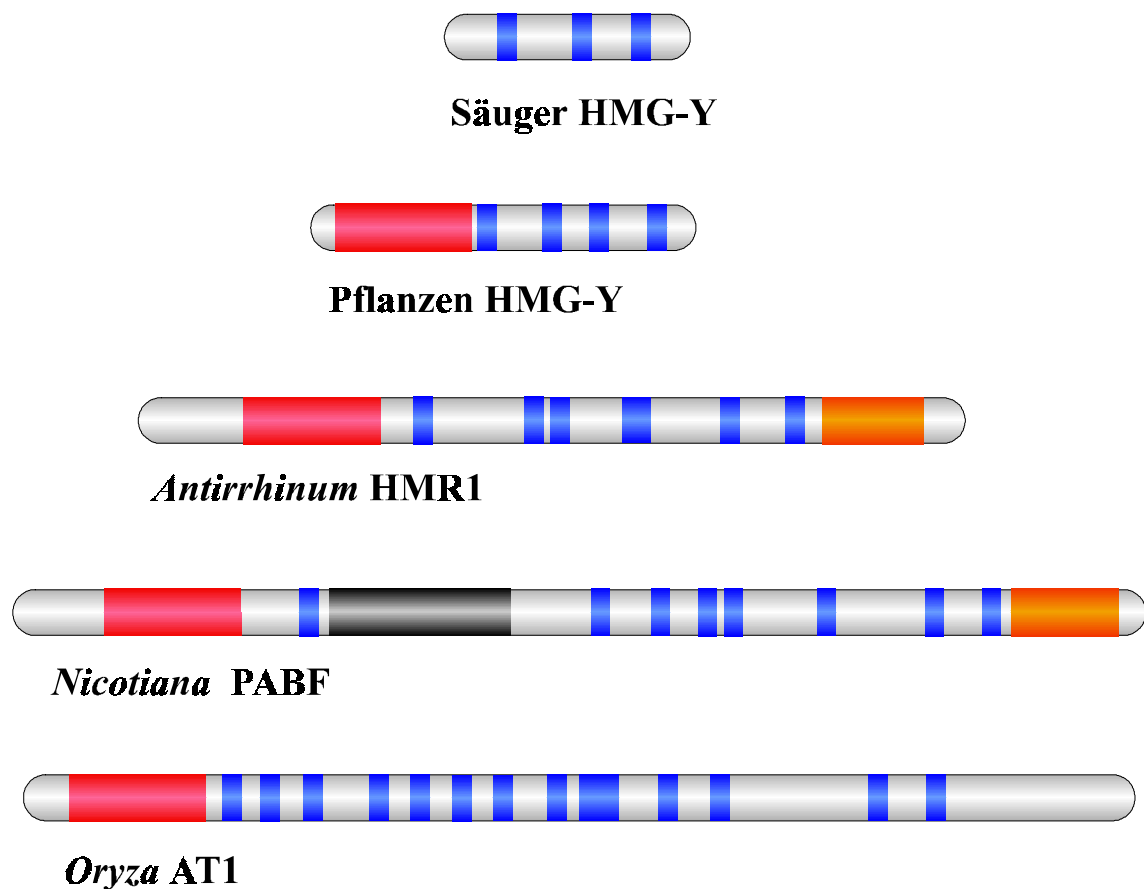
Ein Sequenzvergleich mit den allgemein zugänglichen Proteindatenbanken mit BLASTP ergab, daß HMR1 ebenfalls auf Proteinebene die größte Ähnlichkeit zu dem Tabak DNA-Bindeprotein PABF zeigt.

HMR1 zeigt auf Proteinebene ebenfalls große Ähnlichkeit zu dem erst neuerdings isolierten HMG-Y aus der japanischen windenden Schwertbohne, *Canavalia gladiata* (Yamamoto und Minamikawa, 1997) und zu HMG-Y aus *Arabidopsis* (Gupta et al., 1997B). Ferner wurden Verwandtschaften zu PF1 aus Reis (Nieto-Sotelo et al., 1994A) und Hafer (Nieto-Sotelo et al., 1994B), zu AT1 aus Reis (Meijer et al., 1996), SB16A bzw. SB16B aus der Soyabohne (Laux et al., 1991) und HMG-Y aus *Pisum* (Gupta et al., 1997A) gefunden. Außerdem ist HMR1 zu ATBP-1 aus Tabak ähnlich (Tjaden und Coruzzi, 1994). Sequenzvergleiche von *ATBP-1* mit *PABF* (Daten nicht gezeigt) und Northern blot-Hybridisierungen (Tjaden und Coruzzi, 1994) belegen, daß es sich um das identische Gen handelt, jedoch fehlt in der *ATBP-1*-cDNA das für die Histon H1-Domäne kodierende 5'-Ende.

Alle gerade erwähnten Faktoren, wie auch HMR1 selbst, gehören zu der erst neuerdings beschriebenen Genfamilie der pflanzlichen HMG-Y/I bzw. HMG-Y/I-ähnlichen DNA-Bindeproteine (HMG = High Mobility Group, Übersicht bei Grasser, 1995).

Faktoren dieser Familie besitzen an ihrem N-Terminus eine Domäne, die zur globulären Domäne von Histon H1 ähnlich ist. Die höchste Homologie wird dabei zu pflanzlichen Histonen H1 gefunden, außerdem ist die Ähnlichkeit zu Histon H1 aus Pilzen und Tieren und zu Histon H5 aus Huhn noch signifikant. Als weiteres Charakteristikum besitzen alle Proteine der pflanzlichen HMG-Y bzw. HMG-Y-ähnlichen Faktoren sogenannte AT-hook-DNA-Bindemotive. Die Anzahl der AT-hooks schwankt zwischen 4 (HMG-Y im engeren Sinne) und 14 (AT1 aus Reis) sehr stark. AT-hook-Motive wurden zuerst in HMG-Y/I aus Säugern (Lund et al., 1987) und chromosomalem

Protein D1 aus *Drosophila* (Ashley et al., 1989) gefunden. Säuger-HMG-Y bzw. HMG-I, Proteinprodukte des gleichen, differentiell gespleissten Gens (Friedmann et al., 1993), besitzen im Unterschied zu den pflanzlichen HMG-Y keine Histon H1- Domäne und lediglich drei AT-hooks. Saure Domänen, wie sie in Säuger-HMG-Y/I zu finden sind, fehlen in HMG-Y aus Pflanzen. Abbildung 3-4 gibt einen vergleichenden schematischen Überblick über die Domänenstruktur von HMG-Y aus Säugern, pflanzlichen HMG-Y, HMR1, PABF und AT1 wieder.



**Abbildung 3-4.** Schematischer, maßstabsgetreuer Vergleich der Proteindomänenstruktur von HMR1 mit HMG-Y aus Säugern, HMG-Y aus Pflanzen, PABF aus Tabak (Genbank-Zugangsnr. U06712, entspricht dem vollständigen Protein von ATBP-1 aus Tabak; Tjaden und Coruzzi, 1994) und AT1 aus Reis. Die Histon H1-ähnliche Domäne ist rot, AT-hook-DNA-Bindemotive sind blau dargestellt. Die Histon H1-Domäne ist spezifisch für pflanzliche HMG-Y bzw. HMG-Y-ähnliche Faktoren und ist nicht in Säuger HMG-Y/I zu finden. Die orange gefärbte, vermutlich  $\alpha$ -helicale Domäne am C-Terminus ist außer in HMR1 lediglich in Tabak PABF bzw. ATBP-1 zu finden. PABF/ATBP1 enthalten eine Domäne, die reich an Glutaminen ist (dunkelgrau gefärbt).

Das AT-hook-DNA-Bindemotiv wurde ursprünglich von Reeves und Nissen (1990) mit der Konsensussequenz TPKRPRGRPCK definiert und über Computersimulationen als hakenförmige Struktur vorhergesagt (hook = haken). Diese Konsensussequenz basiert auf dem Vergleich der drei AT-hook-Motive aus Säuger-HMG-Y/I. Mittlerweile sind mehr AT-hook-Sequenzen in den Datenbanken verfügbar. Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt, daß das TP (Threonin-Prolin) am N-Terminus des von Reeves definierten AT-hook überhaupt nicht und lediglich das GRP (Glycin-Arginin-Prolin)-Motiv strikt konserviert ist (Aravind und Landsman, 1998). Dieses 'core'-Motiv ist meist mit basischen Aminosäuren wie Lysin (K) und Arginin, teilweise auch von Glycin und Prolin umgeben. In den meisten Fällen befindet sich in der Position N-terminal des GRP ein Arginin. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen, daß das AT-hook-Motiv spezifisch in die kleine Grube von AT-Stretchen der DNA-Doppelhelix bindet und daß an diesem Kontakt maßgeblich die Arginine aus dem RGRP Motiv beteiligt sind (Geierstanger et al., 1994). Das AT-hook-Bindemotiv aus HMG-I bindet *in vitro* an AT-Stretche von mindestens 5 Nucleotiden, die Bindeaffinität erhöht sich wenn der AT-Stretch größer ist (Maher und Nathans, 1996).

HMR1 enthält sieben AT-hook-DNA-Bindemotive, wobei Motiv 4 und 5 verscholzen sind. Ein Vergleich der sieben AT-hook-Sequenzen aus HMR1 ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

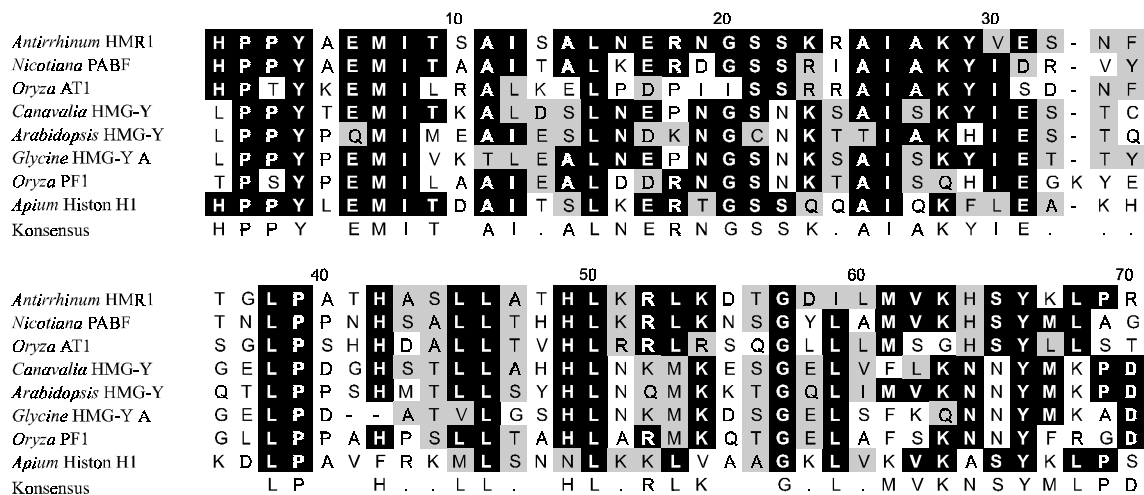
1	k-rp---r-	142
2	p-----	195
3	-----	208
4	vk-p---rg	243
5	--p-----	247
6	pkr-----	290
7	--pl---k-	322
	Konsensus	GRGR <b>GRP</b> PK
	HMG-Y Kons.	k-p----k-

**Abbildung 3-5.** Sequenzvergleich der sieben AT-hook DNA-Bindemotive aus HMR1. Zu der Konsensussequenz identische Aminosäuren sind mit einem Strich, von ihm abweichende Aminosäuren mit Kleinbuchstaben dargestellt. Auf der rechten Seite ist die jeweilige Aminosäureposition im HMR1-Protein wiedergegeben. Zum Vergleich ist noch die Konsensussequenz der drei AT-hooks aus HMG-Y aus Säugern dargestellt (Reeves und Nissen, 1990).

Aus diesem Vergleich ist ersichtlich, daß lediglich in vier AT-hooks das von Geierstanger et al. (1994) für die Bindung an AT-DNA als wichtig befundene Arginin N-terminal des GRP-Motivs vorhanden ist (siehe Diskussion, 4.3).

Wie bereits erwähnt, befindet sich im N-Terminus von HMR1 eine Histon H1-ähnliche Domäne. Ein Sequenzvergleich dieser Domäne mit den Histondomänen anderer pflanzlicher HMG-Y/I bzw. HMG-Y/I ähnlicher Faktoren und mit der globulären Domäne aus dem Histon H1 aus Sellerie, *Apium graveolens* (Genbank Zugangsnr. Y12599) wurde der mit dem Programm 'Clustal W' aus MacVector durchgeführt und ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Die Sequenz von Histon H1 aus *Apium* wurde für diesem Vergleich beispielhaft herausgegriffen, da es das Histon mit der größten Ähnlichkeit zu HMR1 darstellt.

In der Nähe des C-Terminus von HMR1 wurde eine Domäne gefunden, die sonst lediglich noch in verwandter Form in PABF/ATBP-1 aus Tabak vorhanden ist (Sequenzvergleich in Abbildung 3-7). Berechnungen mit dem Programm 'protein toolbox' aus MacVector 6.0 sagen, unabhängig von der verwendeten Methode (siehe 2.3.14), in diesem Bereich sowohl in HMR1 als auch ATBP-1 eine  $\alpha$ -Helix voraus. Interessanterweise findet sich in diesem Bereich bei HMR1 ein kurzes Leucin-Zipper-Motiv. Die Anwesenheit dieses Motivs deutet auf eine mögliche Interaktion mit anderen Kernproteinen hin (Pabo und Sauer, 1992). Ein weiteres Leucin-Zipper-Motiv wurde außerdem im C-terminalen Teil der Histon-Domäne aus HMR1 (Abbildung 3-3, Seite 32) gefunden, wie auch an gleicher Stelle in AT1 aus Reis. Auch dieser Bereich wurde als Helix vorhergesagt.



**Abbildung 3-6.** 'Clustal W'-Protein-Sequenzvergleich der N-terminalen Histon-Domäne von HMR1 mit den Histon-Domänen von dem DNA-Bindeprotein PABF aus Tabak (Genbank-Zugangsnr. U06712), HMG-Y aus *Oryza* (= PF1; Nieto-Sotelo et al., 1994A), *Canavalia* (Yamamoto und Minamikawa, 1997), *Arabidopsis* (Gupta et al., 1997), *Glycine* (= SB16A; Laux et al., 1991), und Histon H1 aus *Apium* (Genbank-Zugangsnr. Y12599). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt.

		↓            ↓            ↓	
<b>HMR1</b>	331	VADTQLLVAYL <b>DL</b> KGKLE <b>NL</b> QSRVKLAANVIK <b>PCL</b> TTED---AVNAFQ <b>ELE</b> MLA	381
		:  : :      :          :          :              :	
<b>PABF</b>	483	VSDPKLVVAYEELKGKLE <b>HM</b> QSRIKEAANAL <b>KPCL</b> NAESPAIALAALQ <b>ELE</b> EELA	536

**Abbildung 3-7.** Sequenzvergleich einer C-terminalen Domäne von HMR1 und Tabak PABF. Identische Aminosäuren sind mit einem senkrechten Strich, ähnliche Aminosäuren mit Doppelpunkten versehen, Lücken sind mit Bindestrichen dargestellt. Der Sequenzbereich ist 70,6 % ähnlich bzw. 62,7 % identisch. Die Leucine des mutmaßlichen Leucine-Zipper-Motivs in HMR1 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Ziffern bezeichnen die entsprechenden Positionen in den Proteinsequenzen. Strukturvorhersagen mit dem Programm ‘protein toolbox’ aus MacVektor sagen hier sowohl für HMR1 als auch für ATBP-1 eine  $\alpha$ -Helix voraus. Es wurden keine weiteren Proteine in den Datenbanken gefunden, die diese Domäne enthalten.

### 3.4.2 Die 1,1 kb lange cDNA, *SAPI* besitzt außer einem ‘AT-hook’ keine bekannten Sequenzmotive

Die zweite, 1,1 kb lange cDNA enthielt kein Start-ATG und war demnach am 5'-Ende unvollständig. Aus diesem Grund wurde ein Screening der bereits unter 3.4.1 erwähnten *Antirrhinum majus* 165E-Gesamtpflanzen-cDNA-Bank nach vollständigen cDNAs, mit der 1,1 kb-cDNA als Sonde, durchgeführt. Es wurden wiederum zwei am 5'-Ende unvollständige cDNAs isoliert. Davon enthielt eine cDNA, wie sich später herausstellte, ein komplettes Leseraster.

Mit Hilfe einer Kombination von linearer, exponentieller und ‘nested’ PCR auf einem *Antirrhinum* Infloreszenz-cDNA-Pool konnte schließlich das mutmaßlich vollständige 5'-Ende synthetisiert werden. In der Nähe des 5'-Endes befinden sich drei Stop-Codons, sodaß das Start-Methionin ermittelt werden konnte. Demnach fehlte dem ursprünglich aus der cDNA-Expressionsbank isoliertem Klon lediglich die Sequenzinformation für die ersten zwei Aminosäuren. Die nunmehr 1137 bp lange cDNA kodiert für ein Polypeptid, das 300 Aminosäuren lang ist (Abbildung 3-8).

Die beim South-western-screening detektierten Signale waren, unabhängig davon, ob sie von *HMR1* oder von der 1,1 kb-cDNA herrührten, gleich stark (Abbildung 3-2). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob dies eventuell in Gemeinsamkeiten in der Proteinsequenz begründet ist. Bei einem Vergleich der Proteinsequenzen wurde mit Ausnahme eines einzigen AT-hooks (Aminosäuren 47-55, Abbildung 3-8) keinerlei signifikante Sequenzähnlichkeiten zu HMR1 gefunden. Deshalb wurde das Gen *SAPI* (für *Single AT-hook Protein 1*-Gen) genannt. Mittels dem Computerprogramm PSORT (Nakai und Kanehisa, 1992) wurden drei mutmaßliche Kernlokalisierungssignale identifiziert, zwei davon liegen innerhalb des AT-hook.

Bei weiteren Vergleichen mit den Proteindatenbanken wurde zunächst keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen gefunden. Eine TBLASTN-Analyse mit den EST-Datenbanken ergab auf Proteinebene Sequenzhomologien zu einem Reis-EST-Klon (Genbank-Zugangsnr. D15459). Dieser zeigte auf Proteinebene ebenfalls einen AT-hook, vor allen Dingen aber auch Homologien über einem weiten Bereich außerhalb des AT-hooks (nicht gezeigt).

```

1 CAATAAAATAATAATAATAATAAAAAAGAAAAAAGAAAAATCCCAAATCCAATGGAACAACCTAATAATGACGGCAACAAT 80
1 M E Q P N N D G N N 10

81 GGAGGGTCTTGCTACCGCCCTCAGCTCCCTAACCAATCGCCGGCGGAACGGAGTACCGAACAGTACAACCACGAACAG 160
11 G G S C Y R P Q L P N Q S P P A N G V P N S T T T N S 37

161 CACACACTCGCCGCTAACGAGAGCGTGAAGAGGAAAGAGGAAAGACCTAGAAAAGTACGGAACGCGGAGCAAGCGGCGG 240
38 T H S P P N E S V K R K R G R P R K Y G T P E Q A A A 64
X X X X X X X X

241 CGGCTAAGCGACTGTGCGGCGCAAGAAGAGAGACTCTGCTAGCGGCGTTGCTTCAGTCTCGTCGGCTTCTTCAAGAAA 320
65 A K R L S A P K K R D S A S G V A S V S S A S S K K 90
X X X X

321 TCGCCGCTCGCTGCTCTCGGCAATATGGGCAAAGCTTCAGTCCCATATCATCACTGTTGCTGCTGGAGAAGATGTGGG 400
91 S P L A A L G N M G Q S F S P H I I T V A A G E D V G 117

401 TCAAAAAATCATGATGTTTGTGCAACAAAGCAAACGTGAAATATGCGTTATCTCGGCCTCTGGTTCAGTCTCCAGTGCAT 480
118 Q K I M M F V Q Q S K R E I C V I S A S G S V S S A S 144

481 CTCTACGCCAGCAAGCATCATCTGGGGCAGTGTACATATGAGGGGCGATTGACATCCTTTCTCTATCTGGTCTCTTTC 560
145 L R Q Q A S S G G S V T Y E G R F D I L S L S G S F 170

561 ATCCATGCTGAATTTGGAGGGAGAAGTGGAGGACTCAGTGTATGTCTGTCCAGTTCTGATGGCCAAATTATTGGTGGTGG 640
171 I H A E F G G R T G G L S V C L S S S D G Q I I G G G 197

641 AGTCGGTGGACCTCTTACAGCTGCAGCAACTATTACAGTAAATGTCGGGACATTTGTCGTTGAAACCAAGAAAGATGCTA 720
198 V G G P L T A A A T I Q V I V G T F V V E T K K D A N 224

721 ATGTCGAAGCTGTGCTTCCGGGAAATCACCATACCAAATGGCGGCGCATCAGCGCCAGGTCTTAGCTTCAGGTCACCT 800
225 V E A A A S G K S P S P N G G A S A P G L S F R S P 250

801 GCTGACTCTGGTATCCAAATGGGGGGTGGTGGAAACCCGTTTCTGATTCAGAACCGGACCATGCATATGACACCGATGGA 880
251 A D S G I Q M G G G G N P F L I Q N R T M H M T P M E 277

881 ATGGATAGGCAGCGCAGATCAGGATGCACCAGTCTCCGAGAATGGTACTATGATCAGTCCAGATTAGAATTATT 960
278 W I G S A D H G M H Q S P E N G D Y D H I P D * 300

961 GCATCGCGGGTAGATTTATCTGATTATTCACAGTTTTATTTCTGCAATACAATACTTTAGTGTACAGGGAAGGGGGTA 1040
1041 TGGATTATGTTTCTTTTGGCAGCTCATAAATTTTATTTGGATGTGATGTATCTAAATACCTTTTGCCTTTAAAAAAA 1120
1121 AAAAAAAAAAAAAAAAAA 1137

```

**Abbildung 3-8.** Sequenz der *SAPI*-cDNA mit abgeleitetem Leseraster. Die schwarze Pfeilspitze in der Nähe des 5'-Endes gibt das erste Nucleotid der im South-western-screen isolierten cDNA wieder. Das AT-hook-DNA-Bindemotiv ist unterstrichen, das konservierte GRP (Glycin-Arginin-Prolin) ist fett dargestellt. Zwei der drei mutmaßlichen Kernlokalisierungssignale befinden sich innerhalb des AT-hook (mit Kreuzen markiert).



### 3.5 SAP1-verwandte Proteine aus *Antirrhinum*, *Arabidopsis*, *Sinapis* und *Oryza*

Im Gegensatz zu *HMR1*, das Mitglied einer bereits beschriebenen Genfamilie ist, handelt es sich bei *SAP1*, wird einmal von dem AT-hook-Bindemotiv abgesehen, um ein Gen, das für ein neuartiges DNA-Bindeprotein kodiert. Interessant war nun die Frage, ob es sich bei *SAP1* auch um ein Mitglied einer Genfamilie handelt oder um ein einmaliges Gen.

#### 3.5.1 Isolierung von *SAP1*-homologen Genen aus *Antirrhinum*

Im Rahmen des unter 3.4.2 erwähnten Screening der *Antirrhinum* 165E-cDNA-Bank nach vollständigen cDNAs wurden, trotz stringenter Bedingungen, neben der *SAP1*-cDNA überraschenderweise noch drei weitere cDNAs isoliert, die sowohl auf DNA-Ebene als auch auf der Ebene der abgeleiteten Proteinsequenzen zu *SAP1* sehr ähnlich sind und ebenfalls ein AT-hook-Motiv enthalten. Die Sequenzen der *SAP2* und *SAP3* genannten cDNAs mit abgeleiteten Leseraster sind im Anhang (8.1) dargestellt. Die cDNA von *SAP2* besitzt, ähnlich wie *SAP1*, eine Größe von ungefähr 1,2 kb. *SAP3* wurde in zwei Versionen isoliert: Einmal in der Größe von ebenfalls 1,2 kb und einmal in der Größe 1,6 kb. Diese Größenunterschiede befinden sich in der 3'-UTR (nicht translatischer Bereich am 3'-Ende). Ein Sequenzvergleich der *SAP1*-, *SAP2*- und *SAP3*-Proteine (Abbildung 3-9) zeigt, daß die offensichtlichsten Unterschiede am N-Terminus in der Umgebung des AT-hooks zu finden sind, während der restliche Teil sehr hoch konserviert ist.

Aus diesen Daten ließ sich schließen, daß *SAP1* Mitglied einer neuen Genfamilie innerhalb von *Antirrhinum* ist. Die Verwandtschaft zu einem Reis-EST-Klon gab den Hinweis, daß es sich um eine Genfamilie handelt, die vermutlich in anderen -auch einkeimblättrigen- Pflanzen, vorhanden ist. Aus dem wichtigen Modellsystem *Arabidopsis* konnten zunächst weder Nucleinsäure- noch Proteinsequenzen gefunden werden, die zu den *SAP*-Genen Homologie zeigten.

Die Kenntnis über die *SAP*-Gene aus *Arabidopsis* war aus mehreren Gründen interessant:

Inzwischen war am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung eine mit dem *En*-Transposon aus Mais mutagenisierte *Arabidopsis*-Population verfügbar (Cardon et al., 1993; Wisman et al., 1998). Es bot sich deshalb eine zusätzliche Möglichkeit an, die Funktion, insbesondere von *SAP1* aus *Arabidopsis* anhand von reverser Genetik zu studieren.

*Arabidopsis* gehört zur Unterklasse der *Dilleniidae* und ist systematisch wie auch stammesgeschichtlich relativ weit von *Antirrhinum* (Unterklasse der *Asteridae*) entfernt. Aus diesem Grund müßte sich dann, von einem gemeinsamen Ursprung ausgehend, diese Genfamilie unabhängig voneinander weiter entwickelt haben. Die Isolierung von *SAP*-Genen aus *Arabidopsis* würde deshalb Aufschluß darüber geben, wie konserviert diese neue Genfamilie ist.



**Abbildung 3-9.** 'Clustal W'-Sequenzvergleich von SAP1 mit den abgeleiteten Proteinsequenzen der cDNAs, die bei einem unter stringenten Bedingungen durchgeführten 'full size-screening' einer *Antirrhinum* Gesamtpflanzen-cDNA-Bank neben anderen *SAP1*-cDNAs isoliert wurden. Die auffälligsten Unterschiede treten am N-Terminus in der Umgebung der AT-hook-DNA-Bindemotive auf. Die AT-hook-Motive sind unterstrichen.

### 3.5.2 Isolierung von mutmaßlichen *SAP1*-homologen Genen aus *Arabidopsis*

Zur Isolierung von *SAP1* aus *Arabidopsis* wurde ein heterologes Screening einer *Arabidopsis thaliana* Ler Infloreszenz-cDNA-Bank (Weigel et al., 1992), unter mittlerer Stringenz durchgeführt. Als Sonde diente die *SAP1*-cDNA.

Es wurden cDNA's der Größen 1,3 kb - 1,8 kb isoliert, die jedoch meistens am 5'-Ende verkürzte Versionen von zwei unterschiedlichen cDNAs waren. Es konnten zwei im

Hinblick auf ihre Leseraster vollständige cDNAs gefunden werden. Sie kodieren für Polypeptide der Länge von 351 bzw. 439 Aminosäuren (Abbildung 3-10, Seite 43 und Abbildung 3-11, Seite 44). Es wurde jeweils ein AT-hook in der Nähe des N-Terminus gefunden, der in seiner Sequenz sehr stark konserviert zu dem AT-hook aus den *Antirrhinum* SAP-Proteinen ist. Im Unterschied zu den SAP-Proteinen befindet sich weiter C-terminal ein zweites, jedoch weitaus weniger basisches AT-hook-Motiv. Die Gene wurden *AHP1* und *AHP2* (für *AT-Hook-Protein 1* und *2*) genannt und unter den Genbank-Zugangsnr. AJ222585 und AJ224119 publiziert.

Interessanterweise besitzt der N-Terminus der mutmaßlichen *AHP2*-Proteinsequenz eine Glutamin-reiche Domäne. Glutamin-Domänen sind charakteristisch für zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie z. B. dem Homeobox-Protein *ANTENNAPEDIA* aus *Drosophila*, (Schneuwly et al., 1986) und dem Glucocorticoidrezeptor aus der Ratte (Miesfeld et al., 1986). Aus dem Pflanzenreich ist lediglich das Tabak-DNA-Bindeprotein ATBP-1 beschrieben (Tjaden und Coruzzi, 1994). Glutamin-Domänen können sowohl in Säuger-Systemen (Gerber et al., 1994) als auch auch in pflanzlichen Systemen (Schwechheimer et al., 1998) *in vivo* transkriptionell aktivierend wirken.

*AHP1* kartiert auf Chromosom 2 und *AHP2* auf Chromosom 4. Die Analyse der mittlerweile in den Datenbanken verfügbaren genomischen Sequenz ergab, daß die Exon-Intron-Struktur von *AHP1*, *AHP2* (Intronpositionen von *AHP1/2* siehe Abbildungen 3-10 und 3-11) und einem weiteren verwandten *Arabidopsis*-Gen (BAC-Klon T12H17-160) konserviert ist (Vergleich nicht gezeigt).

Die Suche nach Insertionsmutanten von *AHP1* und *AHP2* in der oben erwähnten *En*-mutagenisierten Population blieb bislang erfolglos. Während der Anfertigung des schriftlichen Teils dieser Arbeit konnte jedoch in einer am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung erzeugten T-DNA-getaggten *Arabidopsis*-Population eine Pflanzenlinie mit T-DNA-Insertion im Locus von *AHP2* identifiziert werden (C. Koncz, persönliche Mitteilung). Die mutmaßliche Insertion befindet sich in dem für AS 369 kodierenden Bereich. Es ist soweit nichts darüber bekannt, ob die entsprechenden Pflanzen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp besitzen bzw. ob sie für die Insertion homozygot sind.

Es zeigte sich, das die über heterologes Screening isolierten *Arabidopsis*-Klone für deutlich größere Proteine kodieren, als die *Antirrhinum* *SAP1*-cDNA. *Arabidopsis* *AHP2* zum Beispiel enthält an seinem N-Terminus eine Glutamin-Domäne, die bei den *Antirrhinum* SAP-Proteinen fehlt. Es stellte sich die Frage, welche gemeinsamen konservierten Bereiche diese Proteine untereinander besitzen. Deshalb wurde mit dem Programm 'Clustal W' aus MacVector ein Vergleich der Proteinsequenzen von *Antirrhinum* *SAP1* - 3 mit *Arabidopsis* *AHP1/2* durchgeführt. In dieses Experiment mit

einbezogen wurde auch ein *Arabidopsis* Protein, das erst seit kurzem in der Datenbank ist (BAC-Klon Genbank Zugangsnr. T12H17-160 bzw. EST-Klon Genbank Zugangsnr. N37194) und interessanterweise wie die *Antirrhinum* SAP-Proteine lediglich einen AT-hook enthält, PD1 aus *Pisum sativum* (Genbank-Zugangsnr. X98738) und ein weiteres Protein aus *Arabidopsis*, SAH1. SAH1 ist auf Proteinebene 87 % ähnlich (85 % identisch) zu einer cDNA aus *Sinapis alba*, die im Rahmen eines differentiellen Screenings isoliert wurde (Sequenzen von Herrn Dr. F. Cremer zur Verfügung gestellt; Cremer et al., nicht veröffentlichte Daten). Die *Sinapis*-Proteinsequenz wurde aufgrund ihrer hohen Identität zu SAH1 in den Vergleich nicht mit einbezogen. In Abbildung 3-12 ist deutlich zu erkennen, daß abgesehen von der Homologie innerhalb der AT-hook-DNA-Bindemotive in allen hier verglichenen Sequenzen eine konservierte Domäne von etwa 130 AS Länge (58% - 92 % Ähnlichkeit) vorhanden ist.

**Abbildung 3-10 (Seite 43).** *Arabidopsis AHP1*-cDNA-Sequenz mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. AT-hook-DNA-Bindemotive sind unterstrichen, mutmaßliche Kernlokalisationsignale mit Kreuzen und Intronpositionen sind mit schwarzen Pfeilköpfen versehen. Die von *Arabidopsis* ssp. *Ler* abweichenden Sequenzen der *Arabidopsis* ssp. *Col* sind über der Nucleotidsequenz bzw. unterhalb der Proteinsequenz dargestellt.

**Abbildung 3-11 (Seite 44).** *Arabidopsis AHP2*-cDNA-Sequenz mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Glutamin-reiche Domänen am N-Terminus ist doppelt unterstrichen. Sonstige Markierungen wie zu Abbildung 3-10.

1	TAGATCTAA <sup>.</sup> AAAAATCCACA <sup>.</sup> ATTTTGTTC <sup>.</sup> AAATCTTGGAG <sup>.</sup> TAAATGCTGA <sup>.</sup> ATTTTAGGC <sup>.</sup> CTTGTGCTTAGATTTATGG	80
81	CTTAAAGTTTCAA <sup>.</sup> ACTTTTCATTGGATATGGTACA <sup>.</sup> AACTCTTGTAGTAA <sup>.</sup> AACTGAATTGTGTCCCTCGTGGGCGTTGTT	160
161	GCTTTGATTTATGGCCAAA <sup>.</sup> AGTTTCAA <sup>.</sup> ACTTGGATATGGTACA <sup>.</sup> ATCTTGTAGTTATACACTGCATTGTCTCTCTGGGTG	240
241	TTGTTGTTGCTTTGATTTATGGCTTAA <sup>.</sup> AGTTTCAA <sup>.</sup> ACTTTTCTTGGAGATGGTTCA <sup>.</sup> ATCTTGTGTGAAAGTTGAAAC	320
321	ACTGAATTGTCTCTCTGTGCGTGTGTTGCTT <sup>.</sup> AGATTTATGGCTAAA <sup>.</sup> AGTTTCAA <sup>.</sup> ACTTCTTCTCATTCCAGAGCTTCTT	400
401	GAATGGAAACTATGGTTTTGTGGTTTTGGTTA <sup>.</sup> ATCTTCTGCTAACACTTTTTC <sup>.</sup> CCCTGTTTTGGTTTGGGAAAGTGAGAA	480
481	GAAATGTCAGGATCTGAGACGGGTTA <sup>.</sup> ATGGCGGCGACCAGAGA <sup>.</sup> ATCAATGCAATTTACA <sup>.</sup> ATGGCTCTCCACCAGCAGC	560
1	M S G S E T G L M A A T R E S M Q F T M A L H Q Q Q	26
561	AGCAACACAGTCAAGCTCA <sup>.</sup> ACTCAGCAGTCTCAGA <sup>.</sup> ACAGGCCATTGTCA <sup>.</sup> TTCGGTGGAGACGACGGA <sup>.</sup> ACTGCTCTTTAC	640
27	Q H S Q A Q P Q Q S Q N R P L S F G G D D G T A L Y	52
641	AAGCAGCCGATGAGATCAGTATCACCAC <sup>.</sup> CGCAGCAGTACCA <sup>.</sup> ACCCAACTCAGCTGGTGA <sup>.</sup> GAATCTGTCTTGAACATGAA	720
53	K Q P M R S V S P P Q Q Y Q P N S A G E N S V L N M N	79
721	CTTGCCCGGAGGTGAGTCTGGAGGCATG <sup>.</sup> ACTGGA <sup>.</sup> ACTGGAAGTGAGCCAGTGAAAA <sup>.</sup> AGAGGAGGTAGACCAGGAAAT	800
80	L P G G E S G G M T G T G S E P V <u>K K R R G R P R K Y</u>	106
	x x x x x x x x	
801	ATGGCCTGATAGTGGTGA <sup>.</sup> ATGTCACTTGGTTGA <sup>.</sup> ATCCTGGAGCTCCTTCTTTC <sup>.</sup> ACTGTCCAGCCA <sup>.</sup> ACTAGTAGCGGC	880
107	G P D S G E M S L G L N P G A P S F T V S Q P S S G	132
881	GGCGATGGAGGAGAGA <sup>.</sup> AAGAGAGGAAGACCTCCTGTTCTTCTAGCAA <sup>.</sup> AGGCTCAAGCTTGA <sup>.</sup> AGCTTTAGGCTCGAC	960
133	G D G G <u>E K K R G R P P G</u> S S S K R L K L <u>E A L G S T</u>	159
	C Q	
961	TGGAATCGGATTTACGCCTCATGTACTT <sup>.</sup> ACCGTGTGGCTGGAGAGGATGTTTCATCCA <sup>.</sup> AGATAATGGCGTTAACTCATA	1040
160	G I G F T P H V L T V L A G E D V S S K I M A L T H N	186
1041	ATGGACCCCGTCTGTGTGTCTTGTCTGCA <sup>.</sup> ATGGAGCCATCTCCA <sup>.</sup> ATGTGACTCTCCGCCAGTCTGCCACATCCGGT	1120
187	G P R A V C V L S A N G A I S N V T L R Q S A T S G	212
1121	GGA <sup>.</sup> ACTGTTACATATGAGGGGAGATTTGAG <sup>.</sup> ATTCTGTCTTTATCGGGATCTTTC <sup>.</sup> CAATTTGCTGGAGA <sup>.</sup> ACAATGGTCAAAG	1200
213	G T V T Y E G R F E I L S L S G S F H L L E N N G Q R	239
1201	AAGCAGGACGGGAGGTCTA <sup>.</sup> AGCGTGTCA <sup>.</sup> TATCAAGTCCGGATGGTA <sup>.</sup> ATGTCTCGGTGGCAGTGTAGCTGGTCTTCTTA	1280
240	S R T G G L S V S L S S P D G N V L G G S V A G L L I	266
1281	TAGCAGCATCACCTGTTCAG <sup>.</sup> ATTGTTGGGAGTTTCTTACCAGACGGAGAAA <sup>.</sup> AGAACCAAAACAGCATGTGGGACAA	1360
267	A A S P V Q I V V G S F L P D G E K E P K Q H V G Q	292
1361	ATGGGACTGTCGTACCCGTATTACCGCTG <sup>.</sup> TGGCCCCAACGCAGGTGCTGATGACTCCA <sup>.</sup> AGTAGCCCA <sup>.</sup> CAATCTCGAGG	1440
293	M G L S S P V L P R V A P T Q V L M T P S S P Q S R G	319
1441	CACAATGAGTGAGTCA <sup>.</sup> TCTTGTGGAGGAGACATGGA <sup>.</sup> AGCCCTATTATCAGAGCACTGGAGGACCTTACA <sup>.</sup> ATAACACCA	1520
320	T M S E S S C G G G H G S P I H Q S T G G P Y N N T I	346
1521	TTAACATGCCCTGGAAGTAGCCAAGTGA <sup>.</sup> TCTGTGTCGGCTTAA <sup>.</sup> ACCAACA <sup>.</sup> ACTTCCCCTTATTAGAGTGATTTATTCT	1600
347	N M P W K *	352
1601	ACATTTGGTTTAGACTTTCTAGTTCTGATGG <sup>.</sup> TATTTCTACAGTTGGTTTAGACTTTCTAGTTCTGTTCCAGACAAAAGGA	1680
1681	GTTTGATAAAATTGACCGACCTATTTTGTG <sup>.</sup> TGTTGAGGTACTTTCAGA <sup>.</sup> ACCATAGGTGTTCCAGAAATTAGAATGTTCTGT	1760
1761	TTAAGGTAGATCTTTTATTTATGTTGAGG <sup>.</sup> TACTTTCCGGA <sup>.</sup> ACCATAAGTTGTTCCAGAAATTGGAATATCCTGATTAATGT	1840
1841	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1867

**Abbildung 3-10.** *Arabidopsis AHP1* cDNA Sequenz mit abgeleiteter Proteinsequenz. Legende siehe Seite 42 unten.



Um einen Hinweis auf die mögliche Funktion dieser Domäne zu erhalten, wurde dieser Bereich von allen in Abbildung 3-12 dargestellten Proteinsequenzen näher untersucht. Es konnten keine bekannten Proteinmotive in den Datenbanken gefunden werden.

Weder bei Verwendung des Programms 'protein toolbox' aus MacVector (nicht gezeigt), noch mit anderen Programmen konnten hinreichend abgesicherte Voraussagen hinsichtlich der Sekundärstruktur dieser Domäne gemacht werden (F. Abdallah, persönliche Mitteilung).

Ein vergleichender Hydropathieplot (durchgeführt mit MacVektor, Abbildung 3-13) zeigt, daß das sich ergebende Muster bei allen hier untersuchten Proteinsequenzen sehr ähnlich ist, hydrophile und hydrophobe Bereiche sind abwechselnd arrangiert. *Antirrhinum* SAP2 und SAP3 wurden in diesem Vergleich nicht berücksichtigt, weil sie in diesem Bereich zu SAP1 mehr als 92 % ähnlich sind und deshalb ein nahezu identisches Hydropathieprofil besitzen.

**Legende zu Abbildung 3-12, Seite 46.** 'Clustal W'-Vergleich der *Antirrhinum* SAP-Sequenzen mit den *Arabidopsis* AHP-Sequenzen. Mit in den Vergleich einbezogen wurde auch ein *Arabidopsis*-Protein aus der Datenbank (BAC-Klon Genbank Zugangsnr. T12H17-160 bzw. EST-Klon Genbank Zugangsnr. N37194) und das mutmaßlich orthologe Gen aus *Arabidopsis* einer im Rahmen eines differentiellen Screenings isolierten cDNA aus *Sinapis* (Cremer et al., unveröffentlichte Daten). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt. Es ist auffallend, das es neben ein bzw. zwei AT-hooks (unterstrichene Konsensussequenz) in der Nähe des C-terminus einen konservierten Bereich von 130 -140 AS Länge gibt .

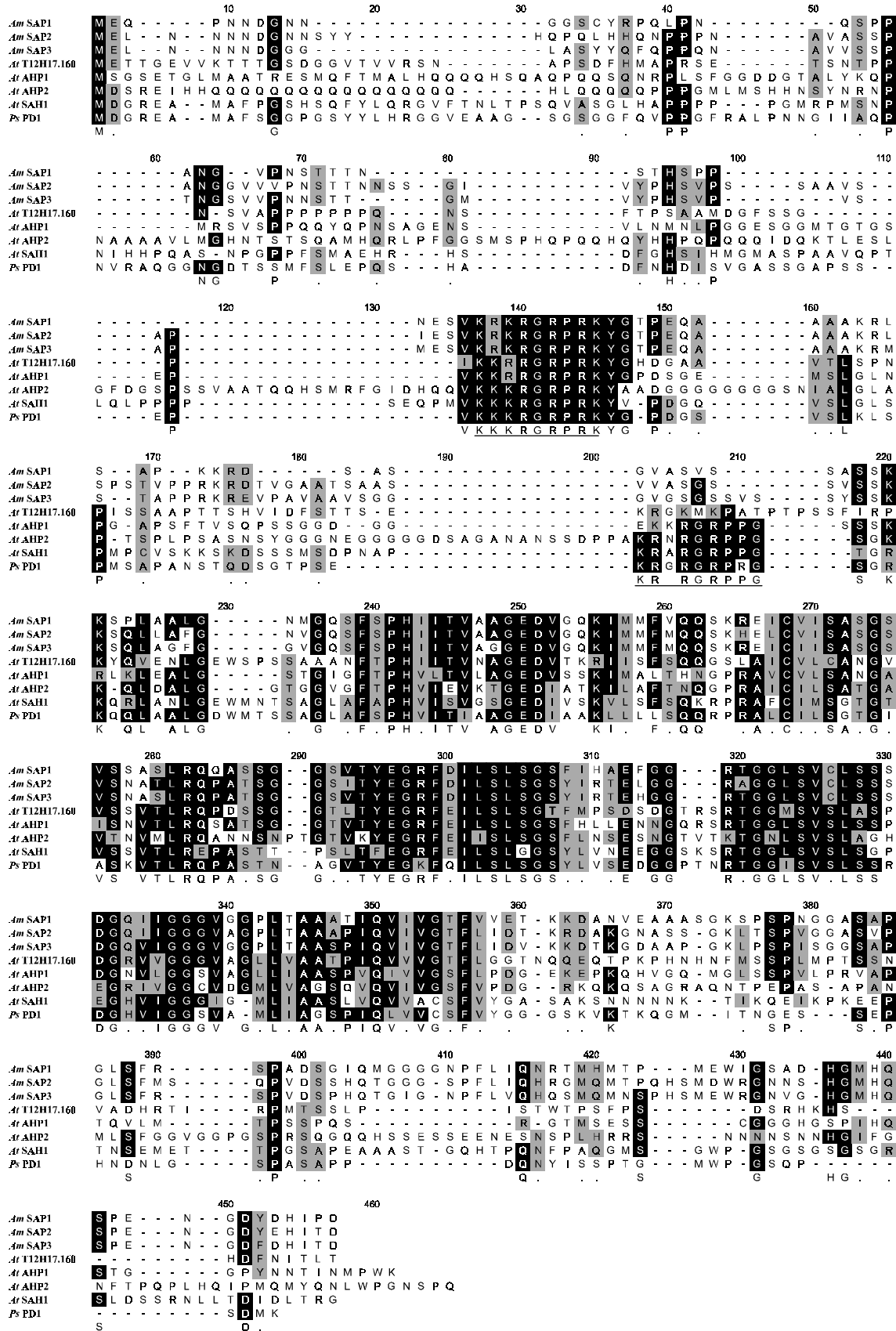
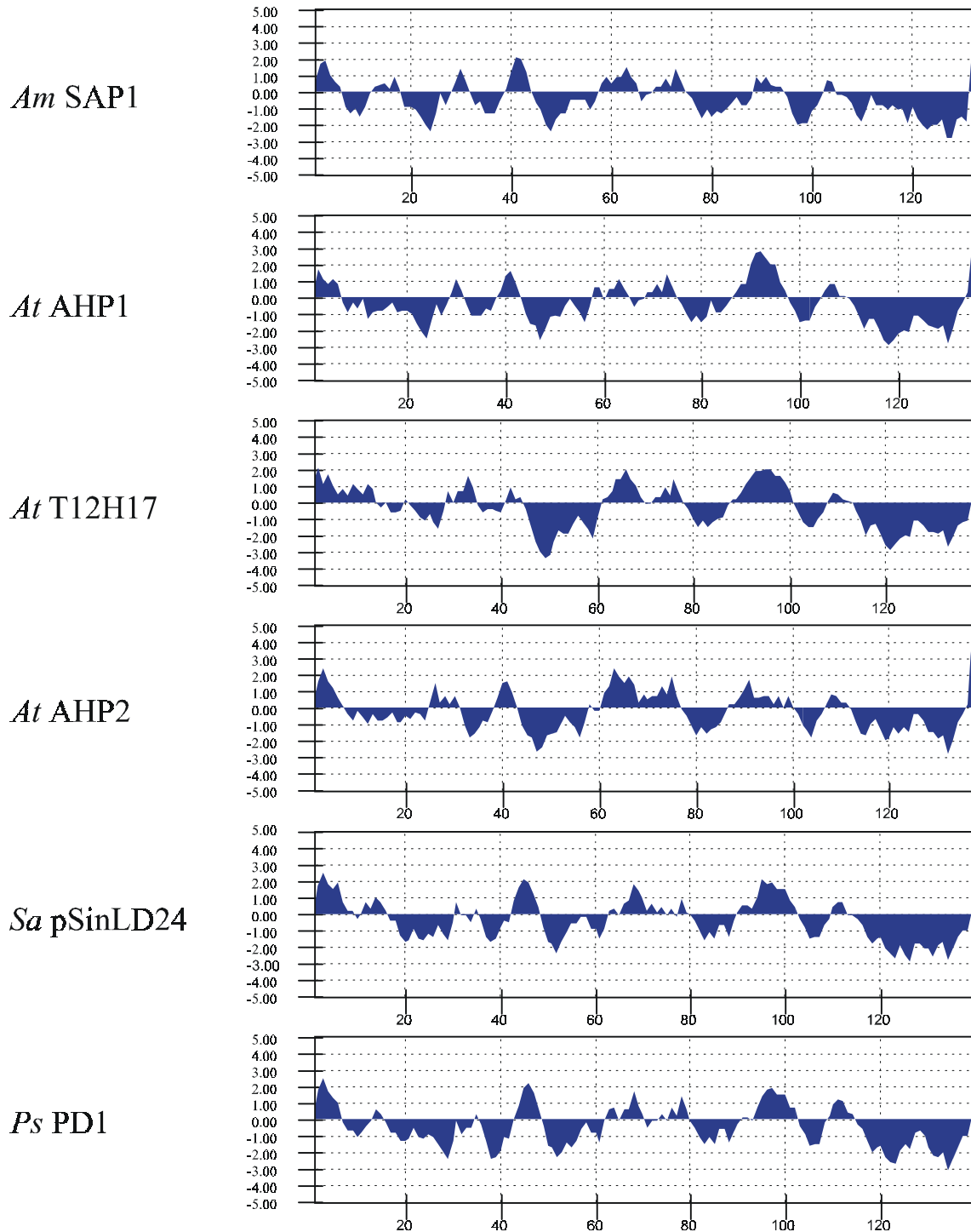


Abbildung 3-12. 'Clustal W'-Vergleich der *Antirrhinum* SAP-Sequenzen mit den *Arabidopsis* AHP-Sequenzen. Legende siehe Seite 45 unten.





**Abbildung 3-13.** Hydropathieplot eines Bereiches der Länge von 135 - 140 Aminosäuren in *Antirrhinum* SAP, *Arabidopsis* AHP1/2 bzw. AHP-Verwandten, *Sinapis* pSinLD24 (Cremer et al., unveröffentlicht) und *Pisum* PD1 (Genbank Zugangsnr. X98738). Die X-Achse gibt die Positionen in der Proteinsequenz wieder. An der Y-Achse sind die Hydrophilizitätswerte nach Doolittle angegeben, hydrophobe Bereiche haben negative, hydrophile Bereiche positive Werte. Auffallend ist, daß sich hydrophile und hydrophobe Bereiche in relativ kurzen Abständen abwechseln und daß die sich ergebenden Muster der verglichenen Domänen untereinander sehr ähnlich sehen.

### 3.6 Die Expression von *HMRI* und *SAPI* in *Antirrhinum*

Die für die Isolierung von *HMRI* und *SAPI* verwendete cDNA-Expressionsbank repräsentiert die mRNA-Population aus Infloreszenzen (Klein et al., 1996). Demnach sollten sowohl *HMRI* als auch *SAPI* auch *in vivo* in den Infloreszenzen exprimiert sein. Ungeklärt war dennoch, ob *HMRI* und *SAPI* spezifisch in den Infloreszenzen exprimiert werden, oder ob deren Expression auch in anderen Geweben von *Antirrhinum*-Pflanzen stattfindet. Außerdem sollte festgestellt werden, wie *SAPI* und *HMRI* zeitlich, d. h. während der Sporophytenentwicklung exprimiert wird.

#### 3.6.1 Northern blot-Analysen von *HMRI* und *SAPI*

Zur Expressionsanalyse von *HMRI* und *SAPI* wurden verschiedene Northern blot-Filter hybridisiert.

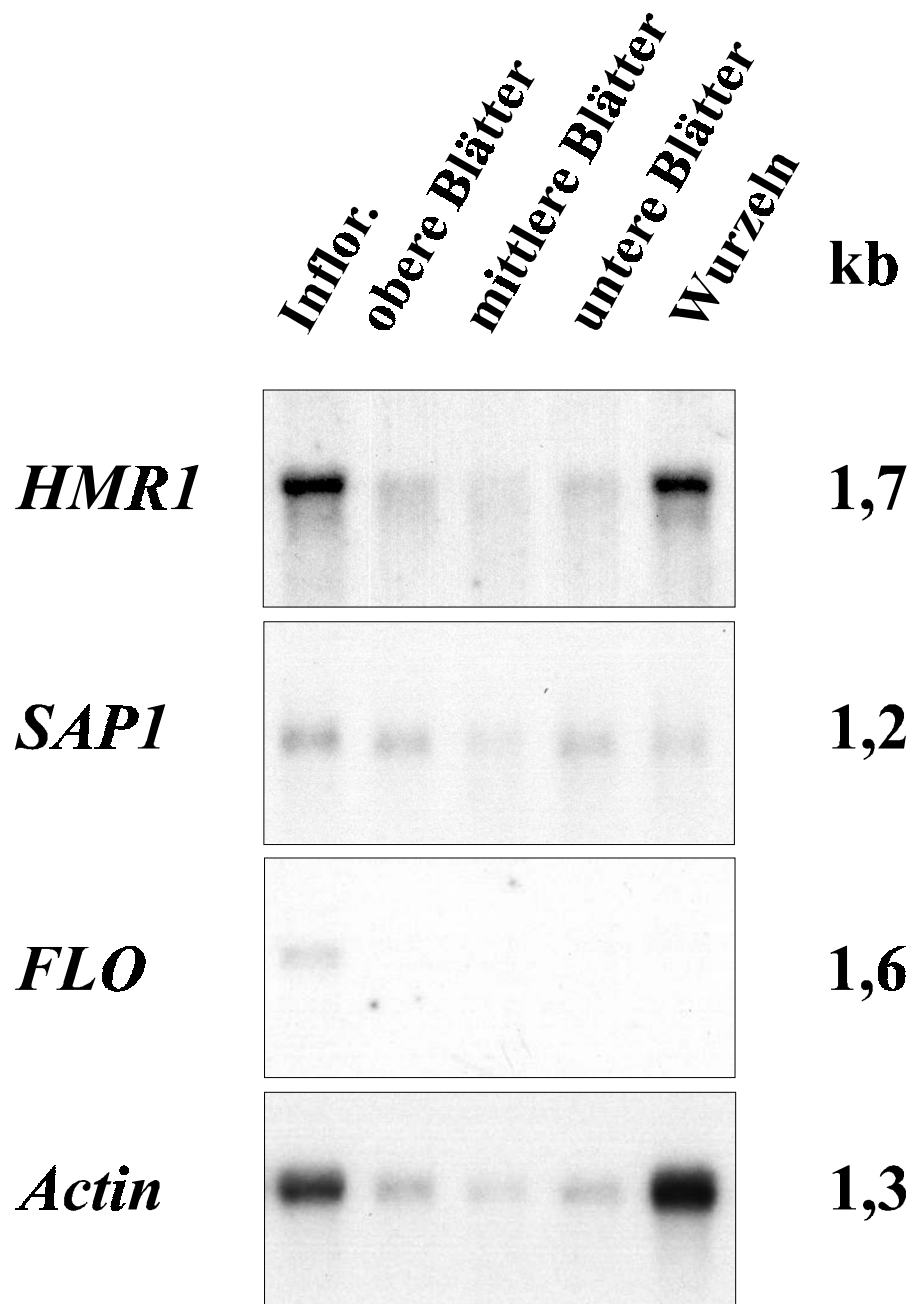
Um einen Hinweis zu erhalten, wo in der Pflanze *HMRI* und *SAPI* exprimiert wird, wurde poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus verschiedenen Bereichen der Pflanze (Infloreszenzen, Blätter und Wurzeln) von *Antirrhinum* Wildtyp-Pflanzen isoliert. Die entsprechenden Northern blot-Filter (von Herrn Dr. P. Huijser zur Verfügung gestellt) wurden mit dem 3'-Ende der *HMRI*-cDNA hybridisiert (ab Nucleotid 800 in Abbildung 3-3, Seite 32). Dadurch, daß unter anderem der für die Histon-Domäne kodierende Bereich entfernt wurde, konnten Kreuzhybridisierungen mit mRNAs anderer *HMG-Y*-ähnlichen Faktoren oder *Histon HI*-mRNAs ausgeschlossen werden. Es zeigte sich nämlich, daß der übrige Teil der cDNA, der für die 'AT-hooks' kodiert, auf Nucleinsäure-Ebene zu anderen *HMG-Y* ähnlichen Faktoren kaum konserviert ist und deshalb genspezifisch ist.

Von *SAPI* wurde sowohl die komplette cDNA als auch das genspezifische 5'-Ende (Nucleotide 1-170 in Abbildung 3-8, Seite 38) hybridisiert. Die Ergebnisse beider Experimente waren gleich.

Zum Nachweis der Expression des mutmaßlichen Zielgens *FLORICAULA* wurde ein genspezifisches PCR-Produkt hybridisiert, das dem kodierendem Bereich des letzten Exons von *FLO* entspricht (Coen et al., 1990).

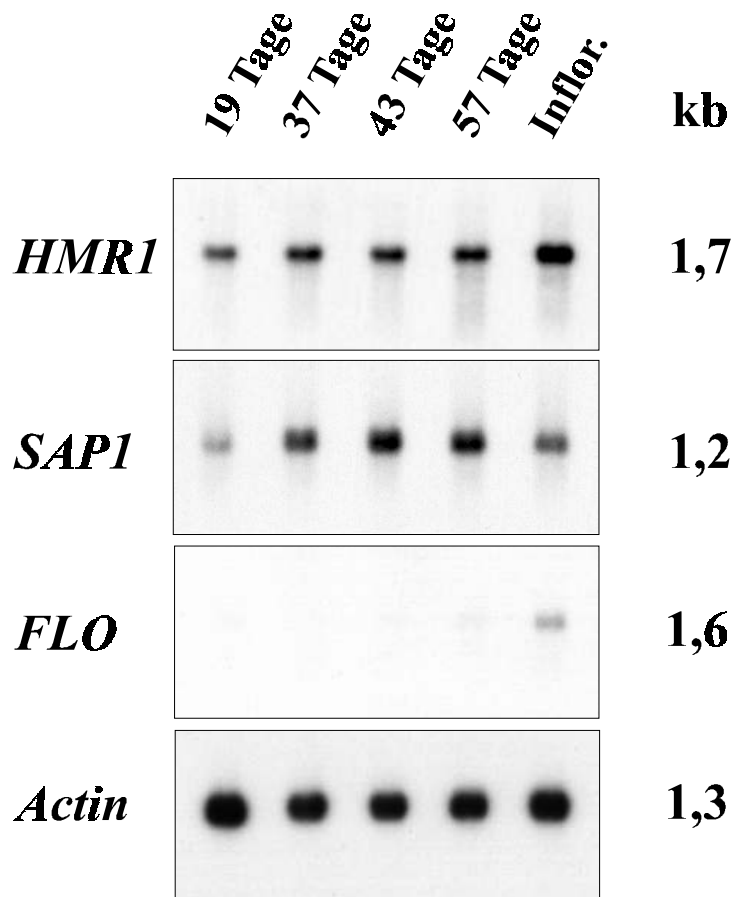
Als Kontrollsonde diente ein PCR-Produkt, das spezifisch für das *Actin*-Gen aus *Antirrhinum* ist (Meijer, 1996).

Die Ergebnisse der Northern blot-Hybridisierungen von *HMRI* und *SAPI* sind in Abbildung 3-14 dargestellt. Während *HMRI* sowohl sehr stark in Infloreszenzen als auch fast ebenso stark in den Wurzeln exprimiert wird, ist die Expression in den Blättern deutlich schwächer. *SAPI* hingegen ist relativ schwach in Infloreszenzgewebe, jedoch noch schwächer in Blättern und Wurzeln exprimiert.



**Abbildung 3-14.** Autoradiographische Darstellung der Northern blot-Analyse verschiedener Bereiche von *Antirrhinum*-Wildtyp-Pflanzen. Es wurden jeweils 3 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA geladen. Links ist die hybridisierte Sonde, rechts die Größe der hybridierenden Bande angegeben.

Zur Untersuchung der zeitlichen Expression von *HMR1* und *SAP1* wurde poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus den oberirdischen Teilen von *Antirrhinum* Wildtyp-Pflanzen (Sippe 50) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat und aus Infloreszenz-Knospen eines Durchmessers um 5 mm isoliert und mittels Northern blot analysiert (Filter von Herrn Dr. J. Klein zur Verfügung gestellt). Wie aus Abbildung 3-15 ersichtlich, ist *HMR1* auch schon in früheren Stadien der Sporophytenentwicklung stark exprimiert, wobei sich im Laufe der Entwicklung die Expression leicht erhöht. Die relativ höchste Expression ist offenbar in den Infloreszenzen erreicht. Im Vergleich zu *HMR1* wird *SAP1* in den frühen Stadien deutlich geringer exprimiert, während der weiteren Entwicklung stärker induziert. In den Infloreszenzen ist die Expression wieder niedriger.



**Abbildung 3-15.** Autoradiographische Darstellung der Northern blot-Analyse von oberirdischen Teilen von *Antirrhinum* Wildtyp (Sippe 50) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat. Es wurden jeweils 3 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA geladen. Links ist die jeweils hybridisierte Sonde angegeben, rechts die Größe der hybridisierenden Bande.

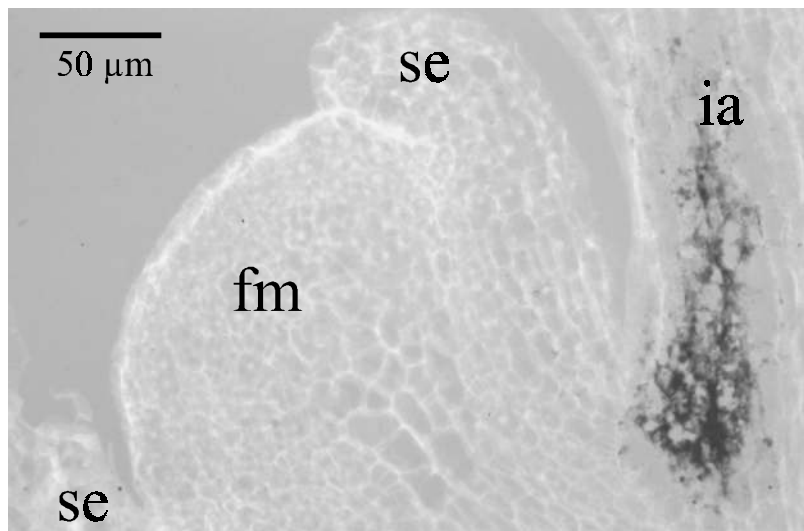
### 3.6.2 *In situ*-Hybridisierung von *HMRI*

Nach den vorliegenden Daten werden sowohl *HMRI* als auch *SAPI* in den Infloreszenzen von *Antirrhinum* Wildtyp-Pflanzen exprimiert. Demnach stellten beide Gene Kandidaten für Regulatorgene von *FLORICAULA* dar.

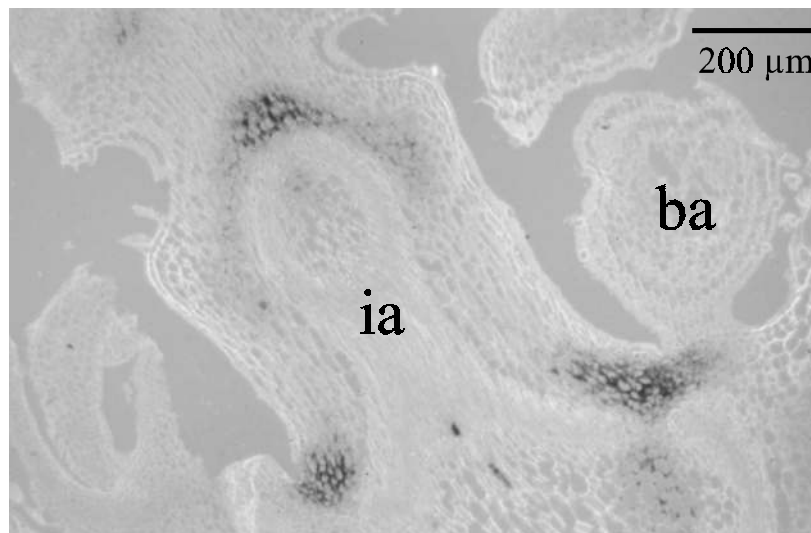
Die Expression von *FLO* ist lediglich in bestimmten Bereichen der Infloreszenz detektierbar, nämlich in den Brakteen und in den floralen Meristemen (Coen et al., 1990). Die mit *SAPI* und *HMRI* durchgeführten Northern blot-Analysen, die einen groben Überblick über die Expression geben sollten, waren jedoch zur genauen Bestimmung der räumlichen Expression nicht geeignet. Aus diesem Grund sollten *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt werden. Es wurden Gewebeschnitte durch Infloreszenzen von *Antirrhinum* Wildtyp-Pflanzen der Linie 'Snowman' hergestellt, die mit genspezifischen Sonden in *sense* und *antisense* Orientierung von *HMRI* bzw. *SAPI* hybridisiert wurden (Sonden aus dem gleichen Bereich wie für die Northern blot-Hybridisierung, siehe 3.6.1). Die Daten für die *in situ*-Hybridisierung von *SAPI* sind zum derzeitigen Zeitpunkt nicht ausreichend abgesichert und werden deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt.

Hinsichtlich der Expression von *HMRI* innerhalb der Infloreszenzen ergab sich ein überraschendes Bild. *HMRI* erreicht eine besonders hohe Expression im Bereich der Internodien, nahe der floralen Meristeme (Abbildung 3-16A). In späteren Entwicklungsstadien, zu dem Zeitpunkt, wenn sich die Blütenstielchen entwickeln, scheint sich die Expression in Richtung Basis der Blütenstielanlagen zu verschieben (Abbildung 3-16B). Es gibt scheinbar keine Übereinstimmung der Expression von *HMRI* mit der Expression des mutmaßlichen Zielgens *FLO*.

**A**



**B**



**Abbildung 3-16.** *In situ*-Hybridisierung von *HMR1*

A: Florales Meristem mit Hauptachse. *HMR1* scheint innerhalb der Hauptachse, nahe des floralen Primordiums exprimiert zu sein (dunkle Farbe).

B: *HMR1*-Expression in einem späteren Entwicklungsstadium der Infloreszenz, außerhalb der medianen Schnittebene.

### 3.7 Proteinexpression von HMR1 und SAP1 in *E. coli*

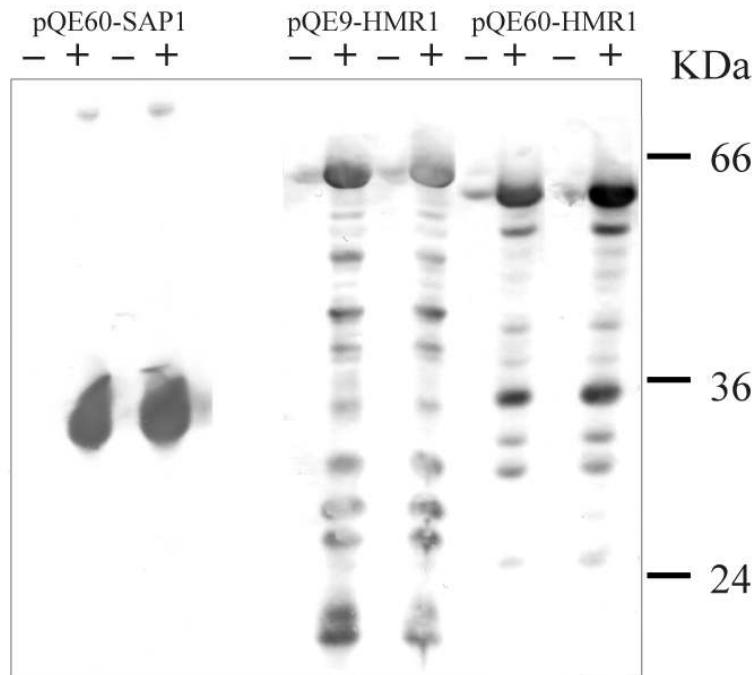
Nach dem South-western-Experiment mit der *FLO*-Promotorregion-Sonde (-213/-94) (3.3, Seite 29) waren hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften der HMR1- und SAP1-Proteine folgende Fragen zu klären:

1. Können HMR1 und SAP1 auch im nativem Zustand an die *FLO*-Promotorregion-Sonde binden? Es konnten lediglich Signale auf den Filtern detektiert werden, die mit Guanidiniumhydrochlorid behandelt wurden. Demnach zeigten offensichtlich nur HMR1- und SAP1-Proteine, die denaturiert und rückgefaltet wurden, Bindeaktivität. Auf den Filtern, die unbehandelt blieben, konnte keine Interaktion mit der *FLO*-Promotorregion-Sonde nachgewiesen werden.
2. Warum binden HMR1 und SAP1 gleich stark an das *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94)? HMR1 und SAP1 zeigten vergleichbare Bindeaktivität, obwohl SAP1 nur ein 'AT-hook' DNA-Bindemotiv enthält, während HMR1 davon sieben Kopien besitzt. Eine bessere Quantifizierung der Bindestärken und eine Untersuchung der biochemischen Verhalten von HMR1 und SAP1 ließe sich mit EMSA durchführen.

Um hierfür Protein verfügbar zu machen, wurde das bakterielle Expressionssystem von Qiagen (Hilden), Qiaexpress verwendet. Dieses System erlaubt eine Überexpression von Protein in *E. coli* und -durch die Fusion der Proteine mit einem sogenannten 'His-Tag'-eine Aufreinigung über Säulen mit Nickel-Agarose-Matrizes. *HMR1* und *SAP1* wurden in den Vektor pQE60 kloniert (Bujard et al., 1987, Stüber et al., 1990) Das Start-ATG von *HMR1* bzw. *SAP1* wurde mit dem internen Start-ATG des Vektors fusioniert. Außerdem waren die resultierenden Proteine an ihrem C-Terminus mit dem 'His-Tag' fusioniert, was die Trennung von Proteinen, die die volle Länge besitzen von etwaigen Abbruchprodukten ermöglichte. Zur Kontrolle der Qualität und Menge der Proteinexpression wurden vor und vier Stunden nach der Induktion mit IPTG Zell-Extrakte hergestellt und mit Hilfe von Western blot-Experimenten unter Verwendung des anti-penta-His-Antikörpers (Qiagen) analysiert. Während SAP1 in hohem Maße induziert wurde und dies auch als distinkte Proteinbande erkennbar war, erwies sich die Expression von HMR1 als sehr problematisch. Zwar wurde HMR1 auch deutlich induziert, wurde allerdings, vermutlich von bakteriellen Proteasen, zu zahlreichen kleineren Fragmenten abgebaut (Abbildung 3-17). Dieses Phänomen wurde in beiden vom Hersteller empfohlenen Bakterienstämmen (M15 bzw. SG13009) beobachtet. Auch die Expression mit einem anderen Expressionsvektor, pQE9 (N-terminales His-Tag) oder kürzere Induktionszeiten brachten keine Abhilfe dieses Problems. Da es sich bei den im Western blot detektierten Banden um His-'getaggtetes' Protein handelte, war auch keine Trennung von eventuell vollständigen Proteinen von den Abbauprodukten möglich.

Aufgrund der hier geschilderten Probleme konnten mit HMR1 vorerst keine weiteren biochemischen Untersuchungen durchgeführt werden.

Nachdem sich zeigte, daß die Ausbeute und Qualität des SAP1-Proteins sehr gut waren, wurde es nach Herstellerangaben unter nativen Bedingungen über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt.



**Abbildung 3-17.** Western blots von SAP1 und HMR1-Überexpression. Bakterielle Extrakte, - = vor der Induktion, + = 4 Stunden nach der Induktion. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper, der das His-Tag der überexprimierten Proteine erkennt. Während SAP1 als eine distinkte Bande zu erkennen ist, wurde HMR1, unabhängig davon, ob es in pQE9 (N-terminales His-Tag) oder pQE60 (C-terminales His-Tag) exprimiert wird abgebaut. Dieser Effekt trat bei beiden verwendeten Bakterienstämmen (M15 und SG13009) auf.



### 3.8 Bindestudien mit SAP1

#### 3.8.1 SAP1 bindet im nativen Zustand und mit sehr hoher Affinität an das *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94)

Für einen ersten Test der Bindeaktivität wurde einmal der nach Aufreinigung erhaltene native Proteinextrakt direkt verwendet. Als Kontrollen diente der gleiche Proteinextrakt, der gegen den im South-western-screening verwendeten Guanidinium-Waschpuffer dialysiert und wieder gegen Waschpuffer ohne Guanidinium zurückdialysiert wurde. Dies sollte die Behandlung der South-Western-Filter nachahmen. Als Pufferkontrolle diente nativer Proteinextrakt, der direkt gegen den South-western-Waschpuffer dialysiert wurde. Eine weitere Kontrolle, daß die etwaige Bindeaktivität wirklich von dem SAP1-Protein herrührte und nicht möglicherweise von anderen induzierten Proteinen, wurden gleiche Proteinextrakte wie zuvor hergestellt, allerdings von induzierten Zellen, die pQE60 ohne Insert enthielten. Das Ergebnis des EMSA, durchgeführt mit der dem *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94) ist in Abbildung 3-18 dargestellt. Es wurde pro Ansatz jeweils 1 µg geschnittene Plasmid-DNA (pUC19 mit *Hae*III geschnitten) als Kompetitor zugesetzt, was einem 600 fachen Überschuß entsprach und 0,08 µg/µl SAP1-Protein geladen.



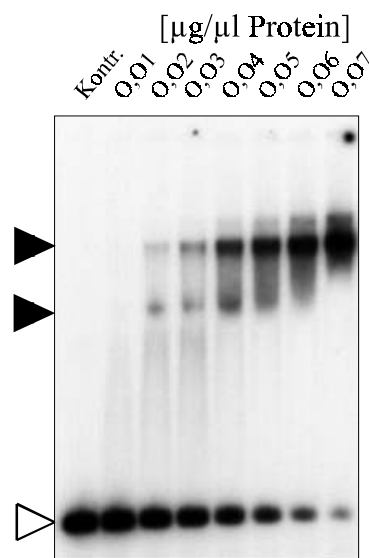
**Abbildung 3-18.** Autoradiogramm des EMSA mit SAP1-Protein und dem *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94). Reaktionen mit N = nativem Protein, mit D = mit Protein gegen Guanidiniumhydrochloridpuffer und South-western-Waschpuffer dialysiert und mit B = nativem Protein, gegen South-western-Waschpuffer dialysiert. C = freie Probe ohne Extrakt, pQE60 = Spuren mit Vektorkontrolle, pQE60-SAP1 = SAP1-Protein, 0,08 µg/µl. Das *FLO*-Promotorregion-Fragment wird vollständig von SAP1 gebunden.

Dieses Experiment zeigt, daß SAP1 quantitativ mit dem *FLO* Promotorregion-Fragment interagiert, sodaß die Radioaktivität vollständig im Komplex gebunden wurde. Diese

hohe Bindeaktivität trat sowohl mit den nativen Proteinen, als auch mit den dialysierten Kontrollen auf. Da in der Vektorkontrolle keinerlei Interaktionen detektierbar waren, war bewiesen, daß die beobachtete DNA-Protein-Interaktion wirklich von SAP1-Protein herrührte. Bei allen weiteren Arbeiten konnte deshalb direkt aufgereinigtes, natives Protein verwendet werden. In weiteren Versuchen wurde neben der in 3.8.1 erwähnten Plasmid-DNA außerdem noch als Kompetitor Heringsperma-DNA verwendet, das das Bindeverhalten von SAP1 kaum veränderte (Abbildung 3-20).

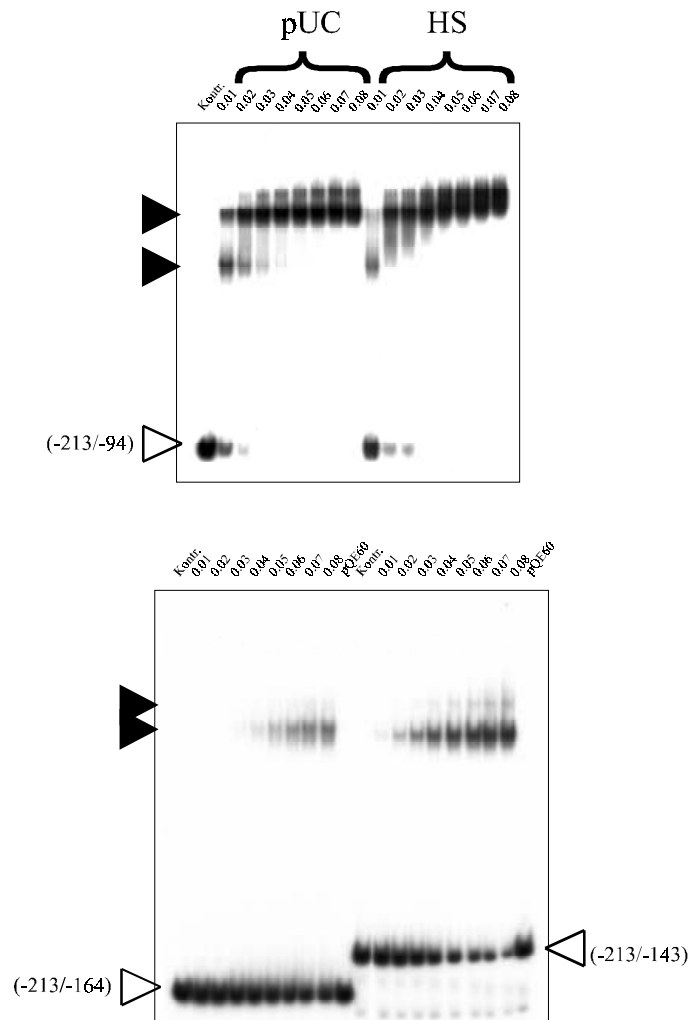
### 3.8.2 SAP1 bindet scheinbar kooperativ an das *FLO*-Promotorregion-Fragment (-94/-213)

In dem in Abbildung 3-18 dargestelltem Experiment wurde eine ungewöhnlich hohe Bindeaktivität beobachtet. Offenbar war SAP1-Protein im Überschuß vorhanden, sodaß die gesamte DNA-Probe gebunden wurde. Um das Bindeverhalten bei geringeren SAP1-Konzentrationen zu überprüfen, wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt, bei dem, ausgehend von 0,01 µg/µl Protein in 0,01 µg/µl-Schritten die Protein-Konzentration erhöht wurde. Es wurde pro Ansatz jeweils 1200-facher Überschuß an Heringsperma-DNA als unspezifischer Kompetitor zugesetzt. Das Autoradiogramm dieses Experimentes ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Es fällt auf, das die Bindeaffinität ab einer gewissen Proteinkonzentration (0,04 µg/µl) sprunghaft ansteigt. Die Bindung ist anscheinend kooperativ.



**Abbildung 3-19.** Titrationsexperiment mit SAP1 mit dem *FLO*-Promotoregionfragment (-213/-94). Kontr. = DNA ohne Proteinextrakt. Der weiße Pfeilkopf markiert die freie DNA, die schwarzen Pfeile die gebildeten Komplexe.

Um herauszufinden, ob SAP1 mehrere Bindestellen auf dem *FLO*-Promotorregion-Fragment besitzt wurden noch Titrationsexperimente mit Subfragmenten dieses Bereiches, (-213/-143) und (213/-164) durchgeführt. Es zeigte sich, daß alle drei Fragmente banden, die Affinität jedoch mit der Fragmentgröße korrelierte (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20.** EMSA: Titrationsexperiment von SAP1 mit dem *FLO*-Promotoregion-Fragment (-213/-94) im Vergleich zu zwei Subfragmenten, (-213/-143) und (-213/-164). Die freien DNAs sind mit weißen Pfeilköpfen, die gebildeten DNA/Protein-Komplexe mit schwarzen Pfeilköpfen markiert. Kontr. = DNA ohne Protein, pQE60 = Vektorkontrolle. Die Zahlen geben die Proteinkonzentration in µg/µl an. Alle Experimente wurden mit unспеzifischen Kompetitor in 600-fachem Überschuß durchgeführt. Die Bindeaffinität bleibt, unabhängig von dem verwendeten unспеzifischen Kompetitor (pUC-Plasmid-DNA, *Hae*III geschnitten oder Heringsperma-DNA) nahezu unbeeinflusst. Die Experimente mit den Subfragmenten wurden mit Heringsperma-DNA durchgeführt. Fragmentlänge und Bindeaffinität korrelieren.

### 3.9 Herstellung von transgenen Pflanzen, die *HMRI* und *SAPI* konstitutiv exprimieren

*HMRI* ist, wie schon unter 3.4.1 ausführlicher beschrieben, Mitglied einer bekannten Genfamilie, der *HMG-Y*-verwandten DNA-Bindeproteine. Die pflanzlichen Faktoren dieses Typs wurden meist *in vitro* über South-western-screening isoliert, indem man ein *in vivo* definiertes *cis*-aktives Element als Sonde verwendete (Laux et al., 1991; Nieto-Sotelo et al., 1994; Tjaden und Coruzzi, 1994; Meijer et al., 1996). Dennoch konnte bislang in keinem Fall die Funktion dieser DNA-Bindeproteine *in vivo* gezeigt werden.

Auch *HMRI* wurde *in vitro* isoliert. Die mittels *in situ*-Hybridisierung ermittelten Daten zur räumlichen mRNA-Expression von *HMRI* passen anscheinend nicht zur Expression, die man für einen potentiellen Regulator von *FLORICAULA* erwarten würde. Trotzdem ließ sich nicht definitiv ausschließen, daß *HMRI* an der Regulation von *FLO* beteiligt ist (siehe Diskussion).

*SAPI* ist Mitglied einer neuen Genfamilie, über die bislang keinerlei veröffentlichte Daten vorliegt.

Es war deshalb gerade wegen der oben genannten Sachverhalte interessant, einen Einblick in die *in vivo*-Funktion von *HMRI* und *SAPI* zu erhalten.

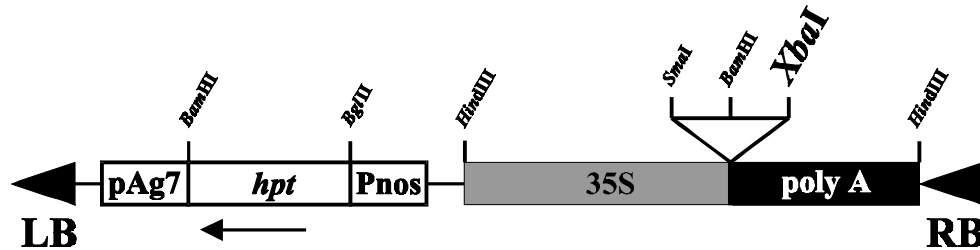
Die Funktion eines Gens kann im Idealfall über die Isolierung einer entsprechenden Mutante, d. h. über reverse Genetik aufgeklärt werden. In *Antirrhinum* kann dies z. B. über die Isolierung einer Mutante aus einer mittels transposablen DNA-Elementen mutagenisierten Population geschehen (Carpenter und Coen, 1990).

Eine alternative Annäherung an das Problem der Funktionsaufklärung eines Gens, die letztendlich auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, ist auch über konstitutive Expression dieses Gens *in planta* gegeben. Hierzu ist erforderlich, entsprechende Konstrukte in die Pflanze über Transformation stabil einzubringen.

Für *Antirrhinum* ist seit kurzem ein *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltes Hypokotyl-Transformationssystem verfügbar (Heidmann et al., 1998). Obwohl es sich um die mit Abstand effizienteste Methode für die Transformation von *Antirrhinum* handelt, ist dieses System, im Vergleich zu anderen Transformationssystemen wie *Arabidopsis* oder *Nicotiana* relativ arbeits- und zeitaufwendig und die erzielten Ausbeuten an regenerierten transgenen Pflanzen noch gering. Dennoch wurde entschieden, nach diesem Protokoll transgene *Antirrhinum* Pflanzen herzustellen, die *HMRI* und *SAPI* konstitutiv in *sense* und *antisense* Orientierung exprimieren sollten.

Deshalb wurde der binäre Pflanzenvektor pHyg35S (von Frau Dr. Zs. Schwarz-Sommer zur Verfügung gestellt) verwendet. Dieser Vektor ist ein Derivat von pGPTV-HPT (Becker et al., 1992) und trägt eine CaMV35S-Kassette, die eine konstitutive Expression

erlaubt (Odell et al., 1985). Außerdem wird durch die Verwendung von pHyg35S die Selektion der transgenen Kalli auf Hygromycin haltigen Medien ermöglicht (Abbildung 3-21).



**Abbildung 3-21.** Karte des binären Pflanzentransformationsvektors pHyg35S

Inserts von *HMR1* sind die PCR-Produkte der Primer 77 und 78, die von *SAP1* der Primern 75 und 76 (Sequenzen der Primer siehe 8.2). Über die in den Primern enthaltene *XbaI*-Schnittstellen konnten diese sowohl in *sense* als auch in *antisense*-Orientierung in pHyg35S kloniert werden. Es wurden Hypokotyle verschiedener *Antirrhinum majus* Wildtyp-Linien, wie 165E, Snowman, und Yellow monarch infiziert.

### 3.9.1 Transformation von *pHyg35S::HMR1se* und *pHyg35S::HMR1as*

Es überlebten lediglich Kalli, die mit den *pHyg35S::HMR1as*-Konstrukten (= *HMR1* in *antisense* Orientierung) transformiert wurden. Die wenigen resistenten Kalli, die die entsprechenden *sense*-Konstrukte trugen, starben nach kurzer Zeit ab. Bemerkenswert ist außerdem, dass von den sieben Pflanzen, die von den Transformationsexperimenten mit *pHyg35S::HMR1as* regeneriert werden konnten, fünf 165E-Pflanzen und zwei 'Yellow monarch'-Pflanzen sind. Diese Pflanzen konnten jeweils von unabhängigen Kalluslinien regeneriert werden. Bei den anderen Linien wurden entweder gar keine oder wenige überlebende Kalli beobachtet bzw. diese starben nach kurzer Zeit.

### 3.9.2 Transformation von *pHyg35S::SAP1se* und *pHyg35S::SAP1as*

Erstaunlicherweise verhielt es sich mit den Transformationsexperimenten von *pHyg35S::SAP1*-Konstrukten genau umgekehrt wie mit denen mit *pHyg35S::HMR1*: Es konnten lediglich Pflanzen aus Experimenten mit *pHyg35S::SAP1se*-Konstrukten

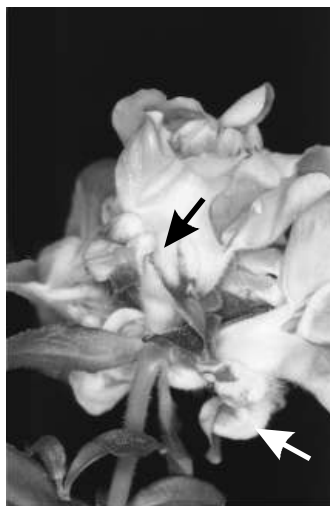
regeneriert werden. Es wurden mehrere 165E-Pflanzen von 4 unabhängigen Kalluslinien regeneriert.

### **3.9.3 Beobachtete phänotypische Veränderungen an den Pflanzen die *pHyg35S::HMR1as* enthalten**

Folgende Untersuchungen konnten lediglich an primären Transformanten vorgenommen werden, da die nachfolgende Generation zur Beobachtung noch nicht zur Verfügung stand. Die Präsenz der entsprechenden Konstrukte wurde mit PCR überprüft. Über die Anzahl der T-DNA-Kopien konnte damit keine Aussage getroffen werden. Die primären Transformanten wurden aus bewurzelten Stecklingen hergestellt. Deshalb ließen sich hinsichtlich einer Änderung der Blütezeit, die man eventuell bei Überexpression oder Ausschaltung eines Regulators von *FLO* erwarten könnte keine Aussagen treffen (s. Diskussion).

Die Pflanzen, die das *pHyg35S::SAPIse*-Konstrukt, enthalten, konnten im Wesentlichen nicht vom Wildtyp unterschieden werden.

Die *pHyg35S::HMR1as*-Pflanzen entwickelten sich alle während ihres vegetativen Wachstum auch unauffällig und waren ebenfalls von normalen Wildtyp-Pflanzen nicht zu unterscheiden. Die transgene Linie 337-35 zeigte während ihres generativen Wachstums deutliche Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp, nämlich eine extrem gedrungene wachsende Infloreszenz (Abbildung 3-22). Dieser Effekt wurde auch an sekundären Infloreszenzen, teilweise noch verstärkt, beobachtet (nicht gezeigt). Die Blüten sind nach öffnen deutlich dichter gedrängt als im Wildtyp. Fast alle Blüten zeigten petaloide Sepalen, d. h. die Kelchblätter sind zu Kronblättern homöotisch transformiert. Meistens waren die unteren (abaxialen) Kelchblätter transformiert, in einigen Fällen auch die adaxialen, in wenigen Blüten war der gesamte äußere Wirtel petaloid transformiert. Die Blüten waren im Übrigen in ihrer Entwicklung normal und fertil. Die gedrungene Infloreszenz konnten in den anderen Linien, die das *pHyg35S::HMR1as* enthielten nicht beobachtet werden. Zwei weitere transgene Linien, 337-41 und 337-42/1 zeigten, wenn auch in etwas schwächerer Ausprägung petaloide Sepalen. In der Linie 337-42/1 war dieses Phänomen allerdings weitgehend an sekundären Infloreszenzen zu sehen und in 337-41 an relativ wenigen Blüten. Die drei Linien 337-35, 337-41 und 337-42/1 entstammen alle der Linie 165E. Die beiden anderen Linien, die das Konstrukt enthielten, zeigen normale Entwicklung, die vom Wildtyp nicht zu unterscheiden ist, so wie auch die beiden 'Yellow Monarch'-Pflanzen.

**Wildtyp****337-35****337-35****337-42/1****337-41**

**Abbildung 3-22.** Petaloide Transformation der Sepalen von drei *Antirrhinum* 165E-Linien, die aus Transformationsexperimenten mit *pHyg35S::HMR1antisense* stammen (mit Pfeilen gekennzeichnet). Die Linie 337-35 hat zusätzlich noch eine im Vergleich zum Wildtyp gedrungene wachsende Infloreszenz.





## 4 Diskussion

### 4.1 Der Bereich (-213/-94) der *FLO*-Promotorregion enthält *cis*-Elemente, die möglicherweise an der Regulation von *FLO* beteiligt sind

In Band-Shift-Experimenten konnte gezeigt werden, daß Kernproteine spezifisch an das *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94) binden. In dem Ansatz mit Kernproteinextrakten aus Infloreszenzen schienen dabei stärker mit der DNA zu interagieren als Kernproteinextrakten aus vegetativen Geweben (Abbildung 3-1).

Bei der Beurteilung der Bindestärken muß beachtet werden, daß zwar die gleichen absoluten Mengen Protein (1 µg) geladen wurden, jedoch die Anreicherung der Kernproteine gewebeabhängig unterschiedlich ist. In Kontrollexperimenten mit CREB-DNA (Inamdar et al., 1991) konnte beobachtet werden, daß die Stärke der Protein/DNA-Interaktion mit vegetativem Kernextrakt im Vergleich zu jenem mit Infloreszenzkernextrakt geringer war (nicht gezeigt). Dies war ein Hinweis, daß die Qualität der Kernproteine aus vegetativem Gewebe generell schlechter war. Der Komplex zwischen vegetativen Kernproteinen mit dem *FLO*-Promotorregion-Fragment erscheint unschärfer. Außerdem scheint das Laufverhalten von Komplex und freier DNA in diesem Ansatz verändert zu sein. Dies ist vermutlich auf eine schlechtere Proteinqualität zurückzuführen. Vergleiche von Bandenhöhen und Bindungsintensitäten der DNA/Protein-Komplexe sind deshalb mit Vorsicht zu betrachten.

Aus den detektierten Interaktionen läßt sich schließen, daß das *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94) potentielle *cis*-regulatorische Elemente enthält, die vermutlich in verschiedenen Geweben aktiv sind. Dies steht mit der Vorstellung in Einklang, daß in vegetativen Geweben *FLO* supprimiert, während es in floralen Primordien aktiviert wird. Es kann dabei jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Kernproteine aus Infloreszenzen an die gleichen Elemente binden wie die Kernproteine aus vegetativen Geweben. Diese Frage ließe sich möglicherweise mit 'DNaseI-footprint'-Experimenten beantworten.

Mit dem Programm 'TFSEARCH' (Akiyama, im Internet ) der Transfac-Promotor-Datenbank (Heinemeyer et al., 1998) konnten in dem Bereich (-213/-94) keine aus Pflanzen-Promotorregionen bekannten *cis*-regulatorischen Elemente gefunden werden. Das Fragment enthält in der Nähe seines 3'-Endes von -119 bis -116 eine mutmaßliche TATA-box (Abbildung 3-1, Seite 29), die sich damit in einem typischen Abstand vom mutmaßlichen Transkriptionsstart des *FLO*-Genes, (-83 vom Start-ATG; Coen et al., 1990), befindet. Es läßt sich nicht ausschließen, daß in dem Band-Shift-Experiment unter

anderem auch die Bindung eines TATA-box-Bindungsproteins detektiert wurde. Allerdings deutet eine Doppelbande in dem Experiment mit Infloreszenzkernextrakt (Abbildung 3-1, Seite 29) darauf hin, das mehr als ein DNA-Bindeprotein an die DNA gebunden hat. Auf dem Fragment befinden sich eine Reihe AT-Stretche, sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts der mutmaßlichen TATA-box. Es gibt zahlreiche Beispiele AT-reicher *cis*-aktiver Elemente (Sandhu et al., 1998). Das 3'-Ende des Fragments (-213/-94), also der stromabwärts gelegene Teil der mutmaßlichen TATA-box, kann ebenfalls *cis*-regulatorische Elemente enthalten. In Pflanzenpromotoren können im Bereich stromabwärts der TATA-box regulatorische Sequenzen gelegen sein (z.B. Dickey et al., 1992).

Wegen der zu Beginn der Arbeit fehlenden Möglichkeit, *Antirrhinum* effizient zu transformieren, konnten keine Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte in Pflanzen transformiert werden. Derartige Konstrukte mit dem Reporter-Gen *GUS* ( $\beta$ -*GLUCURONIDASE*) hätten dann beispielsweise die gesamte *FLO*-Promoterregion enthalten, wobei der Bereich (-213/-94) systematisch mutiert worden wäre.

Die beobachtete Bindung von Kernproteinen im Bereich (-213/-94) läßt zwar die Anwesenheit von *cis*-aktiven Elemente vermuten. Trotzdem muß eingeräumt werden, daß der definitive Beweis dafür fehlt, daß in diesem Bereich *in vivo trans*-aktive Faktoren binden und *FLO* transkriptionell aktivieren.

## **4.2 Sowohl HMR1 als auch SAP1 enthalten Charakteristiken von nuklearen Proteinen wie Kernlokalisierungssignale und AT-hooks**

Über die Verwendung des *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94) als Sonde wurden die *HMR1*-cDNA und die *SAP1*-cDNA aus einer *Antirrhinum*-Infloreszenz-Expressionsbank isoliert. Als erstes Kriterium, als mögliche Regulatoren von *FLO* in Frage zu kommen, mußte untersucht werden, ob es sich tatsächlich um DNA-Bindeproteine handelt.

Tatsächlich kodieren beide cDNAs mit hoher Wahrscheinlichkeit für Proteine, die auch *in vivo* im Kern als DNA-Bindeproteine agieren. Dafür spricht, daß sowohl die Sequenzen von HMR1 (Abbildung 3-3) und SAP1 (Abbildung 3-8) jeweils mehrere Kernlokalisierungssignale enthalten. Desweiteren enthalten beide Faktoren sogenannte AT-hooks. Der AT-hook stellt ein DNA-Bindemotiv dar (Reeves und Nissen, 1990) und konnte sowohl experimentell als auch in den Proteindatenbanken bislang ausschließlich in nuklearen Proteinen gefunden werden (Aravind und Landsman, 1998).

HMR1, Mitglied der HMG-Y-ähnlichen DNA-Bindeproteine, besitzt zusätzlich zu sieben AT-hooks eine Domäne, die zu der globulären Domäne von Histon H1 homolog ist.

SAP1 besitzt neben einem AT-hook eine Domäne, die im Rahmen dieser Arbeit anhand von Sequenzvergleichen mit verwandten Proteinen aus *Antirrhinum* und anderen Spezies wie *Arabidopsis*, *Sinapis*, und *Pisum* definiert werden konnte und für eine neuartige pflanzliche DNA-Bindeproteinfamilie charakteristisch ist.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß AT-hooks fast ausschließlich in Kombination mit anderen für Nuklearproteine charakteristischen Domänen vorkommen (Aravind und Landsman, 1998). Als Beispiele seien hier PRHP aus Petersilie (Pathenogenesis-Related Homeodomain Protein; Korfhage et al., 1994), welches außer 4 AT-hooks, unter anderem eine Homöodomäne besitzt, UMC1 aus *Ustilago*, einem MADS-Box-Gen, das einen AT-hook besitzt (Kruger et al., 1997), ESE-1, ein humaner Epithel-spezifischer Transkriptionsfaktor, der zusätzlich zu einem AT-hook eine ETS-DNA-Bindedomäne enthält (Andreoli et al., 1997, Oettgen et al., 1997), und ein Zincofinger-AT-hook-Protein aus *Drosophila* (Genbank Zugangsnr. AJ002056) genannt. Interessanterweise werden AT-hooks auch in anderen Nuklearproteinen wie Transposasen und mutmaßlichen DNA-Methylasen gefunden (Aravind und Landsman, 1998). In diesen gerade genannten Fällen scheinen AT-hooks zusätzlich zu den genannten Bindemotiven 'Hilfs-Bindemotive' zu sein, um AT-reiche Sequenzen zu erkennen. Möglich ist auch, daß die Bindespezifität anderer DNA-Bindedomänen modifiziert wird, wie es z. B. für PRHP diskutiert wird (Korfhage et al., 1994). Faktoren, mit mehreren AT-hook-Kopien, z. B. HMG-Y scheinen meist keine anderen DNA-Bindedomänen zu enthalten.

Ob die AT-hooks in HMR1 und SAP1 die einzigen für die DNA-Bindung verantwortlichen Strukturen darstellen, oder ob möglicherweise noch andere Domänen zu der Interaktion mit DNA beitragen, wird in 4.3 erörtert.

Sowohl in HMR1 und SAP1 konnten keine *trans*-aktivierenden Bereiche wie saure Domänen oder Glutamin-Domänen gefunden werden. Glutamin-reiche Stretche wurden zum Beispiel im HMR1-verwandten Faktor PABF bzw. ATBP-1 gefunden und als *trans*-aktivierend diskutiert (Tjaden und Coruzzi, 1994 und Abbildung 3-4). Im N-Terminus des SAP1-verwandten und im Rahmen dieser Arbeit klonierten AHP2 aus *Arabidopsis* sind ebenfalls Glutamin-Stretche vorhanden (Abbildung 3-11).

HMR1 und SAP1 stellen deshalb keine 'klassischen' Transkriptionsfaktoren dar.

### **4.3 HMR1 und SAP1 scheinen trotz ihrer unterschiedlichen Struktur und AT-hook-Kopienzahl ähnliche Eigenschaften in Bezug auf DNA-Bindung zu besitzen**

HMR1 ist Mitglied der Familie der HMG-Y-ähnlichen DNA-Bindeproteine, die in Pflanzen ausnahmslos N-terminal eine Histon H1-Domäne enthalten. Die Anzahl der AT-hooks von einzelnen Familienmitgliedern variiert von vier (alle Pflanzen-HMG-Y i. e. S.) bis 14 (Reis AT1) sehr stark (Abbildung 3-4, Seite 34). HMR1 nimmt mit sieben AT-hooks eine mittlere Stellung ein. Es ist sicher, daß innerhalb eines Organismus verschiedene HMG-Y-ähnliche Faktoren mit abweichender Anzahl von AT-hooks existieren. Beispielsweise konnte aus Reis bislang PF1, das vier AT-hooks besitzt, also ein HMG-Y-Protein im engeren Sinne darstellt, und das gerade erwähnte AT1 isoliert werden (Nieto-Sotelo et al., 1994; Meijer et al., 1996). *Antirrhinum* besitzt mit hoher Wahrscheinlichkeit neben HMR1 auch noch HMG-Y. Das ist deshalb zu erwarten, weil HMG-Y aus anderen dicotylen Pflanzen wie *Glycine* (Laux et al., 1991), *Canavalia* (Yamamoto und Minamikawa, 1997), *Arabidopsis* (Gupta et al., 1997B) und *Pisum* (Gupta et al., 1997A) isoliert werden konnten. Über die biologische Relevanz des Vorhandenseins mehrerer HMG-Y-ähnlicher Faktoren mit unterschiedlicher Anzahl von AT-hooks ist bislang nichts bekannt. Es ist außerdem völlig unklar, ob HMG-Y-ähnliche Proteine in Abhängigkeit von der Anzahl der AT-hooks möglicherweise *in vivo* unterschiedliche Bindespezifitäten besitzen.

Aus Abbildung 3-5 geht hervor, daß lediglich vier der sieben AT-hooks aus HMR1 ein Arginin vor dem GRP (Glycin-Arginin-Prolin)-Motiv besitzen. In NMR-spektroskopischen Experimenten von Geierstanger et al. (1994) wurde gezeigt, daß die Arginine (R) aus dem RGRP-Motiv für den Kontakt mit der kleinen Grube der DNA *in vitro* wichtig ist. Synthetische Peptide der Sequenz KGKP (K = Lysin) binden AT-Stretche nicht, obwohl es sich hier um konservative Austausch handelt. Einige AT-hook-Proteine aus Pflanzen besitzen unter anderem AT-hooks, bei denen -wie bei HMR1- das N-terminale Arginin des RGRP-Motivs gegen Prolin, seltener gegen eine hydrophobe Aminosäure ausgetauscht wurde (z. B. PABF aus Tabak oder AT1 aus Reis). Die oben erwähnten NMR-Studien wurden mit AT-hooks aus Vertebraten-HMG-Y/I durchgeführt. Mit pflanzlichen AT-hooks sind zwar bislang keine entsprechenden Experimente durchgeführt worden. Da die angesprochenen Austausch bei pflanzlichen AT-hooks häufig sind, liegt jedoch die Vermutung nahe, daß diese nicht zu einem Funktionsverlust führen.

Obwohl entsprechende Deletionen mit HMR1-Proteinen nicht durchgeführt werden konnten (s. u.), scheint die Histon H1-Domäne für die Bindung an DNA *in vitro* nicht

erforderlich zu sein. Das zu HMR1-verwandte Protein ATBP-1 aus Tabak, das PABF entspricht, bei dem die Histondomäne deletiert ist, bindet dennoch *in vitro* an ein AT-reiches DNA-Sequenzelement (Tjaden und Coruzzi, 1994). Allerdings ist denkbar, daß die Histon H1-Domäne eine indirekte Funktion für die Interaktion mit DNA *in vivo* besitzt (siehe 4.3.1).

SAP1 verhielt sich im South-western-Experiment hinsichtlich der Bindestärke an das *FLO*-Promotorregion-Fragment (-213/-94) ähnlich wie HMR1, obwohl es lediglich eine AT-hook-Kopie besitzt. Aus diesem Grund sollte zum genaueren Vergleich der biochemischen Eigenschaften beider Faktoren Binde-Tests (EMSA) durchgeführt werden. Hierfür benötigte HMR1- und SAP1-Proteine sollten mittels der Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems (Qiaexpress) verfügbar gemacht und aufgereinigt werden. Bezüglich HMR1 zeigte sich, daß die Expression in beiden vom Hersteller empfohlenen *E. coli*-Stämmen problematisch war. Im Western blot war sichtbar, daß das HMR1-Protein zu distinkten Fragmenten abgebaut wurde (Abb. 3-17). Gerade für Retardationsexperimente ist Protein dieser Qualität ungeeignet, weil bei etwaiger DNA-Bindeaktivität von Abbauprodukten es unmöglich wäre, die entsprechenden Komplexe zu interpretieren. Ähnliche Probleme wie bei der Überexpression von HMR1 wurden bei der bakteriellen Expression von PRHP, dem oben erwähnten Homeodomain-AT-hook-Protein aus Petersilie beobachtet. Es konnten lediglich Versionen von PRHP exprimiert werden, bei denen die vier AT-hooks deletiert waren (Korfhage et al., 1994). Die Toxizität von AT-hooks in *E. coli* läßt sich mit einer möglichen Interaktion mit der chromosomalen DNA erklären. Daß AT-hooks auch in bakteriellen Systemen in DNA-Bindung involviert sein können ist mit der Charakterisierung von *CarD* aus *Myxococcus xanthus* belegt worden. *CarD* besitzt als DNA-Bindedomänen vier AT-hooks und wirkt als Transkriptionsfaktor (Nicolás et al., 1996).

Auf den Western blots war erkennbar, daß die Extrakte von HMR1-überexprimierenden Zellen anscheinend auch vollständiges HMR1-Protein enthielten. Auffallend war, daß das Laufverhalten der entsprechenden höchsten Bande offensichtlich unterschiedlich davon beeinflußt wurde, ob das 'His-tag' N-terminal oder C-terminal fusioniert war. Außerdem liefen die Banden höher (ca. 55 - 60 kDa), als es für das berechnete Molekulargewicht (42,5 kDa, inklusive His-tag) zu erwarten war. Ein ähnlicher Effekt wurde bei dem HMR1-verwandten Protein PF1 aus Reis beobachtet. Während PF1 in voller Länge im SDS-Gel ein wesentlich erhöhtes apparentes Molekulargewicht hatte, wurden die Unterschiede zwischen theoretischem und apparenten Molekulargewicht bei PF1-Proteinen graduell geringer, je mehr an ihrem C-Terminus deletiert wurde. Die Sequenzen der deletierten Bereiche enthielten AT-hooks und einen dazwischenliegenden Alanin/Prolin-reichen Stretch (Nieto-Sotelo et al., 1994). Auch in HMR1 ist zwischen

dem dritten und vierten AT-hook eine Alanin-reiche Sequenz, unterbrochen mit einigen Prolinen und Valinen, zu finden (AS 210 - AS 233 in Abbildung 3-3). Das bei HMR1 und PF1 beobachtete Phänomen des höheren apparenten Molekulargewichts scheint typisch für diese Faktorfamilie zu sein und ist vermutlich in der ähnlichen Struktur der beiden Proteine begründet.

Die Expression von SAP1 in *E. coli* war erfolgreich. Scheinbar war eine AT-hook-Kopie für *E. coli* nicht schädlich. Interessanterweise band SAP1 im nativen Zustand, während dies im South-western-screening lediglich nach Denaturierung und Rückfaltung unter Verwendung von Guanidiniumhydrochlorid der Fall war. Da das Start-ATG der SAP1-cDNA fehlte, stellt das exprimierte Protein ein Fusionprodukt mit der von dem  $\lambda$ gt22A-Phagen kodierten  $\beta$ -Galactosidase dar. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß sich daraus Probleme bezüglich der Faltung des resultierenden Polypeptids ergaben. Eine Behandlung der mit pQE60 überexprimierten und aufgereinigten SAP1-Proteine mit Guanidiniumhydrochlorid hatte keinerlei Einfluß auf seine Bindeaffinität zur *FLO*-Promotorregion-DNA. Es ist deshalb naheliegend, daß die Konformation zwischen den nativen Proteinen und den denaturiert-renaturierten Proteinen die gleiche ist. Es kann ebenfalls rückgeschlossen werden, daß die im South-western-Experiment denaturiert-renaturierten SAP1-Proteine, die DNA-Bindungsaktivität zeigten, sich in einer dem nativen Protein entsprechenden Konformation befunden haben.

SAP1 band als vollständiges Protein scheinbar kooperativ an das Fragment (-213/-94). Wie läßt sich das kooperative Bindevverhalten von SAP1 erklären? Das Retardationsgel mit dem Titrationsexperiment zeigt deutlich, daß es mehrere Bindestellen auf dem *FLO*-Promotorregion-Fragment geben muß. Bei mittleren Faktor-Konzentrationen entstanden zwei Komplexe in unterschiedlicher Höhe, was durch unterschiedlich stark mit SAP1-Protein besetzten DNA-Molekülen interpretiert werden kann. Wurde die Konzentration von SAP1 weiter erhöht, verschwand der unterste Komplex zugunsten des Komplexes mit der geringeren Mobilität. Außerdem verminderte sich das 'Schmier' bei höherer Proteinkonzentration, was auf eine Stabilisierung der Komplexe hindeutete. Eine wahrscheinliche Interpretation dieser Befunde ist, daß mehrere SAP1-Proteine zuerst an verschiedene Elemente der DNA banden und die Stabilisierung der Protein/DNA-Interaktionen durch anschließende Interaktion der SAP1-Proteine untereinander zustande kam. Wahrscheinlich waren Bereiche innerhalb der aufgrund von Homologie definierten Domäne in die Protein-Protein-Interaktion involviert. Ein Indiz hierfür ist, daß die für Protein-Protein-Interaktion erforderlichen hydrophoben Bereiche fast ausschließlich innerhalb dieser Domäne vorkommen. Die Idee, daß ein kooperativer Effekt durch die Interaktion von mehreren AT-hooks mit mehreren AT-Stretchen zustande kommen kann, wird durch die Experimente von Maher und Nathans (1996) bestätigt. Anhand von *in*

*in vitro*-Bindetests mit synthetischen DNA-Molekülen und HMG-Y/I bzw. HMGI-C (HMGI-C gehört ebenfalls zur HMG-Y-Familie aus Säugern und enthält drei AT-hooks) konnte gezeigt werden, daß mehrere, in gewissen Abstand liegende AT-Stretche sich in ihrer Affinität zu HMG-Y/I bzw. HMGI-C kooperativ verhalten, während DNA-Moleküle, die lediglich einen AT-Stretch enthielten, schwach interagierten. Daraus schlossen die Autoren, daß bei starker Bindung jeweils zwei oder drei AT-hooks an zwei oder drei AT-stretche banden, während bei schwacher Bindung lediglich ein AT-hook mit dem einem AT-Stretch interagierte. Außerdem konnte gezeigt werden, daß AT-hooks *in vitro* spezifisch an AT-Stretche von 5 Nukleotiden und länger binden. Auf das *FLO*-Promotorregion-Fragment übertragen, bedeutet das, daß dieses sechs AT-Stretche enthält, die ideale Zielsequenzen für AT-hooks darstellen (Abbildung 4-1). Demnach ist die oben getroffene Annahme, daß mehrere untereinander interagierende SAP1-Proteine an mehrere DNA-Elemente via AT-hook binden wahrscheinlich. Eine weitere Bestätigung dafür, daß der kooperative Effekt durch die Bindung an mehrere DNA-Elemente zustande kam, ist, daß die Bindeaffinität zu kürzeren DNA-Fragmenten, die weniger AT-stretche enthielten, sprunghaft abnahm (EMSA mit den Fragmenten -213/-164 bzw. -213/-143). Auch wenn wahrscheinlich ist, daß an der Protein/DNA-Interaktion weitgehend der AT-hook aus SAP1 beteiligt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch noch andere, C-terminale Bereiche von SAP1 DNA-bindend sind. Auch deshalb läßt sich auch nicht entscheiden, ob neben AT-Stretchen möglicherweise noch andere DNA-Sequenzen an der Interaktion mit SAP1 beteiligt sind.

```

-213  GAGTTTTGTG  CAGATTTTTAT  GAATAATTTG  GTGTAATTTT
-173  CCCATGAAAG  CCCAAAATAA  ACACAAAACC  CATAATAAAA
-133  TTTAAAAAAA  AAAATATATC  TTTAAAAGCA  CCCCACACC

```

**Abbildung 4-1.** Darstellung von mutmaßlichen Zielsequenzen in der *FLO*-Promotorregion (-213/-94). Alle AT-Stretche, deren Länge 5 Nucleotide übersteigen, stellen mögliche Bindesequenzen für AT-hooks dar (unterstrichen).

Die DNA-Bindeaktivität von HMR1 war im South-western-screening auch -wie bei SAP1- lediglich auf den mit Guanidiniumhydrochlorid behandelten Filtern nachweisbar. Auch hier gilt im Prinzip das gleiche, was schon für SAP1 diskutiert wurde: Wahrscheinlich kam es zu falscher Faltung des HMR1-Proteins. Da sich vor dem mutmaßlichen Start-ATG kein Stopcodon befindet, liegt vermutlich auch HMR1 als Fusionsprotein mit der  $\beta$ -Galactosidase vor. Zum biochemischen Verhalten von HMR1 konnten zwar aus den oben genannten Gründen keine näheren Untersuchungen angestellt

werden. Dennoch ist wahrscheinlich, daß mehrere AT-hook-Bindemotive aus HMR1 an verschiedene AT-Stretche des Fragments (-213/-94) binden, ähnlich dem Mechanismus in HMG-Y/I bzw HMGI-C aus Säugern (s. o.). Nur diese Möglichkeit kann die äußerst stabile Bindung von HMR1 im South-western-screening erklären. Es läßt sich jedoch keine Aussage darüber treffen, welche AT-hooks von HMR1 zu dieser Bindung beitragen und -wie schon bei SAP1- welche AT-stretche des Fragments (-213/-94) bzw. ob die gleichen AT-stretche von SAP1 gebunden wurden. Daß bei HMG-Y-ähnlichen Faktoren nicht unbedingt alle AT-hooks in die Protein/DNA-Interaktion involviert sein müssen, zeigen die bereits oben erwähnten Deletionsexperimente, die mit PF1 durchgeführt wurden. Für die Interaktion mit der Zielsequenz PE1 (Positive element 1 aus der Phytochrom A3-Promotorregion aus Hafer) scheinen nur die beiden N-terminalen der vier AT-hooks erforderlich zu sein. Allerdings war lediglich ein AT-hook für eine Bindung an PE1 nicht ausreichend (Nieto-Sotelo et al., 1994).

#### 4.3.1 Mögliche Interaktionen von HMR1 mit Chromatin und Kern-Proteinen

Wie schon in 4.3 behandelt, ist die Histon H1-Domäne von HMG-Y-ähnlichen Faktoren für die Interaktion mit DNA *in vitro* nicht erforderlich. Durch ihre Ähnlichkeit zur globulären Domäne von Histon H1 ist eine DNA-bindende Funktion auch nicht zu erwarten. *In vivo* könnte diese Domäne dennoch indirekt zu der Interaktion mit DNA beitragen. Von manchen Autoren wird diskutiert, daß die Histon H1-Domäne von HMG-Y ähnlichen Proteinen mit Chromatin interagiert (Laux et al., 1991) oder als alternative 'Linker-Histone' an der Chromatinorganisation beteiligt sind (Aravind und Landsman, 1998).

HMR1 enthält neben der Histon H1-Domäne zwei mutmaßliche Leucin-zipper-Motive, einmal im C-terminalen Teil der Histon H1-Domäne und zum anderen am C-Terminus. Beide Motive enthalten, abweichend vom klassischen Leucin-zipper-Motiv, das aus vier oder mehr Leucinen besteht (Pabo und Sauer, 1992), drei Leucine. Die entsprechenden Bereiche wurden durch Computeranalysen als  $\alpha$ -Helix vorhergesagt. Die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix ist, neben dem Leucin-Motiv, die Voraussetzung für die Funktion eines Leucine-zippers. Auch wenn derartige Strukturvorhersagen letztendlich keine völlige Gewißheit geben, ob es sich um die tatsächliche Struktur *in vivo* handelt, stellen diese beiden Leucin-zipper-Motive mögliche Interaktionsdomänen mit anderen nuklearen Faktoren dar.

Ein vorstellbarer Mechanismus von HMR1 wäre, daß die Histon H1-Domäne Histon H1 aus Chromatin verdrängt und dadurch DNA für die Interaktion mit den AT-hooks zugänglich macht. Dadurch könnte dann wiederum die Bindung von



Transkriptionsfaktoren und/oder anderen DNA-Bindeproteinen an die DNA, möglicherweise über eine Leucin-zipper-vermittelte Protein/Protein-Interaktion erleichtert werden.

#### **4.3.2 HMR1 und SAP1 binden präferentiell, aber wahrscheinlich nicht sequenzspezifisch an DNA**

AT-hooks interagieren spezifisch in der kleinen Grube der DNA-Doppelhelix in Bereichen von AT-Stretchen. Dennoch ist es bislang unmöglich, Konsensus-Bindesequenzen für AT-hook-DNA-Bindeproteine zu finden, weil in die DNA-Protein-Interaktion meistens mehrere AT-hooks oder AT-hooks in Kombination mit anderen DNA-Bindemotiven involviert sind und sich daraus vielfältige Möglichkeiten von Zielsequenzen ergeben. Beispielsweise wurde PF1 aus Reis ursprünglich über seine Interaktion mit PE1 in einem South-western-screen isoliert (Nieto-Sotelo et al., 1994). Kurze Zeit später wurde der gleiche Faktor, ebenfalls über einen South-western-screen, jedoch unter Verwendung einer AT-reichen Zielsequenz von Homeodomain-Proteinen gefunden (Meijer et al., 1996). Andererseits konnte gezeigt werden, daß PF1 nicht in der Lage war, an eine mutierte Version von PE1 *in vitro* zu binden, obwohl dieses noch AT-reich ist (Nieto-Sotelo et al., 1994; Meijer et al., 1996). Dieser Befund deutet auf eine gewisse Sequenzspezifität hin. Auch HMR1 und SAP1 scheinen generell nicht jede AT-reiche Sequenz *in vitro* zu binden. Wie eingangs erwähnt (Seite 28), wurden im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der *FLO*-Promotorregion noch andere Bereiche identifiziert, die mit Infloreszenz-Kernproteinen interagierten. Mit zwei weiteren AT-reichen Sonden wurden ebenfalls South-western-screenings durchgeführt, jedoch ohne daß Signale beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Würden HMR1 und SAP1 unspezifisch AT-reiche DNA binden, hätten sie unter Verwendung dieser Sonden isoliert werden müssen.

Dennoch ist auch im Fall von HMR1 aufgrund der relativ hohen Zahl von AT-hooks und der sich daraus theoretisch ergebenden DNA-Interaktionsmöglichkeiten wahrscheinlich, daß es an verschiedene Zielsequenzen binden kann.

SAP1 scheint offensichtlich an mehrere Elemente in dem *FLO*-Promotor-Fragment zu binden. Doch auch SAP1 besitzt wahrscheinlich gewisse Präferenzen in Bezug auf seine Zielsequenzen. In den Bandshift-Experimenten konnte gezeigt werden, daß SAP1 spezifisch an das *FLO*-Promotor-Fragment gebunden hatte, denn sogar bei hohen Konzentrationen von unspezifischer Kompetitor-DNA war der SAP1/DNA-Komplex stabil.

Letztendlich geben alle Untersuchungen, die mit HMR1 und SAP1 *in vitro* durchgeführt wurden, lediglich Anhaltspunkte über ihr biochemisches Verhalten *in vivo*. In diesem Zusammenhang soll noch darauf hingewiesen werden, daß die Bindeaktivität von AT-hooks über Phosphorylierungen von umgebenden Aminosäuren *in vivo* oder *in vitro* modifiziert werden können (Siino et al., 1995). Diese Versuche wurden wiederum mit Vertebraten-HMG-Y/I durchgeführt. Es ist nicht bekannt, ob entsprechende Mechanismen in Pflanzen existieren.

#### **4.4 Es konnten in *Arabidopsis* keine orthologen Gene von *SAP1* aus *Antirrhinum* gefunden werden**

Über ein heterologes Screening, unter Verwendung der *Antirrhinum* SAP1-cDNA als Sonde wurden aus *Arabidopsis* mutmaßliche orthologe Gene von SAP1 isoliert. Die Isolation von SAP1 aus *Arabidopsis* sollte zusätzliche Möglichkeiten erschließen, Mutanten von SAP1 zu finden. Die beiden isolierten cDNAs, *AHP1* und *AHP2* kodieren für Proteine, die zu SAP1 zwar ähnlich sind, jedoch ein zusätzliches AT-hook-Motiv enthalten und ein höheres Molekulargewicht aufweisen als SAP1. Die N- und C-Termini sind zwischen SAP1 und *AHP1* bzw. *AHP2* überhaupt nicht konserviert. Diese Daten belegen, daß es sich bei *AHP1* und *AHP2* unter keinen Umständen um Kandidaten von zu *SAP1* orthologen (ortholog = funktionell homolog) Genen handeln kann. Es ist sicher, das es auch *Arabidopsis*-Proteine dieser Familie mit einer AT-hook-Kopie gibt, z. B. der EST-Klon N37194. Trotzdem wurden weniger Sequenzübereinstimmungen zwischen SAP1 und N37194 als zwischen SAP1 und *AHP1/2* gefunden. Warum SAP1 aus *Arabidopsis* nicht isoliert werden konnte, kann verschiedene Gründe haben. Entweder war es in der untersuchten cDNA-Bank aus unerfindlichen Gründen nicht vorhanden oder SAP1 ist generell in *Arabidopsis* nicht vorhanden. Die Antwort auf diese Frage wird sich in den nächsten Jahren wie von selbst beantworten, nämlich wenn im Rahmen der Sequenzierprojekte das gesamte *Arabidopsis*-Genom entschlüsselt sein wird.

#### 4.5 Sind *HMR1* und *SAP1* an der Regulation von *FLO* und an dem Phasenwechsel von vegetativem Wachstum zu generativem Wachstum beteiligt?

Die wichtigste, weil die Arbeitshypothese dieser Arbeit betreffende Frage ist, ob *HMR1* und/oder *SAP1* an dem Phasenwechsel zwischen vegetativem Wachstum und generativem Wachstum (= florale Transition) beteiligt sind. Im Folgenden wird sich zeigen, daß diese Frage in Anbetracht des derzeitigen Kenntnisstandes nicht abschließend beantwortet werden kann.

Es kann jedoch mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß mit *SAP1* und *HMR1* Vertreter von Phasen-Umschalt-Genen isoliert werden konnten. Phasen-Umschalt-Gene sind nämlich *spezifisch* an dem Umschaltprozess zwischen vegetativer und generativer Phase beteiligt. Der eher Entwicklungsstadium-unabhängige Charakter der Expression von *SAP1* und *HMR1* und auch die vermutlich vielfältigen DNA-Interaktionsmöglichkeiten lassen keineswegs den Schluß zu, daß es sich hier um spezifisch in die florale Transition involvierte Gene handelt. Das genaue räumliche Expressionsmuster von *SAP1* wurde noch nicht abschließend untersucht. Bezüglich der räumlichen Expression von *HMR1* innerhalb der Infloreszenz ergibt sich ein komplexes Bild. Die *HMR1*-mRNA scheint im Bereich der Internodien, in der Nähe von floralen Primordien exprimiert zu sein. Dieses Expressionsmuster paßt einerseits zu dem mutanten Phänotyp einer der transgenen *35S::HMR1 antisense*-Linien (siehe 4.6). Andererseits ist eine Expression außerhalb von floralen Primordien für einen möglichen transkriptionellen Aktivator von *FLO* nicht wünschenswert. Die mit der *in situ*-Hybridisierung gewonnenen Daten sind trotzdem mit aller Vorsicht zu betrachten. Es läßt sich nämlich nicht ausschließen, daß Bereiche, in denen die *HMR1*-Expression möglicherweise geringer ist, nicht detektiert wurden. Solche Beobachtungen wurden bei der Expressionsanalyse von *LEAFY* aus *Arabidopsis* gemacht: Während das *LEAFY*-Transkript in *in situ*-Hybridisierungen lediglich in floralen Primordien nachgewiesen werden konnte (Weigel et al., 1992), beweisen Expressionstudien mit einem Reportergen, daß *LEAFY* schon während der vegetativen Phase exprimiert wird (Blazquez et al., 1997). Es wurden mehrere unabhängige Transformationsexperimente mit *35S::HMR1sense* Konstrukten durchgeführt. Es überlebten jeweils nur sehr wenige Kalli, die dann kurze Zeit später starben. Möglicherweise ist die konstitutive Expression von *HMR1* toxisch. Deshalb ist durchaus denkbar, daß *HMR1* generell auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird. Um tatsächlich ausschließen zu können, daß *HMR1* nicht doch in floralen Primordien exprimiert wird, müßten weitere Untersuchungen, z. B. auf Proteinebene durchgeführt werden.

Ein Kennzeichen von Phasen-Umschalt-Genen ist, daß sie die Blütezeit beeinflussen. Eine konstitutive Expression von solchen Genen könnte verfrühtes Blühen bewirken, eine Verhinderung der Expression eine verspätetes Blühen. Tatsächlich blüht *Arabidopsis* früher, wenn mögliche Phasen-Umschalt-Gene konstitutiv exprimiert werden (*CO*; Simon et al., 1996; *SPL3*; Cardon et al., 1997). Umgekehrt führen Mutationen von *CO* zu später Blüte (Putterill et al., 1995). Falls *HMR1* oder *SAP1* in den Wechsel zwischen vegetativer Phase und generativer Phase involviert sein sollten, könnte eine konstitutive *sense*- oder *antisense*-Expression auf die Blütezeit einen Einfluß haben.

Es konnten transgene *Antirrhinum*-Pflanzen erzeugt werden, die *35S::SAP1sense*- und *35S::HMR1antisense*-Konstrukte enthalten. Neben *35S::HMR1sense*-Kalli (s. o.) überlebten auch *35S::SAP1antisense*-Kalli nicht, sodaß keine entsprechenden Pflanzen regeneriert werden konnten. Es ist denkbar daß die *antisense*-RNA auch auf die Transkripte der Schwestergene von *SAP1* einen Einfluß hat, was wiederum einen letalen Effekt hervorrufen könnte. Bislang wurden lediglich primäre Transformanten beobachtet. Da diese aus bewurzelten Stecklingen hergestellt wurden, lassen sich keine Aussagen darüber machen, ob die Blütezeit verändert ist. Unabhängig davon, ob *HMR1* und *SAP1* an der Regulation von *FLO* beteiligt sind oder nicht, kann aus der Isolierung von DNA-Bindeproteinen dieser Klasse nur gelernt werden, daß am Umschaltprozess von vegetativem zu generativem Wachstum neben Schlüsselgenen, wie *CONSTANS* möglicherweise auch andere Faktoren beitragen können. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch AT-hook-Proteine durch ihre vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten auch zu der floralen Transition beitragen. Aber gerade diese relativ geringe Spezifität läßt vermuten, daß die Funktionen dieser Proteine redundant und nicht auf die florale Transition beschränkt sind.

Leider bleibt die Frage bis heute weitgehend ungeklärt, welche allgemeingültigen genetischen Mechanismen in höheren Pflanzen den Phasenwechsels vegetativ/generativ direkt steuern.

#### **4.6 Mögliche Funktion von *HMR1* in der Reprimierung von Klasse B-Genen im äußeren Wirtel**

In drei von fünf transgenen *35S::HMR1antisense*-Pflanzen der *Antirrhinum*-Linie 165E konnte eine deutliche homöotische Transformation in den äußeren Blütenwirteln beobachtet werden. Die Sepalen wurden zu petaloiden Strukturen umgewandelt, während die anderen Organe der Blüte nicht beeinträchtigt waren. Diese Linien stammen aus unabhängigen Transformationsereignissen. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die

beobachteten Veränderungen wirklich auf das Transgen und nicht etwa auf Mutagenese durch das T-DNA-Konstrukt zurückzuführen sind. Nicht untersucht wurde bislang die Expression der *HMRI-antisense*-RNA und das endogene *HMRI*-Transkript. Da noch keine genomischen Southern blot-Hybridisierungen durchgeführt wurden, kann auch keine Aussage über die Kopienzahl des Transgens in den einzelnen transgenen Linien gemacht werden.

Die folgenden Interpretationen basieren auf der Annahme, daß die Konzentration des endogenen *HMRI*-Transkriptes in den Transgenen verringert ist. Eine Pflanzenlinie (337-35) zeigt neben der homöotischen Transformation des äußeren Wirtels eine drastisch verkürzte Infloreszenzachse während die Länge der Internodien des vegetativen Bereichs völlig normal erschien. Eine verkürzte Infloreszenzachse wird auch in der *Antirrhinum obtecta*-Mutante beobachtet (Stubbe, 1966; W.-E. Lönning, persönliche Mitteilung). Dieser Phänotyp stimmt mit dem in den *in situ* Hybridisierungen beobachteten *HMRI*-Expressionsmuster überein. Für die Streckung von Internodien scheint Gibberellin eine Rolle zu spielen. Ein Besprühen von Gibberellinen auf *Antirrhinum*-Pflanzen hat nämlich eine drastische Verlängerung der Internodien zur Folge (F. Cremer, persönliche Mitteilung). Denkbar ist, daß *HMRI* eine Rolle in diesem Signalweg spielt. Ein Grund dafür, weshalb eine Verkürzung der Infloreszenz-Internodien in den beiden anderen Linien (337-41, 337-42/1) nicht beobachtet wurden, ist möglicherweise eine schwächere Expression des *antisense*-Transkriptes in diesen Linien, weshalb die sehr starke endogene *HMRI*-Expression im Bereich der Internodien nicht kompensiert werden konnte. Wichtig ist dennoch die Feststellung, daß die Merkmale der homöotischen Veränderungen und die der Internodienverkürzung voneinander unabhängig sind. Petaloide Sepalen konnten in den Linien 337-41 und 337-42/1 nicht an allen Blüten festgestellt werden, während in der Linie 337-35 alle Blüten betroffen waren. Auch dieser Effekt läßt sich mit einer geringeren *antisense*-Transkript-Menge begründen. Wahrscheinlich wird ein gewisser Schwellenwert, der für das Ausschalten des endogenen *HMRI*-Transkriptes erforderlich ist, in den entsprechenden Blüten, die Wildtyp-Organe hervorbringen, nicht erreicht.

Werden die Daten aus den *in situ*-Hybridisierungen zugrunde gelegt, wird *HMR1* nicht in den Blüten exprimiert. Wenn dies wirklich der Fall sein sollte, wäre die Wirkungsweise von *HMRI* nicht zellautonom. Nicht zellautonomes Verhalten, d. h. von der Expression abweichender Wirkort zeigen eine Reihe von pflanzlichen DNA-Bindeproteinen, wie zum Beispiel *FLO* (Carpenter und Coen, 1995; Hantke et al., 1995), *DEF/GLO* aus *Antirrhinum* (Perbal et al., 1996) und *IDI* aus Mais (Colasanti et al., 1998). Es wäre denkbar, daß *HMR1*-Proteine in andere Gewebe transloziert werden. Entsprechende Mechanismen konnten zum Beispiel bei den MADS-box-Proteinen *DEF* und *GLO* aus *Antirrhinum* gefunden werden (Perbal et al., 1996).

Der Phänotyp der *35S::HMRIantisense*-Pflanzen legt nahe, daß *HMRI* in die Regulation der Klasse B-Gen-Expression (Klasse B-Gene: siehe 1.1, Seite 5) im äußeren Blütenwirtel involviert ist. Es wäre sehr interessant zu wissen, ob die petaloiden Sepalen tatsächlich durch ektopische Expression von den Klasse B-Genen wie *DEF* und *GLO* verursacht sind. Es konnten *Antirrhinum*-Mutanten isoliert werden, die einen zu den *HMRI-antisense*-Pflanzen ähnlichen Phänotyp zeigen. Mutanten dieser Gene, *CHORIPETALA (CHO)* und *DESPENTEADO (DES)* zeigen unter anderem zu Petalen transformierte Sepalen, verursacht durch Expression von Klasse B-Genen im äußeren Wirtel (E. de Andrade Silva und M. Wilkinson, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise ist *HMRI* *DES* oder *CHO* bzw. eine andere Komponente in der Regulation von Klasse B-Genen.

Die Funktion von *HMR1* während der vegetativen Entwicklung ist offensichtlich redundant, da die *HMRIantisense*-Transgenen sich in dieser Phase völlig normal entwickelten.

Es muß noch einmal betont werden, daß es sich bei allen im Zusammenhang mit *Antirrhinum*-Transgenen dargestellten Daten um vorläufige Ergebnisse handelt. Zur weiteren Absicherung dieser Ergebnisse muß die Nachkommenschaft der *HMRI-antisense*-Pflanzen untersucht werden. Ferner müssen dann mit diesen Pflanzen Northern- und Southern blot-Analysen durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Regulation des Phasenübergangs zwischen vegetativem Wachstum und generativem Wachstum (florale Transition) ist ein auf molekularer Ebene bis heute weitgehend unverstandener Prozess. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, Faktoren zu isolieren, die die florale Transition steuern (Phasen-Umschalt-Gene). Als Ausgangspunkt diente das florale Meristem-Identitäts-Gen *FLORICAULA (FLO)* aus *Antirrhinum majus*, das das Ende des Phasenübergangs zum generativem Wachstum abgrenzt. Nach der hier verfolgten Strategie sollten Regulatoren von *FLO* auch Phasenumschaltgene umfassen. Es konnten *cis*-Elemente in der *FLO*-Promotorregion in dem AT-reichen Bereich (-213/-94) vom Start-ATG detektiert werden, die möglicherweise an der Regulation beteiligt sind.

Unter Verwendung eines Fragments aus diesem Bereich als Sonde wurden bei einem Screening einer *Antirrhinum*-Infloreszenz-Expressionsbank zwei verschiedene cDNAs, *HMRI* und *SAP1* isoliert, die beide für AT-hook-DNA-Bindeproteine kodieren. *HMRI* gehört zur HMG-Y-ähnlichen DNA-Bindeprotein-Familie, *SAP1* zu einer neuartigen DNA-Bindeproteinfamilie, die, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit in allen höheren Pflanzen vorhanden ist. *HMRI* besitzt neben den familien-bekanntem Eigenschaften, eine Histon H1 globuläre Domäne und sieben AT hooks noch zwei Leucin-zipper, was auf eine mögliche Interaktion mit anderen nuklearen Faktoren hindeutet. *SAP1* bindet offensichtlich kooperativ an seine Ziel-DNA. Da *SAP1* nur ein DNA-Bindemotiv besitzt, wurde vorgeschlagen, daß mehrere *SAP1*-Moleküle, wahrscheinlich über eine neue, familienspezifische Domäne miteinander interagieren und den kooperativen Effekt ermöglichen.

Die mögliche Beteiligung an der Regulation von vegetativem zu generativem Wachstum dieser Faktoren muß noch gezeigt werden. Das Expressionsmuster der beiden Faktoren und die Charakteristiken der DNA-Bindedomänen deuten darauf hin, daß *SAP1* und *HMRI* nicht spezifisch für eine bestimmte Funktion sind. Andererseits ist es möglich, daß eine gewisse Spezifität erst über die Interaktion mit anderen nuklearen Faktoren erreicht wird. Neben den gerade erwähnten Leucin-zippeln wären auch die hydrophoben Bereiche in der konservierten Domäne von *SAP1* denkbare Interaktionspartner. Vorläufige Untersuchungen des Phänotyps von *HMRI-antisense*-Pflanzen legt eine Beteiligung an der Regulation von Klasse-B-Genen und möglicherweise in der Regulation von Internodienstreckung nahe.





## 6 Ausblick

Über die Methode des South-western-screenings konnten zweifellos sequenzspezifische DNA-Bindeproteine, auch aus Pflanzen, isoliert werden. Dennoch muß eingeräumt werden, daß die meisten der in letzter Zeit über diese Methode aus Pflanzen isolierten Faktoren AT-hook-Faktoren sind, da diese in der Lage sind, ohne Co-Faktoren mit DNA zu interagieren. Es hat sich gezeigt, daß aber gerade viele interessante DNA-Interaktionen und Proteinfunktionen erst über Heteromerisierung von Faktoren erreicht wird. Denkbar ist auch, daß allgemeinere (Co-)Faktoren für eine Interaktion mit DNA erforderlich sind. Für die Detektion solcher Interaktionen ist die Methode des South-western-screenings nicht geeignet.

Für die hier gestellte Frage, Regulatoren von Meristemidentitätsgenen zu isolieren wäre es deshalb sinnvoll, in Zukunft auch andere Systeme, wie das One-Hybrid-System in Hefe zu verwenden. Es würde zumindest die Isolierung von Faktoren erlauben, die allgemeinere Co-Faktoren für die Bindung an DNA benötigen. Außerdem entfallen alle Probleme, die mit der Proteinfaltung im Zusammenhang stehen, weil es sich hierbei um ein eukaryotisches System handelt, das darüberhinaus den großen Vorteil besitzt, daß es *in vivo* durchgeführt wird.



## 7 Literaturverzeichnis

**Akiyama, Y.:** TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites, *Internet:* <http://www.rwcp.or.jp/papia/>.

**Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.:** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215 (3), 403 (1990).

**Alvarez, J., Gulf, C.L., Lu, X.-H. und Smyth, D.R.:** Terminal flower: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2, 10 (1992).

**Andreoli, J.M., Jang, S.I., Chung, E., Coticchia, C.M., Steinert, P.M. und Markova, N.G.:** The expression of a novel, epithelium-specific ets transcription factor is restricted to the most differentiated layers in the epidermis. *Nucleic Acids Res* 25(21), 4287 (1997).

**Aravind, L. und Landsman, D.:** AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 26(19), 4413 (1998).

**Ashley, C.T., Pendleton, C.G., Jennings, W.W., Saxena, A. und Glover, C.V.:** Isolation and sequencing of cDNA clones encoding *Drosophila* chromosomal protein D1. A repeating motif in proteins which recognize at DNA. *J Biol Chem* 264(14), 8394 (1989).

**Aukerman, M.J. und Amasino, R.M.:** Floral induction and florigen. *Cell* 93 (4), 491 (1998).

**Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R.:** New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20 (6), 1195 (1992).

**Bernier, G.:** The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 39, 175 (1988).

**Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. und Lejeune, P.:** Physiological Signals That Induce Flowering. *Plant Cell* 6, 1147 (1993).

**Blazquez, M.A., Soowal, L.N., Lee, I. und Weigel, D.:** LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* 124(19), 3835 (1997).

**Bowman, J.L., Alvarez, J., D., W., E.M., M. und Smyth, D.R.,** Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 119, 721 (1993).

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

**Bradley, D., Carpenter, R., Copley, L., Vincent, C., Rothstein, S. und Coen, E.:** Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* 379(6568), 791 (1996).

- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. und Coen, E.:** Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275(5296), 80 (1997).
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T. und Dobberstein, B.:** A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins in vivo and in vitro. *Methods Enzymol* 155, 416 (1987).
- Cardon, G.H., Frey, M., Saedler, H. und Gierl, A.:** Mobility of the maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J* 3 (6), 773 (1993).
- Cardon, G.H., Höhmann, S., Nettessheim, K., Saedler, H. und Huijser, P.:** Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* 12 (2), 367 (1997).
- Carpenter, R. und Coen, E.S.:** Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev* 4 (9), 1483 (1990).
- Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Doyle, S., Magrath, R. und Coen, E.:** Control of flower development and phyllotaxy by meristem identity genes in *Antirrhinum*, *Plant Cell* 7(12), 2001 (1995).
- Carpenter, R. und Coen, E.S.:** Transposon induced chimeras show that floricaula, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. *Development* 121 (1), 19 (1995).
- Casadaban, M.J. und Cohen, S.N.,** Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*, *J Mol Biol* 138 (2), 179 (1980).
- Chailakhyan, M.K.,** *C. R. (Dokl.) Acad. Sci. USSR*, 13, 79 (1936).
- Chou, P.Y. und Fasman, G.D.:** Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem* 47, 251 (1978).
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. und Carpenter, R.:** floricaula: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63 (6), 1311 (1990).
- Coen, E.S. und Meyerowitz, E.M.:** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353(6339), 31 (1991).
- Colasanti, J., Yuan, Z. und Sundaresan, V.:** The indeterminate gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in maize. *Cell* 93 (4), 593 (1998).
- Cremer, F., Havelange, A., Saedler, H. und Huijser, P.:** Environmental control of flowering time in *Antirrhinum majus*. *Physiologia plantarum* 104(3), 345 (1998).
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. und Sommer, H.:** Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *Embo J* 15(16), 4330 (1996).
- Deng, X.-W., Casper, T. und Quail, P.H.:** *COPI*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*., *Genes Dev* 5, 1172 (1991).

- Dickey, L.F., Gallo-Meagher, M. und Thompson, W.F.:** Light regulatory sequences are located within the 5' portion of the Fed- 1 message sequence. *Embo J* 11 (6), 2311 (1992).
- Dingwall, C. und Laskey, R.A.:** Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem Sci* 16(12), 478 (1991).
- Eneva, T.:** Etablierung eines Genübertragungssystems für *Antirrhinum majus*. *Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.* (1995).
- Fried, M. und Crothers, D.M.:** Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9(23), 6505 (1981).
- Friedmann, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y. und Reeves, R.:** Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res* 21(18), 4259 (1993).
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. und Robson, B.:** Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 120 (1), 97 (1978).
- Geierstanger, B.H., Volkman, B.F., Kremer, W. und Wemmer, D.E.:** Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA. *Biochemistry* 33(17), 5347 (1994).
- Gerber, H.P., Seipel, K., Georgiev, O., Hofferer, M., Hug, M., Rusconi, S. und Schaffner, W.:** Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263(5148), 808 (1994).
- Goto, K. und Meyerowitz, E.M.:** Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev* 8, 1548 (1994)
- Gottesman, S., Halpern, E. und Trisler, P.:** Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 148 (1), 265 (1981).
- Grasser, K.D.:** Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins. *Plant J* 7 (2), 185 (1995).
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C. und Lin, C.,** Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279(5355), 1360 (1998).
- Gupta, R., Webster, C.I. und Gray, J.C.:** The single-copy gene encoding high-mobility-group protein HMG-I/Y from pea contains a single intron and is expressed in all organs. *Plant Mol Biol* 35 (6), 987 (1997).
- Gupta, R., Webster, C.I., Walker, A.R. und Gray, J.C.:** Chromosomal location and expression of the single-copy gene encoding high-mobility-group protein HMG-I/Y in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 34 (3), 529 (1997).
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B. und Yanofsky, M.F.:** Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* 76 (1), 131 (1994).

**Han, J.H. und Rutter, W.J.:** Lambda gt22, an improved lambda vector for the directional cloning of full-length cDNA. *Nucleic Acids Res* 15(15), 6304 (1987).

**Hantke, S.S., Carpenter, R. und Coen, E.S.:** Expression of *floricaula* in single cell layers of periclinal chimeras activates downstream homeotic genes in all layers of floral meristems. *Development* 121 (1), 27 (1995).

**Haughn, G.W., Schultz, E.A. und Martinez-Zapater, J.M.:** The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristems, morphogenesis, and mutants. *Can J Bot* 73, 959 (1995).

**Heidmann, I., Efremova, N., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z.:** A protocol for transformation and regeneration of *Antirrhinum majus*. *Plant J* 13 (5), 723 (1998).

**Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A., Podkolodny, N.L. und Kolchanov, N.A.:** Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26 (1), 362 (1998).

**Huijser, P., Klein, J., Lönning, W.E., Meijer, H., Saedler, H. und Sommer, H.:** Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *Embo J* 11 (4), 1239 (1992).

**Inamdar, N.M., Ehrlich, K.C. und Ehrlich, M.:** CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. *Plant Mol Biol* 17 (1), 111 (1991).

**Jack, T., Fox, G.L. und Meyerowitz, E.M.:** *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell* 76 (4), 703 (1994).

**Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M. und Okamoto, J.K.:** Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 6 (9), 1211 (1994).

**Kelly, A.J., Bonlander, M.B. und Meeks-Wagner, D.R.:** *NFL*, the tobacco homolog of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell* 7 (2), 225 (1995).

**Kempin, S.A., Savidge, B. und Yanofsky, M.F.:** Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267(5197), 522 (1995).

**Klein, J.P.:** Molekulargenetische Untersuchungen zum Übergang vom vegetativen zum reproduktivem Wachstum bei *Antirrhinum majus*. *Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.* (1994).

**Klein, J., Saedler, H. und Huijser, P.:** A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol Gen Genet* 250 (1), 7 (1996).

**Koncz, C. und Schell, J.:** The promoter of TI-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204, 383 (1986).

- Koornneef, M., Rolff, E. und Spruit, C.J.P.:** Genetic control of light inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Z Pflanzenphysiol* 100, 147 (1980).
- Korfhage, U., Trezzini, G.F., Meier, I., Hahlbrock, K. und Somssich, I.E.:** Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen defense-related gene. *Plant Cell* 6 (5), 695 (1994).
- Kozak, M.:** Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* 9(20), 5233 (1981).
- Kruger, J., Aichinger, C., Kahmann, R. und Bolker, M.:** A MADS-box homologue in *Ustilago maydis* regulates the expression of pheromone-inducible genes but is nonessential. *Genetics* 147 (4), 1643 (1997).
- Laemmli, U.K.:** Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 (1970).
- Laux, T., Seurinck, J. und Goldberg, R.B.:** A soybean embryo cDNA encodes a DNA binding protein with histone and HMG-protein-like domains. *Nucleic Acids Res* 19(17), 4768 (1991).
- Lee, I., Aukerman, M. J., Gore, S. L., Lohman, K. N., Michaels, S. D., Weaver, L. M., John, M. C., Feldmann, K. A. und Amasino, R. M.:** Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6(1), 75 (1994).
- Lund, T., Dahl, K.H., Mork, E., Holtlund, J. und Laland, S.G.:** The human chromosomal protein HMG I contains two identical palindrome amino acid sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 146 (2), 725 (1987).
- Ma, H.:** To be, or not to be, a flower-control of floral meristem identity. *Trends Genet* 14 (1), 26 (1998).
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C. und Dean, C.:** *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 89 (5), 737 (1997).
- Maher, J.F. und Nathans, D.:** Multivalent DNA-binding properties of the HMG-I proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13), 6716 (1996).
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. und Yanofsky, M.F.:** Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360(6401), 273 (1992).
- Mandel, M.A. und Yanofsky, M.F.:** A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377(6549), 522 (1995).
- Martinez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C. und Koornneef, M.K.:** The transition to flowering in *Arabidopsis*. In *Arabidopsis*. Herausgegeben von E.M. Meyerowitz und C.R. Somerville. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1994).
- Marusyk, R. und Sergeant, A.:** A simple method for dialysis of small-volume samples, *Anal Biochem* 105 (2), 403 (1980).

- McNellis, T.W., von Arnim, A.G., Araki, T., Komeda, Y., Misera, S. und Deng, X.W.:** Genetic and molecular analysis of an allelic series of *cop1* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell* 6 (4), 487 (1994).
- Meijer, H., Huijser, P. und Saedler, H.:** Phase transition and inflorescence development in *Antirrhinum majus*. *Flowering Newsletter* 20, 37 (1995).
- Meijer, A.H., van Dijk, E.L. und Hoge, J.H.:** Novel members of a family of AT hook-containing DNA-binding proteins from rice are identified through their *in vitro* interaction with consensus target sites of plant and animal homeodomain proteins. *Plant Mol Biol* 31 (3), 607 (1996).
- Meijer, J.A.:** Phase transition and inflorescence development in *Antirrhinum majus*. *Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln*. (1996).
- Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P.J., Maler, B.A., Okret, S., Wikstroem, A.-C., Gustafsson, J.-A. und Yamamoto, K.R.:** Genetic complementation to a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 46, 389 (1986).
- Nakai, K. und Kanehisa, M.:** A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14 (4), 897 (1992).
- Nicolás, F.J., Cayuela, M.L., Martínez-Argudo, I.M., Ruiz-Vazquez, R.M. und Murillo, F.J.:** High mobility group I(Y)-like DNA-binding domains on a bacterial transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6881 (1996).
- Nieto-Sotelo, J., Ichida, A. und Quail, P.H.:** Positive Factor 1 (PF1) from oat is an HMG-Y- and H1 histone-like protein that binds a functionally defined AT-rich DNA element in the oat phytochrome A gene (PHYA3) promoter, *Nucleic Acids Res* 22 (6), 1115 (1994B).
- Nieto-Sotelo, J., Ichida, A. und Quail, P.H.:** PF1: an A-T hook-containing DNA binding protein from rice that interacts with a functionally defined d(AT)-rich element in the oat phytochrome A3 gene promoter, *Plant Cell* 6 (2), 287 (1994A).
- Odell, J.T., Nagy, F. und Chua, N.H.:** Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313(6005), 810 (1985).
- Oettgen, P., Alani, R.M., Barcinski, M.A., Brown, L., Akbarali, Y., Boltax, J., Kunsch, C., Munger, K. und Libermann, T.A.:** Isolation and characterization of a novel epithelium-specific transcription factor, ESE-1, a member of the ets family. *Mol Cell Biol* 17 (8), 4419 (1997).
- Ohshima, S., Murata, M., Sakamoto, W., Ogura, Y. und Motoyoshi, F.:** Cloning and molecular analysis of the *Arabidopsis* gene *TERMINAL FLOWER 1*. *Mol Gen Genet* 254 (2), 186 (1997).
- Pabo, C.O. und Sauer, R.T.:** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61, 1053 (1992).
- Pabst, R.:** Charakterisierung des Promotors von *FLORICAULA*, einem Blütenmeristem-identitätsgen aus *Antirrhinum majus* (Löwenmäulchen). *Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln*. (1995).



- Perbal, M.C., Haughn, G., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Z.:** Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 122(11), 3433 (1996).
- Poethig, R.S.:** Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250, 923 (1990).
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. und Coupland, G.:** The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors, *Cell* 80 (6), 847 (1995).
- Raikhel, N.,** Nuclear Targeting in Plants, *Plant Physiol* 100, 1627 (1992).
- Reeves, R. und Nissen, M.S.:** The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265(15), 8573 (1990).
- Riechmann, J.L. und Meyerowitz, E.M.:** MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* 378(10), 1079 (1997).
- Rotino, G.L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H. und Spena, A.:** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol* 15(13), 1398 (1997).
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. und Somssich, I.E.:** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo J* 15(20), 5690 (1996).
- Sachs, R.M. und Hackett, W.P.:** Source-sink relationships and flowering. *in: Strategies of plant reproduction, ed. W.J. Meudt.,* Allanheld, Osmum Publishing (1983).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.:** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).
- Sandhu, J.S., Webster, C.I. und Gray, J.C.:** A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Mol Biol* 37 (5), 885 (1998).
- Schick, R.:** Über einige für den Pflanzenzüchter interessante Mutanten von *Antirrhinum majus*. *Züchter* 5, 30 (1934).
- Schneuwly, S., Kuroiwa, A., Baumgartner, P. und Gehring, W.J.,** *EMBO J*, 5, 733 (1986).
- Schultz, E.A. und Haughn, G.W.:** Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development* 119, 745 (1993).
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. und Sommer, H.:** Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250, 931 (1990).
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P.J., Hansen, R., Tetens, F., Lonig, W.E., Saedler, H. und Sommer, H.:** Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *Embo J* 11 (1), 251 (1992).

- Schwechheimer, C., Smith, C. und Bevan, M.W.:** The activities of acidic and glutamine-rich transcriptional activation domains in plant cells: design of modular transcription factors for high-level expression. *Plant Mol Biol* 36 (2), 195 (1998).
- Shannon, S. und Meeks-Wagner, D.R.:** A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell*, 3, 877 (1991).
- Siino, J.S., Nissen, M.S. und Reeves, R.:** Replacement of conserved threonines by alanine residues in high mobility group protein HMG-I(Y): effect on DNA binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun* 207 (2), 497 (1995).
- Simon, R., Igeno, M.I. und Coupland, G.:** Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384(6604), 59 (1996).
- Singh, H., Clerc, R.G. und LeBowitz, J.H.:** Molecular cloning of sequence-specific DNA binding proteins using recognition site probes. *Biotechniques* 7 (3), 252 (1989).
- Sommer, H., Beltran, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.E., Saedler, H. und Schwarz-Sommer, Zs.:** Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *Embo J* 9 (3), 605 (1990).
- Stubbe, H.,** Genetik und Zytologie von *Antirrhinum* L. sec. *Antirrhinum*. VEB Gustav Fischer Verlag (1966).
- Stüber, D., Matile, H. und Garotta, G.:** System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In: *Immunological Methods*, Lefkovits, I. and Pernis, B., eds. IV(Academic Press, New York), 121 (1990).
- Sung, Z.R., Belachew, A., Shunong, B. und Bertrand-Garcia, R.:** *EMF*, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science* 258, 1645 (1992).
- Theissen, G. und Saedler, H.:** MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Curr Opin Genet Dev* 5 (5), 628 (1995).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.:** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22), 4673 (1994).
- Tjaden, G. und Coruzzi, G.M.,** A novel AT-rich DNA binding protein that combines an HMG I-like DNA binding domain with a putative transcription domain, *Plant Cell*, 6 (1), 107 (1994).
- Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönnig, W.E., Saedler, H., Sommer, H. und Schwarz-Sommer, Zs.:** *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *Embo J* 11 (13), 4693 (1992).
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. und Schell, J.:** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability, *Nature* 252(5479), 169 (1974).

- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. und Meyerowitz, E.M.:** *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*, *Cell* 69 (5), 843 (1992).
- Weigel, D. und Meyerowitz, E.M.:** The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78 (2), 203 (1994).
- Weigel, D. und Nilsson, O.:** A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377(6549), 495 (1995).
- Wilson, R.N., Heckman, J.W. und Somerville, C.R.:** Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days, *Plant Physiol* 100, 403 (1992).
- Wisman, E., Cardon, G.H., Fransz, P. und Saedler, H.:** The behaviour of the autonomous maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol Biol* 37 (6), 989 (1998).
- Yamamoto, S. und Minamikawa, T.:** Two genes for the high mobility group protein HMG-Y are present in the genome of *Canavalia gladiata* D.C. *Plant Mol Biol* 33 (3), 537 (1997).
- Yang, C.H., Chen, L.J. und Sung, Z.R.:** Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: role of the *EMF* genes. *Dev Biol* 169 (2), 421 (1995).
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. und Meyerowitz, E.M.:** The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35 (1990).
- Young, R.A. und Davis, R.W.:** Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science* 222(4625), 778 (1983).
- Zagotta, M.T., Shannon, S., Jacobs, C. und Meeks-Wagner, D.R.,** Early-flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*, *Aust. J. Genet.*, 19, 411 (1992).



## 8 Anhang

### 8.1 cDNA-Sequenzen

#### *Antirrhinum* SAP2-cDNA

```

1  GTAATGGAGCTCAACAACAACAACGACGGCAACAACCTCTACTACCACCAACCACAGCTCCACCACCAAAAATCCTCCACC 80
1  M E L N N N N D G N N S Y Y H Q P Q L H H Q N P P P 26

81  AAACGCCGTCGCTTCGTCTCCGGCGAACGGCGGTGTTGTTGTACCCAACAGTACAACCAACAACAGCAGCGGGATAGTGT 160
27  N A V A S S P A N G G V V V P N S T T N N S S G I V Y 53

161  ACCCTCACTCCGTACCTTCATCGGCAGCTGTTTCAGCTCCGATCGAGAGCGTGAAGAGGAAGAGAGAAAGACCTAGAAAG 240
54  P H S V P S S A A V S A P I E S V K R K R G R P R K 79

241  TACGGTACGCCGAGCAAGCGGCGCGGGAAGAGACTGTACCCGTCAACTGTGCCGCCGAGGAAGAGAGATACTGTTGG 320
80  Y G T P E Q A A A A K R L S P S T V P P R K R D T V G 106

321  TGCTGCTACTTCTGCTGCTAGTGTGTGGCTTCTGGTTCGTCGTTTCGTCGAAGAAATCGCAGCTTTTAGCGTTTGGCA 400
107  A A T S A A S V V A S G S S V S S K K S Q L L A F G N 133

401  ATGTGGCCAAAGCTTCAGTCCATCATTACTGTCTGCTGGAGAAGATGTTGGTCAAAAATCATGATGTTTATG 480
134  V G Q S F S P H I I T V A A G E D V G Q K I M M F M 159

481  CAACAGAGCAAAACATGAATTATGCGTTATCTCAGCATCCGGATCAGTTTCCAATGCAACTCTACGCCAGCCGGCAACATC 560
160  Q Q S K H E L C V I S A S G S V S N A T L R Q P A T S 186

561  TGGGGGCAGCATCACATATGAGGGGCGATTGACATCCTCTCTCTGCTGATCTTACATTCGTAAGTCAACTCGGAGGAA 640
187  G G S I T Y E G R F D I L S L S G S Y I R T E L G G R 213

641  GAGCTGGTGGACTCAGTGTGTGTCTGTCTAGTTCTGATGGCCAAATATTGGCGGTGGAGTAGCTGGACCTTTACAGCC 720
214  A G G L S V C L S S S D G Q I I G G G V A G P L T A 239

721  GCAGCCCCAATTCAGTAATTGTTCGGAACATTTCTCATTGATACCAAAAAGGATGCTAAAGGCAATGCATCTTCTGGCAA 800
240  A A P I Q V I V G T F L I D T K R D A K G N A S S G K 266

801  GTTAACATCACCAGTTGGCGGGGCATCAGTCCCAGTTTAAAGCTTCATGTCACAACCTGTTGATTCTTCTCATCAAACGG 880
267  L T S P V G G A S V P G L S F M S Q P V D S S H Q T G 293

881  GCGGTGGTAGTCCATTCTGATTTCAGCACCAGGGCATGCAGATGACGCCCAACATTCGATGGACTGGAGAGGCAACAAC 960
294  G G S P F L I Q H R G M Q M T P Q H S M D W R G N N 319

961  TCTCATGGTATGCACCAATCTCCTGAAAATGGTACTATGAGCACATCACTGACTAGAGAAACGTCGTAATAATCATCTGA 1040
320  S H G M H Q S P E N G D Y E H I T D * 338

1041  TTATGGGTATCGCTCGAAGTTGAGGGACATTGCTCATAGACTATGCAGCACAGTACAGTAGTGTACAGGTTACAGCTTAT 1120

1121  GTTTGTGATTAGCAGCTGGTAAATATTATTCTGGATGTAACCTAACCTTCTCTATCGGTGCGATTTTGTCTCTTGT 1200

1201  TTTGTTTATTATTAACATCCCATCAGGTATTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1252

```

*Antirrhinum* SAP3-cDNA

```

1   CTTGTTGTCAATGGAACCTCAATAACAACAACAATGACGGAGGTGGACTCGCCTCTTACTACCGATTCCAACCTCCGCAA 80
1   M E L N N N N N D G G G L A S Y Y Q F Q P P Q N 24

81  ACGCCGTCGTTTCATCTCCGACGAATGGAAGTGTGTACCCAACAACAGCACCACCGAATGGTGTACCCTCACTCCGTG 160
25  A V V S S P T N G S V V P N N S T T G M V Y P H S V 50

161 CCGGTTTCTGCGCCGATGGAGAGCGTGAAGAGGAAGAGAGGAAGGCCTAGAAAAGTACGGCACGCCGGAGCAAGCGGCGGC 240
51  P V S A P M E S V K R K R G R P R K Y G T P E Q A A A 77

241 GGCCAAGAGAATGTCGACGGCGCCGCGGAGGAAGAGAGAAGTTCCGGCGGTGCTGCTGTAGCGGCGGCGGTGTTGGTT 320
78  A K R M S T A P P R K R E V P A V A A V S G G G V G S 104

321 CTGGTTCGTCGGTTTCTTCTTATTTCGTCGAAGAAATCGCAGCTTGCTGGTTTGGCGGTGTGGGGCAAAGCTTCAGTCCT 400
105 G S S V S S Y S S K K S Q L A G F G G V G Q S F S P 130

401 CACATCATCACTGTAGCTGGTGGAGAAGATGTTGGCCAAAAAATCATGATGTTTATGCAACAGAGCAAACGTGAAATATG 480
131 H I I T V A G G E D V G Q K I M M F M Q Q S K R E I C 157

481 CATTATCTCAGCATCTGGATCAGTTTCTAATGCTTCTTACGGCAGCCGGCAACATCTGGGGCAGTGTACATATGAGG 560
158 I I S A S G S V S N A S L R Q P A T S G G S V T Y E G 184

561 GCCGATTTGACATCCTCTCTGTCTGGATCTTACATCCGTACGGAACATGGAGGAAGAACTGGAGGACTCAGTGTGTGT 640
185 R F D I L S L S G S Y I R T E H G G R T G G L S V C 210

641 CTGTCTAGTCTGATGGTCAAGTTATGGTGGTGGAGTCGGCGGACCTCTTACAGCTGCGAGTCTATACAGTAATAGT 720
211 L S S S D G Q V I G G G V G G P L T A A S P I Q V I V 237

721 TGGAACATTTCTTATTGATGTCAAGAAGGATACCAAAGCGATGCTGCCCCAGGCAAGTTACCATCACCAATTAGCGGGG 800
238 G T F L I D V K K D T K G D A A P G K L P S P I S G G 264

801 GATCAGCTCCAGTTTAAAGCTTCCGGTCACCTGTTGATTCTCCTCATCAAACGGGCATTGAAATCCGTTTCTGGTTCAG 880
265 S A P G L S F R S P V D S P H Q T G I G N P F L V Q 290

881 CACCAGAGCATGCAGATGAATCTCCACATCAATGGAATGGAGAGCAACGTCGGACATGGTATGCACCAATCTCCTGA 960
291 H Q S M Q M N S P H S M E W R G N V G H G M H Q S P E 317

961 AAATGGCGACTTTGACCACATCACTGACTAGAAAATTGTTGGTTTTGTGCGGCGTTGAGGTACATTTCATTCGTCGACTCT 1040
318 N G D F D H I T D * 327

1041 GCGGTACAATATGGTAGTGTACAGATGACAGGTTACATGTTACAGTGTATGTTTTGATACTTTTATTCTGGATGTACTT 1120

1121 ACTATCTTATAATCTTTGAATCTCCTATCCTGGCGTTGCTGCTTAGACTTTTTCAGCAGTGGCAACCTGGTAAGGATCT 1200

1201 GTTACATGAAATGGGTGTGTATCCAAACAGTGGTGGATATGGGATGGCCTTGCTAAAAGATGGCTGGTGAGTTTACTTT 1280

1281 TTATTCTAATGATTTAAGAATGTTTGTCTAGCCAAATTTCAAATGAAAACCTTATGAAAATGTAATTTTTCAGCCGTC 1360
1361 AGTGTTTTTCAGCATGAAAAGTTGAGTTTACGCCATAAGATGGCGGATGCTGGAGCAAAANTCATCGGTGGCTGCTGT 1440

1441 CGGACAACGCCCTGTACAGTTCGATCGATATCTAAAGTCTTGAAGGAGAGAACTTGATTTCTTTTCCAGACTTAGATTAG 1520

1521 TTGGTTAATTTCACTACATTTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1600
1601 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1623

```

## 8.2 Oligonucleotidsequenzen

Nr.	Sequenz 5'→3'	Verwendung
27	GAG TTT TGT GCA GAT TTT ATG	5'-Primer für die <i>FLO</i> -Promotorregion-Fragmente (-213/-94), (-213/-164) und (-213/-143)
30	GGG TGT GGG GTG CTT TTA AAG	3'-Primer für das <i>FLO</i> -Promotorregion-Fragment (-213/-94)
67	GTT TCA TGG GAA AAT TAC ACC	3' Primer für <i>FLO</i> Promotorregion-Fragment
68	GGG TTT TGT GTT TAT TTT GGG	3' Primer für <i>FLO</i> Promotorregion-Fragment
75	CAC GAG GAA AAT CTA GAA ATC CAA TGG	5'Primer für die Klonierung von <i>SAP1</i> in pHyg35S enthält eine <i>XbaI</i> -Schnittstelle
76	CTG TAC TCT AGA GTA TTG TAT TGC AG	3'Primer für die Klonierung von <i>SAP1</i> in pHyg35S enthält eine <i>XbaI</i> -Schnittstelle
77	CTC TAT TCT AGA TAT TTG AAG ATG GAC TCA C	5'Primer für die Klonierung von <i>HMR1</i> in pHyg35S; enthält eine <i>XbaI</i> -Schnittstelle
78	CTC ATC CTA ATC TAG ACA GTA CCT CCT ACA G	3'Primer für die Klonierung von <i>HMR1</i> in pHyg35S; enthält eine <i>XbaI</i> -Schnittstelle
101	AAT CCC CAA ATC CCA TGG AAC AAC	5'Primer für die Klonierung von <i>SAP1</i> in pQE60; enthält eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle für eine <i>in frame</i> -Klonierung in pQE 60
102	GAT GCA ATA GGA TCC ATC TGG GAT GTG	3'Primer für die Klonierung von <i>SAP1</i> in pQE60; enthält eine <i>BamHI</i> -Schnittstelle für eine <i>in frame</i> -Klonierung in pQE 60
103	GCT TCA GTC TCC ATG GCT TCT TCG AAG	5'Primer für die Klonierung des für den C-Terminus kodierenden Teils von <i>SAP1</i> in pQE60; enthält eine <i>NcoI</i> Schnittstelle für eine <i>in frame</i> Klonierung
104	CGA TTT CTT GGA TCC AGC CGA CGA GAC	3'Primer für die Klonierung des für den N-Terminus kodierenden Teils von <i>SAP1</i> in pQE60; enthält eine <i>BamHI</i> Schnittstelle für eine <i>in frame</i> Klonierung

109	CAG ATA TTT GAC CAT GGA CTC ACA AC	5'Primer für die Klonierung von <i>HMR1</i> in pQE60; enthält eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle für eine <i>in frame</i> -Klonierung in pQE 60
110	CAA CTC TTC CAT GGA TTG GGG CTG AGG	3'Primer für die Klonierung von <i>HMR1</i> in pQE60; enthält eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle für eine <i>in frame</i> -Klonierung in pQE 60

### 8.3 Fachbegriffe

Bandshift	Retardierungsexperiment (EMSA)
Insert	DNA-Fragment, das in ein Plasmid kloniert wird
Screening	Durchsuchen
Stretch	Bereich auf DNA oder Protein
Florale Transition	Übergang zwischen vegetativem und generativem Wachstum

### 8.4 Nomenklatur von Genen und Genprodukten

Wildtyp-Gen	kursive Großbuchstaben	<i>DEFICIENS</i> , abgekürzt <i>DEF</i>
mutiertes Gen	kursive Kleinbuchstaben	<i>deficiens</i> , abgekürzt <i>def</i>
Protein	Großbuchstaben	DEFICIENS, abgekürzt DEF

### 8.5 Abkürzungen

A	Adenin
AS	Aminosäure
AT-DNA	AT-reiche DNA
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	bovine serum albumin



---

C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	complementary DNA oder copy DNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assay
G	Guanin
h	Stunde(n)
http	hyper text transfer protocol, wird für den Zugang zu Internetseiten benutzt
i. e. S.	im engeren Sinne
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
$\lambda$	Lambda
mRNA	messenger RNA
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy = Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie
N-terminal	Amino-terminal
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulphate, englisch für Natriumdodecylsulfat bzw. Natriumlaurylsulfat
ssp.	Subspezies
s. u.	siehe unten
T	Thymin
U	Unit
üN	über Nacht
UTR	untranslated region
Wt	Wildtyp
WWW	World wide web (Internet)

---

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Winfried Hofmann, 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 noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Heinz Saedler betreut worden.

Winfried Hofmann

---

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

Mein Dank gilt Prof. Dr. Heinz Saedler für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Prof. H. Bothe danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Dr. Peter Huijser möchte ich für die Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Dr. Günter Theißen möchte ich für die herzliche Aufnahme in seinem Labor danken, als ‘uns die Hütte abgefackelt war’.

Darüber hinaus gilt auch all’ den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus der Abteilung Saedler, die zu der hervorragenden Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

---

## Lebenslauf von Winfried Hofmann

- geboren am 03.05.67 in Frankfurt am Main
- 1973-'77 Besuch der Grundschule in St. Ingbert/Saar
- 1977-'81 Besuch des Gymnasiums in St. Ingbert
- ab 1981 Gymnasium in Köln-Mülheim, Abitur Juni 1986
- August '86- April '88 Zivildienst. Danach bis zum Studienbeginn verschiedene Aushilfstätigkeiten
- Oktober '88 Aufnahme des Studiums der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Vordiplom 1990
- Juli 1993 mündliche Diplomprüfung
- ab September 1993 Diplomarbeit im Labor von Prof. Kleinig am Lehrstuhl für Zellbiologie der Uni Freiburg
- Diplom im Juli 1994
- ab September 1994 Dr.-Arbeit in der Abteilung für Molekulare Pflanzengenetik am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung unter der Leitung von Prof Saedler