

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 5

1.1 Meristeme 5

1.2 Etablierung des Sproßmeristems: Musterbildungsprozesse während Embryogenese und vegetativer Phase..... 5

1.2.1 *WUSCHEL* und die *CLAVATA*-Gene: Balance zwischen Stamzellschicksal und Differenzierung..... 6

1.2.2 Musterbildung in der apikalen Domäne des Embryos 7

1.2.3 Musterbildung im Blütenmeristem10

1.2.3.1 Kontrolle der Organidentität – Das ABC-Modell der Blütenentwicklung...10

1.2.3.2 Etablierung und Kontrolle der Expressionsmuster der ABC-Gene13

1.3 Zielsetzung der Arbeit.....19

2 Material und Methoden 21

2.1 Verwendete Materialien21

2.1.1 Chemikalien.....21

2.1.2 Enzyme.....21

2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Medien21

2.1.4 Bakterienstämme.....21

2.1.5 Hefestämme22

2.1.6 Plasmide22

2.1.7 Oligonukleotide.....25

2.1.8 Verwendete Pflanzenlinien.....26

2.1.9 Elektronische Datenverarbeitung.....28

2.2 Genetische Methoden.....28

2.2.1 Pflanzenanzucht28

2.2.2 *In planta* –Transformation von *Arabidopsis thaliana*.....28

2.2.3 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*29

2.3 Molekularbiologische Methoden29

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren.....29

2.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA29

2.3.1.2	Präparation von genomischer DNA	29
2.3.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	30
2.3.2	Molekularbiologische Standardmethoden	30
2.3.3	Konstruktion der Plasmide	30
2.3.3.1	<i>UFO</i> -Promotor-Deletionsderivate.....	30
2.3.3.2	Plasmide für Hefe-1-Hybrid-Experimente	33
2.3.4	Hefe-1-Hybrid System	34
2.3.4.1	Integration von Reporterkonstrukten ins Genom von <i>S.cerevisiae</i>	35
2.3.4.2	Paarung zweier Hefestämme	35
2.3.4.3	Identifizierung von transaktivierenden Hefeklonen mittels HIS/3AT- Selektion und in vivo- β -Gal-Färbung	35
2.3.4.4	Amplifikation der Arabidopsis-cDNAs aus Hefeklonen.....	36
2.4	Histologische Techniken	36
2.4.1	Nicht-radioaktive RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung	36
2.4.2	Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität (GUS-Färbung).....	36
2.5	Mikroskopische Techniken	37
2.5.1	Nomarsky-Mikroskopie.....	37
2.5.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Identifikation von Regulatoren der <i>UFO</i> -Expression durch Mutagenese von transgenen <i>UFO::GFP</i> -Pflanzen	38
3.1.1	Linie P17-08: Transgeninaktivierung und Kosuppression des <i>UFO</i> -Gens.....	40
3.1.2	Linie P72-10 – kein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Verlust der GFP- Expression	41
3.1.3	Linie P98-13 und Linie P106-23 – Transgeninaktivierung und Kosuppression des <i>UFO</i> -Gens	43
3.1.4	Linie P54-01 – ein neues Allel von <i>WUSCHEL</i>	45
3.1.5	Zusammenfassung der Mutagenese	46
3.2	Untersuchungen zur Rolle von <i>WUS</i> bei der Aktivierung von <i>UFO</i>	47
3.2.1	In <i>wus-1</i> Mutanten wird <i>UFO</i> nicht exprimiert	47
3.2.1.1	<i>In situ</i> -Hybridisierungen.....	48
3.2.1.2	GFP-Fluoreszenz (<i>UFO::GFP</i> x <i>wus-1</i>)	48

3.2.2	Durch <i>WUS</i> -Überexpression (<i>35S::WUS-GR</i>) wird <i>UFO</i> -Expression im Meristem verstärkt aktiviert	49
3.2.2.1	<i>WUS</i> aktiviert <i>UFO</i> -Expression im Sproßmeristem	50
3.2.2.2	Aktivierung der <i>UFO</i> -Expression durch <i>WUS</i> in Wurzeln	51
3.2.2.3	Aktivierung der <i>UFO</i> -Expression durch <i>WUS</i> -Fehlexpression in Blüten....	53
3.2.2.4	In <i>clv3</i> -mutanten Infloreszenzmeristemen wird <i>UFO</i> ektopisch exprimiert	55
3.2.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
3.2.3	Aktiviert <i>STM</i> die Expression von <i>UFO</i> ?	56
3.2.3.1	In <i>stm-5</i> -Mutanten wird <i>UFO</i> nicht exprimiert	56
3.2.3.2	Ektopische Expression von <i>STM</i> reicht nicht aus, um <i>UFO</i> in allen Geweben zu aktivieren.....	57
3.2.3.3	<i>STM</i> ist kein direkter Aktivator der <i>UFO</i> -Expression.....	58
3.3	Regulation der <i>UFO</i> -Expression durch <i>cis</i> -Sequenzen	59
3.3.1	Suche nach regulatorischen Elementen anhand von Sequenzdaten.....	59
3.3.1.1	Vergleich <i>UFO</i> -Promotor/Brassica- <i>UFO</i> -Promotor-Sequenz	60
3.3.1.2	Vergleich <i>UFO</i> -Promotor/ <i>FIM</i> -Promotor	60
3.3.1.3	Datenbanksuchen nach bekannten Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven	61
3.3.2	Deletionsanalyse des <i>UFO</i> -Promotors	66
3.3.2.1	<i>MHUF01</i> , <i>MHUF0D1</i> und <i>MHUF0D2</i> zeigen das wildtypische Muster .	67
3.3.2.2	<i>MHUF0D3</i> verliert Expression in Blüten nach Stadium 3	68
3.3.2.3	<i>MHUF0D4</i> verliert Expression in Blüten vollständig.....	70
3.3.2.4	<i>MHUF0D5</i> zeigt dasselbe Expressionsmuster wie <i>MHUF0D4</i>	70
3.3.2.5	Die Sequenz zwischen –2307 und –1841 ist notwendig für <i>UFO</i> -Expression in Blüten (<i>MHUF0DeID3-D4</i>).....	71
3.3.2.6	<i>MHUF0D3F9</i> : Ist die Sequenz zwischen –2307 und –1841 ausreichend, um <i>UFO</i> -Expression in Blüten zu aktivieren?.....	72
3.3.2.7	<i>MHUF0D6</i> , <i>MHUF0D7</i> und <i>MHUF0D8</i> : keine Expression.....	73
3.3.2.8	<i>MHUF0D5A</i> zeigt einen Teilverlust des Sprossmeristemusters; <i>MHUF0D5C</i> und <i>MHUF0D5D</i> zeigen keine Expression	74
3.3.2.9	Fusionen von Promotorfragmenten mit dem <i>CaMV35S</i> -Minimalpromotor und der –100bp-Region des <i>UFO</i> -Promotors zeigen keine Expression.....	76
3.3.2.10	Das “Sproßelement” ist redundant (<i>MHUF0DeID5-D6A</i>)	76

3.3.2.11	<i>MHUFODelD3-D6A</i> zeigt dasselbe Muster wie <i>MHUFODelD3-D4</i>	77
3.3.2.12	Zusammenfassung der Deletionsanalyse.....	77
3.3.3	Hefe-1-Hybrid-Experimente.....	79
1.	Screen mit der Teilsequenz zwischen -1241 bis -1058.....	80
2.	Screen mit der Teilsequenz zwischen -1362 und -1058.....	81
4	Diskussion.....	84
4.1	EMS-Mutagenese von <i>UFO::GFP</i> -Pflanzen	84
4.2	Regulation der <i>UFO</i> -Expression durch <i>WUS</i> und <i>STM</i>	85
4.2.1	In <i>wus</i> -Mutanten wird <i>UFO</i> nicht exprimiert.....	85
4.2.2	<i>WUS</i> kann <i>UFO</i> -Expression aktivieren, benötigt dafür aber meristematische Kofaktoren.....	86
4.2.3	<i>WUS</i> kann <i>UFO</i> -Expression auch in der Wurzel aktivieren.....	87
4.2.4	Indirekte Aktivierung der <i>UFO</i> -Expression durch <i>WUS</i> -Fehlexpression in Blüten	89
4.2.5	<i>STM</i> aktiviert <i>UFO</i> -Expression indirekt.....	90
4.3	Konservierte Sequenzbereiche in den Promotoren von <i>UFO</i> , <i>BoUFO</i> und <i>FIM</i>	91
4.4	Die Deletionsanalyse zeigt, daß der <i>UFO</i> -Promotor modular aufgebaut ist.....	92
4.4.1	Kontrolle der <i>UFO</i> -Expression in Blütenmeristemen durch cis-Elemente.....	93
4.4.2	Kontrolle der <i>UFO</i> -Expression im Sproßmeristem durch cis-Elemente	95
5	Zusammenfassung.....	97
6	Literatur.....	99

1 Einleitung

1.1 Meristeme

Die Organogenese höherer Pflanzen erfolgt fortlaufend – durch den gesamten Lebenszyklus hindurch – ausgehend von kleinen Gruppen spezialisierter Zellen, den Meristemen, welche an Sproß- und Wurzelspitze lokalisiert sind. Sproß- und Wurzelmeristem werden während der Embryogenese angelegt und beinhalten in ihrem Zentrum eine Gruppe von Stammzellen. Untersuchungen der Zellteilungsrate führten zur Feststellung, daß das Sproßmeristem in drei funktionale Subdomänen, die zentrale Zone, die periphere Zone und die Rippenzone unterteilt werden kann (Steeves und Sussex, 1989; Laufs et al., 1998). Während in der peripheren Zone massive Zellproliferation stattfindet und Organprimordien angelegt werden, wird in der zentralen Zone das Reservoir pluripotenter Stammzellen aufrechterhalten. Diese Stammzellen teilen sich kontinuierlich, aber langsamer als Zellen in der peripheren Zone. Ihre Tochterzellen ersetzen die durch Organbildung verlorenen Zellen der peripheren Zone. Die Rippenzone liegt in den tieferen Zellschichten des Meristems und bildet das innere Sproßgewebe.

Eine weitere Unterteilung des Sproßmeristems kann anhand seiner Zusammensetzung aus drei klonal distinkten Zelllagen, nämlich der epidermalen Zelllage (L1), der subepidermalen Zelllage (L2), die zusammen die Tunika bilden und dem Korpus (L3), gemacht werden (Satina et al., 1940). Die Tatsache, daß sich periphere Zone, zentrale Zone und auch die lateralen Organe aus allen drei Zelllagen zusammensetzen, weist darauf hin, daß Kommunikation zwischen den Zelllagen für die Koordinierung von Entwicklungsprozessen notwendig ist (Satina und Blakeslee, 1941).

1.2 Etablierung des Sproßmeristems: Musterbildungsprozesse während Embryogenese und vegetativer Phase

Das Sproßmeristem wird – wie oben erwähnt – in der Embryogenese angelegt und seine Aktivität wird durch den gesamten Lebenszyklus der Pflanze aufrechterhalten. Die Expressionsmuster einer Vielzahl von Genen werden im embryonalen Sproßmeristem schrittweise angelegt und bis zum Keimlingsstadium vollständig etabliert. Danach

erscheinen die Expressionsmuster statisch (Brand et al., 2001), das heißt sie bleiben im weiteren Verlauf der Entwicklung der Pflanze weitgehend unverändert. Viele dieser Gene kodieren Transkriptionsfaktoren. Subdomänen des Sproßmeristems können also über die spezifische Expression unterschiedlicher Kombinationen von Transkriptionsfaktoren definiert werden. Verschiedene Studien mit genetischen Mosaiken konnten zeigen, daß das Schicksal meristematischer Zellen nicht durch ihre Herkunft, sondern durch ihre Position bestimmt wird (Poethig, 1989; Irish, 1993). Welche Gene vermitteln diese positionale Information und wie tragen sie zur Etablierung und Aufrechterhaltung der verschiedenen funktionalen Domänen des Sproßmeristems bei?

1.2.1 *WUSCHEL* und die *CLAVATA*-Gene: Balance zwischen Stammzellschicksal und Differenzierung

Das *WUSCHEL* (*WUS*) Gen kodiert einen Homödomänen-Transkriptionsfaktor und wird bereits im 16-Zell-Stadium in subepidermalen Zellen der apikalen Hälfte des Embryos exprimiert (Mayer et al., 1998). Während der Entwicklung des embryonalen Sproßmeristems wird die *WUS*-Expression domäne schrittweise in tiefere Schichten des Meristems verlagert und ist im Keimlingsstadium schließlich auf wenige Zellen unterhalb der äußersten Schicht der L3 beschränkt. Diese Dynamik läßt vermuten, daß Zell-Zell-Interaktionen bei der Festlegung des *WUS*-Expressionsmusters eine Rolle spielen.

Tatsächlich wird die Expression von *WUS* durch die Aktivität des *CLAVATA*-Signaltransduktionswegs transkriptionell reprimiert und damit die Expressionsdomäne auf wenige Zellen in der L3 beschränkt (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000): Stammzellen sekretieren das Signalpeptid *CLAVATA3* (*CLV3*) (Fletcher et al., 1999; Rojo et al., 2002), das durch Bindung einen Signalkomplex, der unter anderem die LRR-Rezeptorkinase *CLAVATA1* (*CLV1*) und das Rezeptorprotein *CLAVATA2* (*CLV2*) (Jeong et al., 1999) enthält, aktiviert. Dieser Signalkomplex ist in der L3 der zentralen Zone lokalisiert. Die Expression von *CLV3* und *CLV1* beginnt im Herz-Stadium der Embryogenese und wird im Sproßmeristem durch den gesamten Lebenszyklus der Pflanze aufrechterhalten (Clark et al., 1997; Long et al., 1998; Fletcher et al., 1999).

Die Aktivierung hat zur Folge, daß *WUS* über eine bislang unbekannte Signalkaskade transkriptionell reprimiert wird. Da *WUS* das Stammzellschicksal in Zellen, die oberhalb seiner Expressionsdomäne liegen, fördert (Mayer et al., 1998) und diese Zellen durch die

Sekretion von CLV3 die Aktivität von WUS reprimieren, kommt es zu einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Förderung und Repression des Stammzellschicksals. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß die zentrale Zone stets eine gleichbleibende Anzahl von Stammzellen enthält (Übersichtsartikel: Waites und Simon, 2000).

1.2.2 Musterbildung in der apikalen Domäne des Embryos

Für die Etablierung des Sproßmeristems ist auch das *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* Gen von entscheidender Bedeutung. In homozygoten *stm*-Mutanten wird kein funktionelles Sproßmeristem etabliert (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). In reifen *stm*-Embryonen sind die apikalen Zellen differenziert und das Sproßmeristem fehlt. Im Keimlingsstadium sind zusätzlich die Kotyledonen an der Basis fusioniert. *STM* kodiert einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, dessen DNA-bindende Homöodomäne hohe Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne von *knotted1* aus Mais aufweist (Long und Barton, 1996). Genetische und molekulare Analysen haben gezeigt, daß *STM* in der zentralen Zone des Meristems notwendig ist, um Zelldifferenzierung zu unterbinden und ein Sproßmeristem-spezifisches Programm zu initiieren (Long und Barton, 1998).

Mutationen in *WUS* verstärken schwache *stm*-Allele, während starke *stm*-Allele epistatisch über *wus* sind (Endrizzi et al., 1996). Das weist darauf hin, daß *STM* und *WUS* unabhängig voneinander in verschiedenen Regulationsmechanismen wirken. In *stm*-mutanten Embryos wird *WUS*-Expression normal aktiviert, geht in späteren Stadien der Embryogenese aber wieder verloren (Mayer et al., 1998).

Die Entwicklung funktioneller Domänen in der apikalen Hälfte des Embryos wurde anhand der Etablierung der Expressionsmuster von Markergenen untersucht. Die Expression der Gene *STM*, *CUP SHAPED COTYLEDON1 (CUC1)*, *CUP SHAPED COTYLEDON2 (CUC2)* und *AINTEGUMENTA (ANT)* beginnt mit dem globulären Stadium der Embryogenese (Long und Barton, 1998; Takada et al., 2001; Aida et al., 1999) in der apikalen Hälfte des Embryos. Im frühen Transitions-Stadium der Embryogenese unterteilen die Expressionsdomänen dieser Gene den apikalen Teil des Embryos in Subdomänen (Abb. 1.1): In der zentralen Region, wo das Sproßmeristem entsteht, werden *STM*, *CUC1* und *CUC2* exprimiert. Die periphere Region unterteilt sich in zwei Subdomänen: Im Bereich, aus dem die Kotyledonenprimordien entstehen, wird *ANT* exprimiert. Zwischen den

Kotyledonenprimordien befindet sich eine Region, in der Zellteilungen unterdrückt werden und die Kotyledonen voneinander abgegrenzt werden. Hier werden *ANT*, *STM*, *CUC1* und *CUC2* exprimiert. Im Torpedo-Stadium wird die Expression von *CUC1* und *CUC2* auf die Grenzregion zwischen den Kotyledonenprimordien beschränkt und ist im Sproßmeristem nicht mehr vorhanden. Die Expressionsmuster von *STM* und *CUC1/2* sind dann komplementär. Dieser Prozeß ist abhängig von der Funktion von *STM*, da *CUC2* in *stm*-Mutanten dieses Stadiums weiterhin im Zentrum exprimiert wird (Aida et al., 1999).

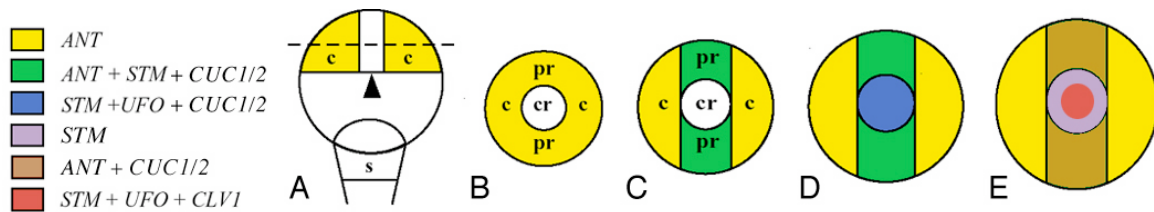


Abb. 1.1: Etablierung der Expressionsmuster von *STM*, *ANT*, *CUC1/2*, *UFO* und *CLV1* während früherer Stadien der Embryogenese. Schematische Darstellung der Etablierung von Expressionsmustern zwischen dem globulären Stadium und dem Herzstadium der Embryogenese. **A:** globulärer Embryo; Seitenansicht. **B-E:** Querschnitte entlang der in **A** dargestellten unterbrochenen Linie. **A, B:** globuläres Stadium: *ANT* wird in einem die zentrale Region (cr) umgebenden Ring in der peripheren Region (pr) exprimiert. **C:** Transitionsstadium: *ANT*, *CUC1/2* und *STM* werden in der peripheren Region exprimiert. **D:** frühes Herz-Stadium: *STM*, *CUC1/2* und *ANT* werden in einem durchgehenden Streifen in der zentralen und peripheren Region zwischen den Kotyledonenprimordien exprimiert. Im Zentrum setzt *UFO*-Expression ein. **E:** Torpedo-Stadium: Die Expressionsdomänen von *STM* und *CUC1/2* sind komplementär. *UFO* und *CLV1* werden innerhalb der *STM*-Expressionsdomäne exprimiert. (s): Suspensor; (c): Kotyledonenprimordium. Abbildung modifiziert nach Long und Barton, 1998.

Die Expression von *STM* ist wiederum abhängig von der Funktion von *CUC1* und *CUC2*; in *cuc1/cuc2*-Doppelmutanten wird *STM* nicht exprimiert (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001). Ektopische Expression von *CUC1* unter Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus (*CaMV35S*-Promotor) führt zu ektopischer Expression von *STM*. Dafür wird *CUC2* nicht benötigt. *CUC1* kann also *STM*-Expression allein aktivieren und ist damit ein positiver Regulator von *STM* (Hibara et al., 2003). In *cuc1/cuc2*-Doppelmutanten fehlt das Sproßmeristem und die Kotyledonen sind fusioniert (Aida et al., 1997). Das läßt auf eine Funktion in der Separation der Kotyledonen schließen. *cuc1*- und *cuc2*-Einzelmutanten sind nahezu wildtypisch; vereinzelt treten einseitig fusionierte Kotyledonen und fusionierte Blütenorgane auf. Außerdem ist *CUC1* in *cuc2*-Mutanten

exprimiert und umgekehrt. *CUC1* und *CUC2* können somit als funktionell redundante Proteine bezeichnet werden, die für die Etablierung des Sproßmeristems und die Separation der Kotyledonen notwendig sind. *CUC1* und *CUC2* kodieren zwei homologe NAC-Transkriptionsfaktoren, die eine hohe Ähnlichkeit zum NO APICAL MERISTEM (NAM)-Protein aus *Petunia* aufweisen, das unter anderem für die Etablierung des Sproßmeristems während der Embryogenese notwendig ist (Souer et al., 1996).

Im frühen Herz-Stadium wird die Expression des *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*-Gens im präsumptiven Sproßmeristem initiiert. Das Expressionsmuster ist während der Embryogenese dynamisch; ausgehend von wenigen Zellen im Zentrum der *STM*-Expressionsdomäne dehnt sich *UFO*-Expression im Verlauf des späten Herz- und Torpedo-Stadiums zu einer tassenförmigen Domäne im Zentrum des Sproßmeristems aus (Long und Barton, 1998). Die Aktivierung der *UFO*-Expression ist dabei abhängig von *STM*; in *stm*-mutanten Embryonen wird *UFO* nicht exprimiert. Die Tatsache, daß *UFO* nicht in allen Zellen der *STM*-Expressionsdomäne exprimiert wird und die Dynamik des Expressionsmusters sprechen allerdings für die Existenz weiterer, bislang unbekannter Faktoren als Aktivatoren der *UFO*-Expression im Sproßmeristem.

Im reifen Embryo sind die Expressionsmuster der beschriebenen Markergene etabliert. Während der vegetativen und reproduktiven Phase wird die Expression dieser Gene in einem relativ statischen Muster aufrechterhalten: *WUS* wird in wenigen Zellen unterhalb der äußersten Zellschicht der L3 im Zentrum des Sproßmeristems exprimiert (Mayer et al., 1998). *STM*-Expression findet sich im gesamten Meristem mit Ausnahme von Organprimordien (Long et al., 1996). *CUC1* und *CUC2* markieren die Grenzbereiche zwischen Sproßmeristem und Organprimordien (Ishida et al., 2000; Takada et al., 2001). *ANT* wird in Organprimordien exprimiert (Elliott et al., 1996; Klucher et al., 1996). *UFO* wird in einer tassenförmigen Domäne im Sproßmeristem exprimiert (Ingram et al., 1995; Lee et al., 1997; Samach et al., 1999). *CLV1*-Expression findet sich in der L3 im Zentrum des Sproßmeristems (Clark et al., 1997) und *CLV3* wird in den Stamzellen an der Spitze des Meristems exprimiert (Fletcher et al., 1999).

Die Expressionsdomänen der beschriebenen Gene werden – mit leichten Modifikationen – auch in Blütenmeristemen etabliert, wo sie eine ähnliche Funktion wie im Sproßmeristem ausüben. Sie repräsentieren somit generelle Musterelemente von Sproß- und Blütenmeristemen. Einige dieser Gene haben noch eine zusätzliche Funktion bei der

Musterbildung in Blüten. Auf ihre Funktion in der Blütenentwicklung wird im nächsten Kapitel eingegangen.

1.2.3 Musterbildung im Blütenmeristem

1.2.3.1 Kontrolle der Organidentität – Das ABC-Modell der Blütenentwicklung

Die Blüten von *Arabidopsis* bestehen aus Organen, die in vier konzentrischen Wirteln angeordnet sind. Im äußersten, ersten Wirtel finden sich vier Sepalen (Kelchblätter), im zweiten vier Petalen (Blütenblätter), im dritten sechs Stamen (Staubblätter) und im Zentrum, dem vierten Wirtel, zwei Karpelle (Fruchtblätter) (Abb. 1.2; A, B). Blütenmeristeme werden nach der Blühinduktion an den Flanken des Infloreszenzmeristems angelegt und durchlaufen eine Serie von Entwicklungsstadien, wobei die Blütenorgane sukzessive von außen nach innen angelegt werden (Smyth et al., 1990). Wie wird dieses Muster etabliert und welche Gene spielen dabei eine Rolle? Das Studium homöotischer Mutanten konnte erste Einblicke in die Regulation der Organidentität und die grundlegenden Musterbildungsprozesse liefern. In homöotischen Blütenmutanten sind Blütenorgane zweier nebeneinanderliegender Wirtel durch Organe anderer Wirtel ersetzt. So sind zum Beispiel in *apetala3*-Mutanten die Petalen des zweiten Wirtels durch Sepalen ersetzt und die Stamen des dritten Wirtels durch Karpelle (Bowman et al., 1989). Das heißt, daß Organe sich zwar normal entwickeln, aber am falschen Ort. Homöotische Blütenmutanten sind seit langer Zeit bekannt. In den späten 1980er Jahren führten genetische und molekulare Analysen solcher Mutanten von *Arabidopsis* und *Antirrhinum* in den Arbeitsgruppen von E. S. Coen, E. M. Meyerowitz und H. Saedler zur Etablierung des kombinatorischen ABC-Modells der Blütenentwicklung (Coen und Meyerowitz, 1991).

Dieses Modell besagt, daß die Entwicklung der vier Organtypen von drei teilweise überlappenden Funktionen bestimmt wird. Dabei ist jede der Funktionen in zwei benachbarten Wirteln aktiv: Die A-Funktion ist für die Identität der Organe im ersten und zweiten Wirtel zuständig, die B-Funktion für die Organe des zweiten und dritten Wirtels und die C-Funktion für die Organe des dritten und vierten Wirtels. Die alleinige Aktivität der A-Funktion im ersten Wirtel bewirkt die Produktion von Sepalen, die gemeinsame Aktivität von A- und B-Funktion im zweiten Wirtel die Produktion von Petalen. Im dritten

Wirtel werden durch die B- und C-Funktion Stamen gebildet und im vierten Wirtel durch die alleinige Aktivität der C-Funktion Karpelle (Abb. 1.2; C).

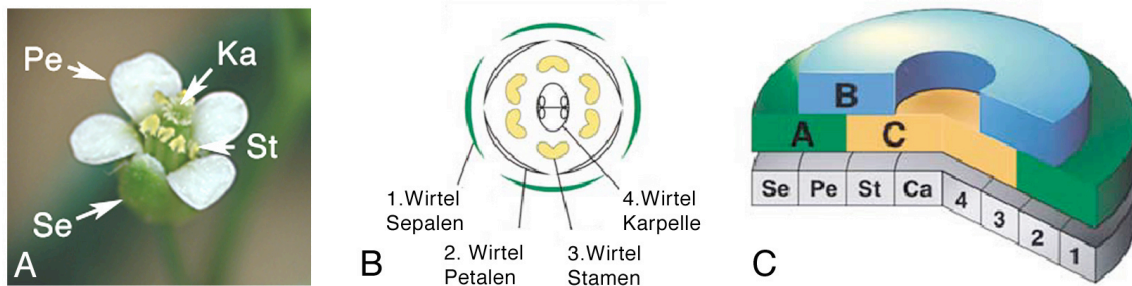


Abb. 1.2: Organidentität in der Arabidopsis-Blüte. A: reife Arabidopsis-Blüte mit Sepalen (Se), Petalen (Pe), Stamen (St) und Karpellen (Ka). B: Blütendiagramm mit Angabe der Wirtel. C: Schematische Darstellung der A-, B- und C-Funktionsdomänen. Abbildung modifiziert nach Lohmann und Weigel, 2002.

Eine weitere wichtige Aussage des Modells ist, daß sich die A-Funktion und die C-Funktion gegenseitig reprimieren. Das erschließt sich aus den Phänotypen von A- und C-Funktions-Mutanten. Bei einem Ausfall der A-Funktion werden im ersten Wirtel Karpelle und im zweiten Wirtel Stamen gebildet. Dies läßt sich durch eine Ausdehnung der C-Funktion in die ersten beiden Wirtel erklären. Ein Verlust der C-Funktion führt zur Produktion von Petalen im dritten und Sepalen im vierten Wirtel, was durch eine Ausdehnung der A-Funktion in den dritten und vierten Wirtel erklärt werden kann. Zusätzlich wird die Blüte indeterminiert und produziert weitere Wirtel der entsprechenden Organe. Die B-Funktion ist unabhängig von der A- und der C-Funktion; das heißt sie wird nicht durch die A- oder C-Funktion reguliert. Bei B-Funktionsverlust-Mutanten sind die Petalen des zweiten Wirtels durch Sepalen ersetzt, die Stamen des dritten Wirtels durch Karpelle (Übersichtsartikel: Lohmann und Weigel, 2002). Welche Gene repräsentieren diese Funktionen?

Die A-Funktion wird in *Arabidopsis* durch *APETALA1* (*AP1*) (Mandel et al., 1992) und *APETALA2* (*AP2*) (Jofuku et al., 1994) repräsentiert, die B-Funktion durch *APETALA3* (*AP3*) (Jack et al., 1992) und *PISTILLATA* (*PI*) (Goto et al., 1993) und die C-Funktion durch *AGAMOUS* (*AG*) (Yanofsky et al., 1990). Mit Ausnahme von *AP2* kodieren all diese Gene MADS-Box-Transkriptionsfaktoren und werden in genau den Domänen exprimiert, in denen ihre Aktivität nach dem ABC-Modell vorhergesagt ist (Riechmann et al., 1997). Das läßt darauf schließen, daß die Regulation der ABC-Gene hauptsächlich auf

transkriptioneller Ebene stattfindet. Diese Annahme wurde durch Fehlexpressionsexperimente in transgenen Pflanzen weiter bestätigt: Mit Ausnahme von *API*, das eine zusätzliche Funktion als Blütenmeristemidentitätsgen hat, führte die Fehlexpression aller ABC-Gene zu den erwarteten Phänotypen. So bildeten zum Beispiel Blüten von Pflanzen, in denen *AP3* und *PI* gemeinsam in der gesamten Blüte exprimiert wurden, Petalen im ersten Wirtel und Stamen im vierten Wirtel (Krizek und Meyerowitz, 1996).

Kombinierter Funktionsverlust aller ABC-Gene führt dazu, daß sämtliche Blütenorgane durch Blätter ersetzt sind (Bowman und Meyerowitz, 1991). Dies bestätigt die bereits 1790 von Johann Wolfgang von Goethe formulierte Annahme, daß Blütenorgane modifizierte Blätter darstellen (Goethe, 1790). Allerdings reicht die Fehlexpression von ABC-Genen in der gesamten Pflanze nicht aus, Blätter in Blütenorgane zu konvertieren (Mizukami und Ma, 1992; Krizek und Meyerowitz, 1996). Die Vermutung lag nahe, daß außer den ABC-Genen weitere Faktoren für die Transformation von Blättern in Blütenorgane benötigt werden. Die Analyse der MADS-Box-Transkriptionsfaktoren *SEPALLATA1* (*SEP1*), *SEPALLATA2* (*SEP2*) und *SEPALLATA3* (*SEP3*) beantwortete die Frage nach diesen Faktoren. In Pflanzen mit einem Funktionsverlust aller drei *SEPALLATA*-Gene sind alle Blütenorgane in Sepalen konvertiert (Pelaz et al., 2000). Fehlexpression von *SEP3* zusammen mit *API*, *PI* und *AP3* konvertiert Blätter in Petalen (Pelaz et al., 2001). Gemeinsame Fehlexpression von *SEP3*, *AP3* und *AG* transformiert Blätter in Stamen, (Honma und Goto, 2001) und Fehlexpression von *AG* und *SEP3* zusammen kann Blätter in Karpelle umwandeln (Goto et al., 2001).

Diese Beobachtungen führten zusammen mit Untersuchungen von Interaktionen der ABC-Proteine (Egea-Cortines et al., 1999) zur Formulierung eines Modells, das beschreibt, wie die ABC-Gene auf molekularer Basis die Transkription ihrer Zielgene aktivieren (Übersichtsartikel: Theissen und Saedler, 2001). Nach diesem Modell binden Tetramere aus unterschiedlichen Kombinationen von ABC- und SEP-Proteinen an MADS-Box-Bindungsmotive, sogenannte CARG-Boxen (Schwarz-Sommer et al., 1992; Wynne und Treisman, 1992; Huang et al., 1993; Shiraishi et al., 1993), in den Promotoren ihrer Zielgene und aktivieren so deren Transkription. Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung dieses Modells.

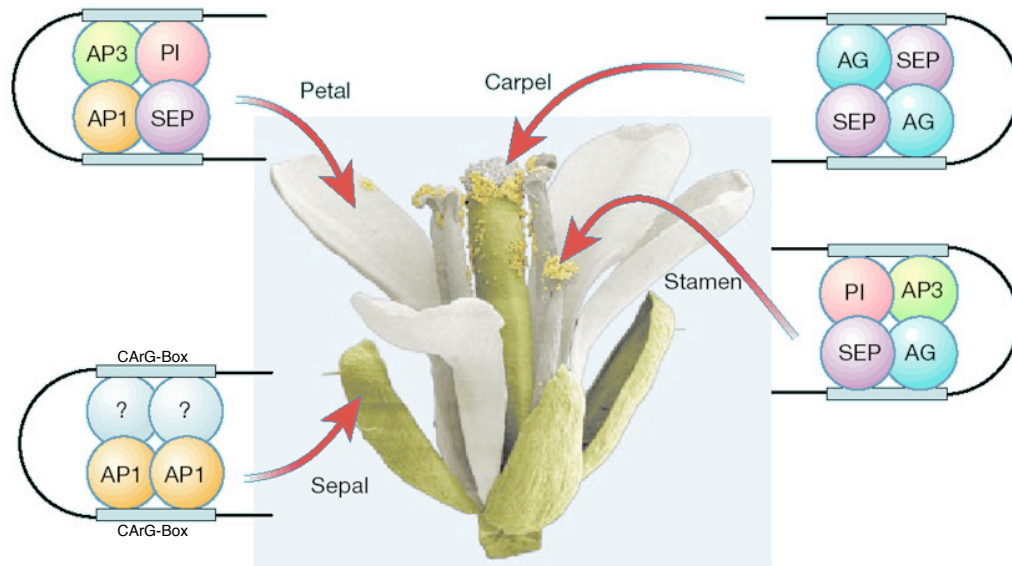


Abb. 1.3: Modell der Aktivierung von Zielgenen der ABC-Gene. Tetramere aus unterschiedlichen Kombinationen von ABC- und SEP-Proteinen binden an CARG-Boxen in den Promotoren ihrer Zielgene und aktivieren so deren Transkription. Abbildung modifiziert nach Theissen und Saedler, 2001.

Die Kombination von ABC- und SEP-Proteinen ist dabei davon abhängig, in welcher räumlichen Domäne welche ABC-Gene exprimiert werden. Wenn die Kontrolle der Organidentität also vornehmlich durch die räumliche Kontrolle der Expression der ABC-Gene bestimmt wird, welche Faktoren definieren dann diese Expressionsdomänen?

1.2.3.2 Etablierung und Kontrolle der Expressionsmuster der ABC-Gene

Die Initiation von Blütenmeristemen – und damit die Expression der ABC-Gene – erfolgt nach der Blühinduktion. Das *LEAFY (LFY)* Gen ist essentiell für die Identität der Blütenmeristeme und integriert endogene und Umweltsignale, die den Zeitpunkt der Blühinduktion steuern (Blazquez und Weigel, 2000). *LFY* kodiert einen Transkriptionsfaktor und könnte somit direkt für die Expression der ABC-Gene verantwortlich sein (Weigel et al., 1992). Dafür spricht, daß die Expression einiger ABC-Gene in *lfy*-Mutanten stark reduziert ist oder ganz fehlt. Die Blüten sind teilweise durch Spross-ähnliche Strukturen ersetzt oder zeigen einen B-Funktionsverlust-Phänotyp. *LFY*-Expression setzt in Blütenanlagen ein, bevor diese beginnen, auszuwachsen und ist in

Blütenprimordien der Stadien 1-3 (Stadien der Blütenentwicklung nach Smyth et al., 1990) in allen Zellen nachweisbar (Blazquez et al., 1997).

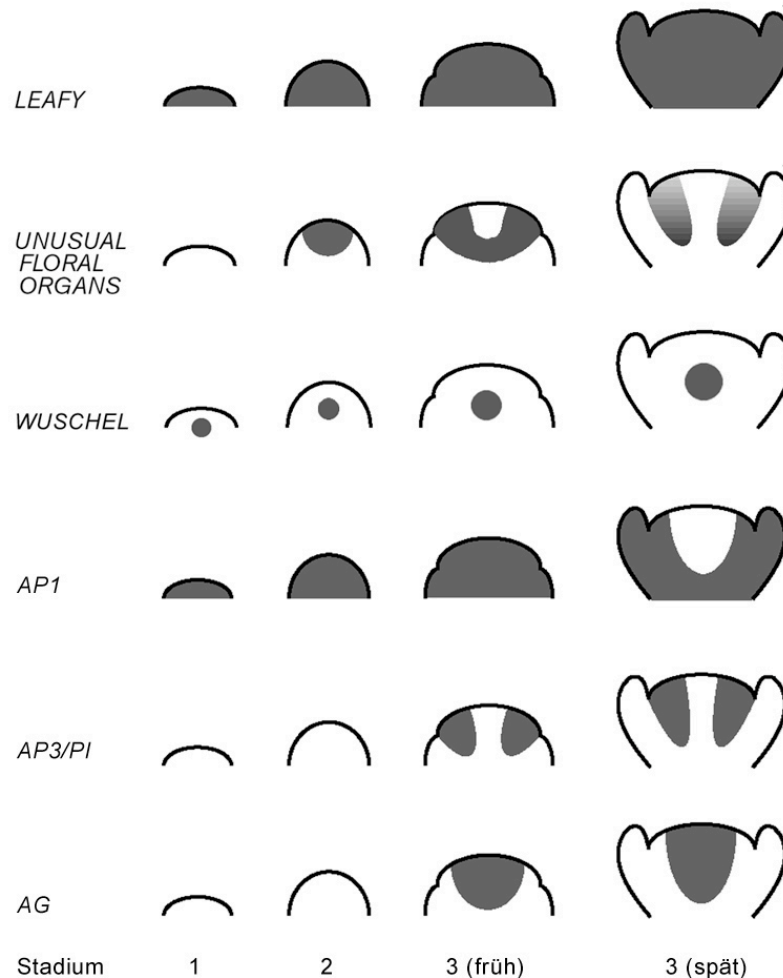


Abb. 1. 4: Expressionsmuster von *LEAFY*, *UFO*, *WUS* und den ABC-Genen in Blütenprimordien der Stadien 1-3. Schematische Darstellung der Expressionsmuster. Die Expressionsdomänen von *AP1*, *AP3*, *PI* und *AG* sind Teildomänen der *LFY*-Expressionsdomäne. Expression von *AP3* und *PI* setzt im frühen Stadium 3 ein und liegt komplett in der *UFO*-Expressionsdomäne. Eine detaillierte Beschreibung der Expressionsmuster findet sich im Text. Abbildung modifiziert nach Ng und Yanofsky, 2000.

Die wildtypischen Expressionsdomänen der ABC-Gene sind in diesen Stadien Teildomänen der *LFY*-Expressionsdomäne (siehe Abb. 1.4): *AP1*-Expression setzt kurz nach Beginn der *LFY*-Expression im Stadium 1 ein und wird bis zum frühen Stadium 3 im gleichen Muster exprimiert. Danach wird *AP1*-Expression durch die reprimierende Aktivität von *AG* auf die äußeren beiden Wirtel beschränkt. Die Expression von *AP3* und

PI beginnt im frühen Stadium 3 und beschränkt sich auf den präsumptiven zweiten und dritten Wirtel. *AG*-Expression setzt ebenfalls im frühen Stadium 3 im Zentrum der Blüte, also im präsumptiven dritten und vierten Wirtel, ein.

1.2.3.2. Aktivierung der A-Funktion durch *LFY*

Erste Hinweise auf eine Aktivierung der ABC-Gene durch *LFY* lieferten Fehlexpressionsexperimente, in denen *LFY* unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors konstitutiv und ektopisch exprimiert wurde. Das hatte einerseits zur Folge, daß die Blühinduktion verfrüht stattfand (Weigel und Nilsson, 1995), andererseits wurde das A-Funktions-Gen *API* in diesen Pflanzen ektopisch exprimiert (Parcy et al., 1998). Weitere Experimente konnten zeigen, daß die Aktivierung der *API*-Expression durch *LFY* wahrscheinlich direkt ist. So ist gezeigt worden, daß induzierte *35S::LFY-GR*-Überexpression die Expression von *API* auch dann aktivieren kann, wenn die Proteinsynthese durch Cycloheximid-Zugabe blockiert ist (Wagner et al., 1999). Allerdings tragen außer *LFY* wahrscheinlich weitere, redundante Faktoren zur Aktivierung der *API*-Expression bei. Das beruht auf der Beobachtung, daß in *lfy*-mutanten Pflanzen noch eine *API*-Restexpression in einigen Blüten zu beobachten ist (Liljegren et al., 1999).

1.2.3.2. Aktivierung der C-Funktion durch *LFY* und *WUS*

Auch bei der Aktivierung der B- und C-Funktionsgene spielt *LFY* eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, daß *LFY in vitro* an regulatorische Sequenzen im zweiten Intron des *AG*-Gens bindet (Busch et al., 1999). Diese *LFY*-Bindungsmotive sind essentiell für das wildtypische *AG*-Expressionsmuster. Außerdem führte die Expression einer konstitutiv aktiven Version von *LFY* (*LFY-VP16*; Fusion mit der viralen Aktivierungsdomäne *VP16*) zu *AG*-Überexpressionsphänotypen in Blüten (Parcy et al., 1998), was auf eine Aktivierung der *AG*-Expression durch *LFY* hinweist. Da *AG* aber nur in einem Teil der *LFY*-Expressionsdomäne exprimiert wird, müssen bei der Etablierung der *AG*-Expressionsdomäne weitere, regionspezifische Kofaktoren eine Rolle spielen.

Dabei wird (wie bei der Festlegung der Expressionmuster von *AP3* und *PI*; siehe weiter unten) auf generelle Musterelemente von Meristemen zurückgegriffen (Parcy et al., 1998; Lohmann et al., 2001; Lenhard et al., 2001): Wie im Sproßmeristem wird das

Stammzellschicksal in Blüten durch den *CLV/WUS*-Signaltransduktionsweg reguliert. *WUS*-Expression setzt im Zentrum von Blütenprimordien des Stadium 1 ein (Mayer et al., 1998). Die *WUS*-Expressionsdomäne verbleibt auch in Stadium 2 und 3 im Zentrum der Blüte, dort wo später *AG*-Expression einsetzt (Abb. 1.4).

Obwohl die wenigen Blüten von *wus*-Mutanten Stamen produzieren können (Laux et al., 1996), ist *WUS* für wildtypische *AG*-Expression notwendig: In transgenen Pflanzen, in denen *WUS*-Expression schwächer ist als im Wildtyp (*UFO::CLV3*; Brand et al., 2000) ist auch die *AG*-Expressionsdomäne kleiner. Zusätzlich führte ektopische Expression von *WUS* in Blüten unter Kontrolle des *AP3*- bzw. des *LFY*-Promotors zu ektopischer *AG*-Expression. Letztendlich konnte gezeigt werden, daß das *WUS*-Protein in direkter Nachbarschaft zu den *LFY*-Bindungsmotiven an regulatorische Sequenzen im zweiten Intron des *AG*-Gens bindet und damit ein direkter Aktivator der *AG*-Expression ist (Lohmann et al., 2001).

1.2.3.2. Aktivierung der B-Funktion durch *LFY* und *UFO*

Wie oben bereits erwähnt, zeigen die Blüten von *lfy*-Mutanten teilweise einen B-Funktionsverlust-Phänotyp; das heißt, daß die Petalen des zweiten Wirtels durch Sepalen und die Stamen des dritten Wirtels durch Karpelle ersetzt sind (Weigel et al., 1992). Das spricht für eine Rolle von *LFY* bei der Aktivierung von *AP3* und *PI*. Da *LFY* in frühen Entwicklungsstadien im gesamten Blütenmeristem, *AP3* und *PI* jedoch in scharf abgegrenzten Domänen im präsumptiven zweiten und dritten Wirtel exprimiert werden, wurde davon ausgegangen, daß für die Spezifizierung des *AP3*- und *PI*-Expressionsmusters Co-Regulatoren benötigt werden, die die positionale Information für die Expression der B-Funktionsgene liefern. Erste Hinweise auf eine Interaktion von *LFY* mit regionsspezifischen Co-Regulatoren bei der Aktivierung der B-Funktionsgene ergaben sich aus der Untersuchung der Rolle des *UFO*-Gens und seines Orthologs aus *Antirrhinum*, *FIMBRIATA* (Simon et al., 1994; Ingram et al., 1995 und 1997), in der Blütenentwicklung. *ufo*-Mutanten zeigen vor der Blühinduktion keinen vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp. Nach der Blühinduktion zeigen *ufo*-Mutanten einen Phänotyp, der verschiedene Aspekte von Meristem- und Organidentitätsmutanten aufweist (Levin und Meyerowitz, 1995; Wilkinson und Haughn, 1995). Die ersten Blüten werden häufig durch Ko-Floreszenzen ersetzt, deren Sproßmeristeme in einigen Fällen mit der Produktion einer

terminalen Blüte aus Sepalen und Karpellen ihre Aktivität einstellen. Später initiierte Blüten zeigen eine Reihe homöotischer Transformationen, die für einen Verlust der Aktivität der B-Funktion sprechen. Während Sepalen und Karpelle im ersten und vierten Wirtel wildtypisch sind, werden Petalen und Stamen teilweise durch Sepalen und Karpelle oder chimäre Organe aus Sepalen-, Petalen- und Karpellgewebe ersetzt. Häufig sind im zweiten und dritten Wirtel filamentöse Organe vorhanden, die teilweise miteinander fusioniert sind. (Abb. 1. 5). Auch die Anzahl der Organe im zweiten und dritten Wirtel variiert und erreicht selten die wildtypische Anzahl. Zusätzlich scheint die gewirtelte Anordnung gestört zu sein. Vereinzelt sind ganze Blüten durch filamentöse Strukturen ersetzt. Aus dem mutanten Phänotyp wurde geschlossen, daß *UFO* nicht nur die Organidentität im zweiten und dritten Wirtel kontrolliert, sondern auch die Organisation und Identität von Blütenmeristemen.

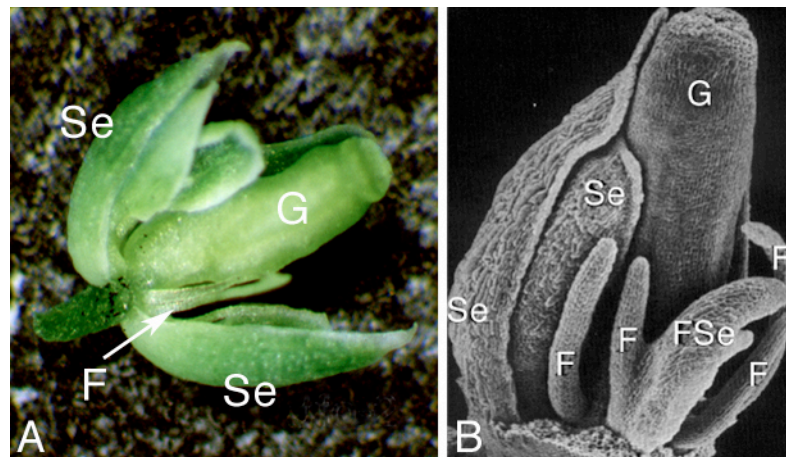


Abb. 1.5: Blütenphänotyp von *ufo-2*-Mutanten. Petalen und Stamen des zweiten und dritten Wirtels sind durch eine variable Anzahl von Sepalen und filamentösen Organen ersetzt. **A:** Seitenansicht einer *ufo-2*-mutanten Blüte. **B:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer *ufo-2*-mutanten Blüte. (Bowman, 1994) (F): filamentöses Organ; (Fse): Mosaikorgan aus Filament und Sepale; (G): Gynoecium; (Se): Sepale

Weitere Untersuchungen zur Rolle von *UFO* bei der Spezifizierung von Petalen und Stamen ergaben, daß die Aktivität von *UFO* notwendig für die korrekte Aktivierung des B-Funktionsgens *AP3* ist. Wie im Falle der Aktivierung des C-Funktionsgens *AG* durch *LFY* und *WUS*, bei der *WUS* die regionale Spezifität vermittelt, wird die positionale Information für die Expression von *AP3* durch die *UFO*-Expressionsdomäne gewährleistet. Die *UFO*-Expressionsdomäne in Blüten verhält sich dynamisch (siehe Abb. 1. 4): Erstmalig wird

UFO im Stadium 2 in einer weiten Domäne im Zentrum des Blütenprimordiums exprimiert. Im frühen Stadium 3 bildet sich eine tassenförmige Domäne aus, die dem *UFO*-Expressionsmuster im Sproßmeristem entspricht. Im späten Stadium 3 und während des Übergangs zu Stadium 4 der Blütenentwicklung verschwindet *UFO*-Expression aus dem Zentrum des Meristems und beschränkt sich auf die Bereiche des präsumptiven zweiten und dritten Wirtels. In späteren Entwicklungsstadien wird *UFO* in einem schmalen Streifen an der Basis der Petalenprimordien exprimiert (Lee et al., 1997; Samach et al., 1999). Es spricht einiges dafür, daß *UFO* die Expression von *AP3* aktiviert: *AP3*-Expression beginnt im frühen Stadium 3, also nach dem Einsetzen der *UFO*-Expression. Die *AP3*-Expressionsdomäne fällt dabei komplett in die *UFO*-Expressionsdomäne (Jack et al., 1992, Lee et al., 1997). In *ufo*-Mutanten ist *AP3*-Expression in Stadium 3-6 der Blütenentwicklung reduziert und schwächer als im Wildtyp (Levin und Meyerowitz, 1995). In Blüten von *35S::UFO*-Pflanzen konnte ektopische *AP3*-Expression nachgewiesen werden (Lee et al., 1997). Allerdings reicht ektopische *UFO*-Expression allein nicht aus, *AP3* unabhängig vom Blütenkontext zu aktivieren. Werden *UFO* und *LFY* jedoch gemeinsam fehlexprimiert (*35S::LFY/35S::UFO*), wird *AP3* in der gesamten Pflanze aktiviert (Parcy et al., 1998). Das gleiche gilt für die Expression von *PI* (Honma und Goto, 2000). *AP3* und *PI* werden also von *LFY* und *UFO* gemeinsam aktiviert.

Das *UFO*-Gen kodiert ein F-Box-Protein. Im Arabidopsis-Genom gibt es ca. 700 Gene, die F-Box-Proteine kodieren (Gagne et al., 2002; Kuroda et al., 2002). F-Box-Proteine gelten als Substratspezifität vermittelnder Bestandteil der E3 Ubiquitin-Ligase des SCF-Typs. Die Ubiquitin-Ligase E3 wirkt zusammen mit einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) und einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) bei der Katalyse der Ubiquitinierung von Proteinen. Die Ubiquitinierung dient der Markierung von Proteinen für den Abbau durch Proteolyse. Genetische Studien, Hefe-2-Hybrid-Experimente und Immunopräzipitationsexperimente haben gezeigt, daß *UFO* mit *ASK1* und *AtCul1* interagiert (Samach et al., 1999; Zhao et al., 2001; Wang et al., 2003). Diese beiden Proteine repräsentieren *Arabidopsis*-Orthologe von Proteinen, die als zentrale Bestandteile von SCF-Komplexen gelten (Yang et al., 1999; Zhao et al., 1999; Xu et al., 2002). Das läßt auf eine Funktion von *UFO* beim spezifischen Abbau von Proteinen schließen.

Trotz der großen Anzahl von F-Box-Genen im *Arabidopsis*-Genom (Kuroda et al., 2002) zeigt *UFO* außerhalb der F-Box-Domäne nur geringe Sequenzverwandtschaft zu anderen

F-Box-Proteinen. Die höchste Sequenzverwandschaft findet sich mit potentiellen Orthologen von *UFO* aus anderen Spezies. Neben *FIMBRIATA* aus *Antirrhinum*, dem am gründlichsten untersuchten *UFO*-Ortholog (Simon et al., 1994; Ingram et al., 1995 und 1997) wurden *Impatiens-FIMBRIATA (Imp-FIM)* aus *Impatiens balsamina* (Pouteau et al., 1998), *Stamina pistilloida (Stp)* aus der Erbse *Pisum sativum* (Taylor et al., 2001) und *Proliferating Floral Organs (Pfo)* aus *Lotus japonicus* (Zhang et al., 2003) beschrieben. Die Analyse der entsprechenden Mutanten weist auf eine weitgehend konservierte Funktion der *UFO/FIM*-Gene in der Blütenentwicklung hin; Mutationen in *Stp* zeigen auch eine Entwicklungsstörung der kompositen Blätter der Erbse (Taylor et al., 2001).

Wie oben bereits erwähnt, zeigen *ufo*-Mutanten in Embryogenese und vegetativer Phase keinen vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp (Levin und Meyerowitz, 1995; Wilkinson und Haughn, 1995; Samach et al., 1999); die Funktion von *UFO* im Sproßmeristem ist bis heute ungeklärt. Da *UFO* als F-Box-Protein wahrscheinlich nicht als transkriptioneller Regulator agiert, wird davon ausgegangen, daß *UFO* als Teil eines SCF^{UFO}-Komplexes in die Modifikation von Proteinen, die *AP3*- und *PI*-Expression regulieren, involviert ist (Samach et al., 1999; Zhao et al., 2001; Wang et al., 2003). Eine gängige Modellvorstellung geht davon aus, daß *UFO* die ubiquitin-vermittelte Degradierung von Repressoren der *AP3*- und *PI*-Expression vermittelt.

Bei der Aktivierung der B-Funktion wird also wie bei der Aktivierung der C-Funktion auf regionspezifische Faktoren zurückgegriffen, die generelle Elemente der Musterbildung in Meristemen darstellen. Über die Kontrolle der Expression von solchen regionspezifischen Faktoren wie *WUS* und *UFO*, die in allen Sproß- und Blütenmeristemen in einem definierten und dynamischen Muster exprimiert werden, ist bislang sehr wenig bekannt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Kontrolle der Expression des *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* Gens in *Arabidopsis thaliana*. Um regulatorische Gene, die die Expression von *UFO* beeinflussen, zu identifizieren, wurden transgene Pflanzen, die *GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)* unter Kontrolle des *UFO*-Promotors exprimieren (*UFO::GFP*) mutagenisiert. Anhand der *GFP*-Expression wurde nach Mutanten gesucht, in denen *UFO*-Expression im Keimlingsstadium vom

wildtypischen Muster abweicht. Um cis-regulatorische Sequenzen im *UFO*-Promotor zu identifizieren, wurde anhand einer Deletionsanalyse des *UFO*-Promotors die Kontrolle der *UFO*-Expression durch eigene regulatorische Sequenzen untersucht. Dafür wurden Fragmente des *UFO*-Promotors mit einem *GUS*-Reportergen fusioniert und die resultierenden Expressionsmuster in transgenen Pflanzen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: *Amersham Life Science*, Braunschweig; *Biomol*, Hamburg; *Biozym*, Oldendorf; *Duchefa*, (NL) *Fluka*, Neu-Ulm; *Invitrogen* (Karlsruhe); *Merck-Eurolab*, Darmstadt; *Life Technologies* (Karlsruhe); *Pharmacia*, Freiburg; *Promega*, Heidelberg; *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim; *Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Sigma*, Deisenhofen; *Clontech*, Heidelberg.

2.1.2 Enzyme

Es wurden Enzyme folgender Firmen verwendet, falls nicht anders angegeben: *Invitrogen* (Karlsruhe); *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim; alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit den beigefügten Puffern verwendet.

2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Medien

Die standardmäßig verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden nach den Protokollen von Ausubel et al. (1996) angesetzt. Von diesen Standardprotokollen abweichende Zusammensetzungen sind separat angegeben. Die für die Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* verwendeten Medien und Lösungen wurden nach den Angaben im *Clontech Yeast Protocols Handbook* (PT3024-1; <http://www.clontech.com>) angesetzt.

2.1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierungen und Plasmidamplifikationen in dieser Arbeit wurden die beiden *E.coli* – Stämme DH5 (*GIBCO/BRL*) und DH10B (*Boehringer*) verwendet. Die Genotypen der beiden Bakterienstämme sind Ausubel et al. (1996) sowie den Firmenangaben zu entnehmen. Für die Pflanzentransformationen wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) verwendet.

2.1.5 Hefestämme

Für die stabile Integration der Promotorfragment-Reporter-gen-Fusionen ins Hefegenom wurde der Stamm YTS1 verwendet (Soellick und Uhrig, 2001). Für die Hefe-1-Hybrid-Experimente wurde zusätzlich der Stamm AH109 verwendet. Dieser Stamm wurde mit einer cDNA-Bank aus Arabidopsis Sproßspitzen, die in den Vektor pGBKT7Rec kloniert war, transformiert. Der Stamm wurde von Dr. Hans Sommer (MPI für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Plasmide

pBluescript

Der Vektor pBluescriptKS+ (*Stratagene*) wurde für Zwischenklonierungen und als Vektor für die *in vitro* Transkription verwendet.

pCRII-TOPO

Der Vektor pCRII-TOPO (*Invitrogen*, Karlsruhe) wurde für Zwischenklonierungen verwendet.

pGPTV-BAR-Asc

Der Vektor pGPTV-BAR-Asc (zur Verfügung gestellt von W. Werr) ist ein pflanzlicher Expressionsvektor und liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz sowie eine Basta-Resistenz in der transgenen Pflanze. Durch die Klonierung von Promotor-Fragmenten vor das enthaltene β -Glucuronidase-Gen (*uidA*) wurde dieses Plasmid im Rahmen dieser Arbeit für die Konstruktion der *UFO*-Promotor-Reporterkonstrukte verwendet. Weitere Informationen finden sich bei Überlacker und Werr (1996).

pGREENnos-BAR

Der Vektor pGREENnos-BAR wurde als pflanzlicher Expressionsvektor in einigen der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Transgene verwendet. Der Vektor enthält den Polylinker von pBluescriptSK und liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz und eine Basta-Resistenz in der transgenen Pflanze. Als Helferplasmid wurde pJIC-Sa-Rep verwendet, das eine Plasmidreplikation in *Agrobacterium* ermöglicht. Dieses binäre

Vektorensystem wurde vom John Innes Centre, Großbritannien zur Verfügung gestellt. Weitere Informationen sind unter <http://www.pgreen.ac.uk> sowie in Hellens et al. (2000) zu finden.

pUFOp

Der Vektor pUFOp (zur Verfügung gestellt von R. Simon) wurde als Matrize für die PCR-Amplifikation der UFO-Promotorfragmente verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS und der 3733 bp umfassenden 5'-UFO-Promotorsequenz aus pJAM199 (Ingram et al., 1995), die über die HindIII- und BamHI-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen.

pR1UFO

Der Vektor pR1UFO (zur Verfügung gestellt von R. Simon) wurde als Matrize für die *in vitro*-Transkription einer *UFO*-RNA-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS und einer 560 bp umfassenden *UFO* cDNA, die über die BamHI- und XbaI-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen. Für die Herstellung einer *UFO-Antisense* RNA-Sonde wurde das Plasmid mit XbaI geöffnet und T7-Polymerase für die Transkription benutzt.

pMHWUS16

Der Vektor pMHWUS16 wurde als Matrize für die *in vitro*-Transkription einer *WUS*-RNA-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS und einer 933 bp umfassenden *WUS* cDNA, die über die BamHI- und EcoRV-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen. Für die Herstellung einer *WUS-Antisense* RNA-Sonde wurde das Plasmid mit BamHI geöffnet und T3-Polymerase für die Transkription benutzt.

pK373

Der Vektor pK373 (zur Verfügung gestellt von W. Werr) wurde für Zwischenklonierungen bei der Konstruktion der *UFO*-Promotor/*CaMV35S*-MinimalPromotor-Fusionen verwendet. Er setzt sich aus dem Plasmid pGEM3 (Promega, Heidelberg) und einer Fusion einer Teilsequenz (-46 bp; *CaMV35S*-MinimalPromotor) des *CaMV35S*-Promotors mit

dem *uidA*-Gen sowie der transkriptionellen *CaMV35S*-Terminator-Sequenz zusammen. Der in 5'-Richtung des *CaMV35S*-Minimalpromotors liegende Polylinker enthält eine HindIII-, Sall- und KpnI-Schnittstelle. Am 3'-Ende des Terminators befindet sich ein weiterer Polylinker, der eine SacI-Schnittstelle enthält.

pGUS/Bam

Der Vektor pGUS/Bam (zur Verfügung gestellt von T. Kirch) wurde als Matrize für die *in vitro*-Transkription einer *GUS*-RNA-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS und einer *GUS* cDNA, die über die BamHI- und XbaI-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen. Für die Herstellung einer *GUS*-Antisense RNA-Sonde wurde das Plasmid mit BamHI geöffnet und T3-Polymerase für die Transkription benutzt.

pHISi

Der Vektor pHISi (*Clontech*, Heidelberg) wurde für die Klonierung von *UFO*-Promotor-Fragmenten zur späteren Integration in den *his3*-Locus des Genoms des Hefestammes YTS-1 für die Verwendung im Hefe-1-Hybrid System benutzt. Weitere Informationen sind dem *Matchmaker One-Hybrid System User Manual* (*Clontech*, <http://www.clontech.com>) zu entnehmen.

pHISi-1

Der Vektor pHISi-1 (*Clontech*, Heidelberg) wurde für die Klonierung von *UFO*-Promotor-Fragmenten zur späteren Integration in den *his3*-Locus des Genoms des Hefestammes YTS-1 für die Verwendung im Hefe-1-Hybrid System benutzt. Weitere Informationen sind dem *Matchmaker One-Hybrid System User Manual* (*Clontech*, PT1031-1, <http://www.clontech.com>) zu entnehmen.

pLacZi

Der Vektor pLacZi (*Clontech*, Heidelberg) wurde für die Klonierung von *UFO*-Promotor-Fragmenten zur späteren Integration in den *ura3*-Locus des Genoms des Hefestammes YTS-1 für die Verwendung im Hefe-1-Hybrid System benutzt. Weitere Informationen sind

dem *Matchmaker 1-Hybrid System User Manual* (Clontech, PT1031-1, <http://www.clontech.com>) zu entnehmen.

2.1.7 Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Sequenz- und PCR-Reaktionen verschiedene Oligonukleotide synthetisiert bzw. verwendet, die in Tab. X zusammengefaßt sind. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen *Eurogentech*, Belgien, *Sigma*, Darmstadt und *Biotez*, Berlin bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
UFOPFF	GGGGAAGCTTGGAACAACACCTCC	UFO Promotordeletion
UFOD1	GGGGAAGCTTGCATTTTCTATCCCTCTCG	UFO Promotordeletion
UFOD2	GGGGAAGCTTACTATTAGACCCGATTTCAA	UFO Promotordeletion
UFOD3	GGGGAAGCTTCAGAGACTTCCTTTAGCATC	UFO Promotordeletion
UFOD4	GGGGAAGCTTGGAGGTTTTAGAGTTTGAAAG	UFO Promotordeletion
UFOD5	GGGGAAGCTTATTAGTCACAAGCAAAAA	UFO Promotordeletion, Hefe-1-Hybrid
UFOD6	GGGGAAGCTTCCATCACTTCCTTGCCACC	UFO Promotordeletion
UFOD7	GGGGAAGCTTACCTATTTCTCTGTCTTGG	UFO Promotordeletion
UFOD8	GGGGAAGCTTATGCCACCTTACTCTATTG	UFO Promotordeletion
UFOPRX	GGGGTCTAGAAGAGTTTATTTTCTTGTT	UFO Promotordeletion
UFOD5A	TGTCAAAGCTTGTGTTGAGTTCGAATAAG	UFO Promotordeletion, Hefe 1-hybrid
UFOD5C	TTAATAAGCTTTAGTTTTCTTGGGTTGATCTC	UFO Promotordeletion
UFOD5D	TTTGAAGCTTTGATCAAGTGTGAAAAGTA	UFO Promotordeletion
UFOD5R	TTATTGTCGACCAAAAATTTTGTATTATATGTG	UFO Promotordeletion
UFOD5RE	TTATTGAATTCAAAATTTTGTATTATATGTG	UFO Promotordeletion
UFOD3RE	GGGGGAATTCTCAAACCTCAAACCTCC	UFO Promotordeletion
UFOD4E	GGGGGAATTCGGAGGTTTLAGAGTTTGAAAG	UFO Promotordeletion
UFOD6E	GGGGGAATTCATCACTTCCTTGCCACC	UFO Promotordeletion
3-D4F9	AAGATCATATCTTTCAAACCTAAAACCTCC	UFO Promotordeletion
5-D9F4	AGTTTGAAAGATATGATCTTTGCCTCTTTTC	UFO Promotordeletion
3-D6F9	AAGATCATATGTCTTAAAGTTGAGAGCTTCAG	UFO Promotordeletion
5-D9F6	ACTTTAAGAGATATGATCTTTGCCTCTTTTC	UFO Promotordeletion
UFOD5E	GGGGAAGCTTATTAGTCACAAGCAAAAA	Hefe-1-Hybrid System
UFOD5CRS2	GGGGGTCGACGATCAACCCAAGAAAATA	Hefe-1-Hybrid System
UFOD5AE	TGTCGAATTCGTGTTGAGTTCGAATAAG	Hefe-1-Hybrid System
UFOD5CRX	GGGGTCTAGAGATCAACCCAAGAAAATA	Hefe-1-Hybrid System
UFOB0X1	CTAGTTCGATGTGGGCATTGACAAGATAACTCTGAAGCT	Hefe-1-Hybrid System
UFOB0X2	CTAGAGCTTCAGAGTTATCTTGTCATGCCCAGCATCGAA	Hefe-1-Hybrid System
WUSSEQ1	AACTTCTCTTCTCTTGTTC	Sequenzierung WUS
WUSSEQ2	GATTGAGGGCAAGAACGTC	Sequenzierung WUS

WUSSEQ3	GACTAAATCTCTCTTATACATG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ4	AAACCCAAGAAGATGTTATG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ5	GTATATTAATATGTTTGAAGG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ6	CTGCACCTTACAACCTCTCG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ7	ACTAGCGAAGCATAGTTGTG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ8	GATGAGTAATGATGATCCATG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ9	CAGGGGAAAAGAATGAAG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ10	CATCTGAATAAAATTCATAAATC	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ11	CGTGATGATGGTGAAGTAGAG	Sequenzierung <i>WUS</i>
WUSSEQ12	GTCCACCTCGTGTGGTCTG	Sequenzierung <i>WUS</i>
MHT7	TAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenzierung 1-Hybrid-Klone
MH3AD	AGATGGTGACGATGCACA	Sequenzierung 1-Hybrid-Klone
MHWUS1	AGTCGGATCCAACACACATGGAGCCGCC	Amplifikation von <i>WUS</i> aus Linie 54-1
MHWUS2	GAGCGATATCGGCGTAAGAGCTAGTTCA	Amplifikation von <i>WUS</i> aus Linie 54-1
Y1H1-5	GCGGCGTTACGGGAAAGAG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H2-5	AATGCGAGAGTTGACCACAC	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H3-5	ACGACCGTTTAGTGTTC	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H4-5	GGAGTCTCGGGCCAAACAAT	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H5-5	TGACCGGCAAGTTGTGAAATC	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H6-5	CTTTCATGCAGCTCCACAGA	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H7-5	TTGGGGAAAAGATGAAAGTTG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H8-5	TGCGGGATCTCCACCTGTTG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H9-5	TTGCAGCTATGGAAGGAACA	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H10-5	GTCCAAAGCTCAACGGTGTG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H1-3a	GTGATATCCCGCGGCGACGGTTGAGGTTG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H2-3a	GTGATATCCCGTCCACGAGTTGACCAGATAA	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H3-3a	GTGATATCCCGTCCCGTAGACGCTCCATA	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H4-3a	GTGATATCCCGTCTCGGCACCCAACAATCCT	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H5-3a	GTGATATCCCGCCGCAAGTTGAAGGGAAAGTC	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H6-3a	GTGATATCCCGTACAGGGCCAACAACATCAGG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H7-3a	GTGATATCCCGACGTCCTGGCAGAAATGGTT	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H8-3a	GTGATATCCCGCTTGCACCACCGCCATAAA	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H9-3a	GTGATATCCCGTACCCCGGAAACATCAT	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
Y1H10-3a	GTGATATCCCGCTTCTGCCTTAGCTCCCAATC	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung
T7AMP	GCGCATTATGCTGAGTGATATCCCG	Sonde für <i>in situ</i> -Hybridisierung

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz und Verwendungszweck

2.1.8 Verwendete Pflanzenlinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Arabidopsis*-Ökotypen Columbia (*Col-0*) und Landsberg erecta (*Ler*) als Wildtypen verwendet. Die mutanten und transgenen *Arabidopsis*-Genotypen sind in Tabelle 2.2 zusammenfassend dargestellt.

Genotyp	Bezugsquelle	Literaturhinweis
<i>ufo-2</i>	NASC, GB	Levin et al., 1995
<i>ufo-6</i>	NASC, GB	Levin et al., 1995
<i>clv3-2</i>	NASC, GB	Fletcher et al., 1999
<i>wus-1</i>	Dr. T. Laux	Laux et al., 1996
<i>stm-5</i>	Dr. T. Laux	Clark et al., 1996
<i>ap1-1</i>	NASC, GB	Bowman et al., 1989
<i>UFO::GFP</i>	laborintern	
<i>35S::WUS-GR</i>	laborintern	Brand et al., 2002
<i>35S::STM-GR</i>	laborintern	Brand et al., 2002
<i>LFY::WUS</i>	Dr. J. U. Lohmann	Lohmann et al., 2001
<i>35S::STM-VP16</i>	Dr. M. K. Barton	

Tab.2.2: Zusammenfassende Auflistung der verwendeten Genotypen

Zusätzlich wurden die in Tabelle 2.3 aufgelisteten SALK-T-DNA-Insertionslinien (Alonso et al., 2003) verwendet. Die Samen wurden über das Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) bezogen.

Bezeichnung	Insertion in Gen	Bezeichnung	Insertion in Gen
SALK_087012	At3g59060	SALK_060678	At4g02220
SALK_072306	At3g59060	SALK_016554	At1g19000
SALK_143659	At3g59060	SALK_018911	At1g19000
SALK_141615	At3g59060	SALK_087636	At4g38900
SALK_101465	At1g10650	SALK_018426	At4g38900
SALK_009132	At1g10650	SALK_059214	At4g38900
SALK_011878	At1g10650	SALK_065254	At4g38900
SALK_035149	At1g10650	SALK_062360	At3g12630
SALK_007010	At5g22480	SALK_073783	At3g12630
SALK_002818	At1g15910	SALK_039074	At5g67300
SALK_021481	At1g19220	SALK_008606	At5g67300
SALK_114483	At3g10760	SALK_018771	At5g67300
SALK_035504	At3g10760	SALK_008730	At1g13790
SALK_011176	At3g10760	SALK_008729	At1g13790
SALK_011329	At4g02220	SALK_008738	At1g13790
SALK_102450	At4g02220	SALK_152882	At1g13790
SALK_020053	At4g02220	SALK_048742	At1g13790
SALK_036804	<i>UFO</i> -Promotor		

Tab.2.3: Zusammenfassende Auflistung der verwendeten SALK-T-DNA-Insertionslinien mit Angabe der von der Insertion betroffenen Gene.

2.1.9 Elektronische Datenverarbeitung

Zur elektronischen Datenverarbeitung wurden die Programme Microsoft Word und Microsoft Excel verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet. Für Datenbanksuchen wurden die Internet-Ressourcen von *TAIR* (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>), *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *MIPS* (<http://mips.gsf.de/proj/thal>) verwendet. Zur Identifizierung bekannter Transkriptionsfaktoren-Bindungssequenzen wurde die Internet-Software *PLACE Signal Scan* (<http://www.dna.affrc.go.jp/sigscan>, Higo et al., 1999) verwendet. Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurden das *Lasergene*-Softwarepaket von DNASTAR sowie das *Wisconsin GCG Package* verwendet.

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht) im Gewächshaus oder in klimatisierten Pflanzenanzuchträumen bei einer Temperatur von 22°C bzw. 20°C angezogen. Pflanzenschutzmaßnahmen wurden nach Bedarf getroffen. Zur Detektion der GFP-Fluoreszenz wurden je ca. 50 Samen in 0,2% Agarose in einem Feld einer 24-Feld Mikrotiterplatte bei Dunkelheit zur Keimung gebracht und nach 4-6 Tagen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

2.2.2 *In planta* –Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte nach einer Standardmethode von Bechtold et al. (1998). Im Vakuum wurden adulte *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer *Agrobacterium tumefaciens*-Suspensionskultur infiltriert. Alternativ wurden die Pflanzen für wenige Minuten in eine *Agrobacterium tumefaciens*-Suspensionskultur getaucht. Die abgereiften Samen wurden dann abgeerntet, zur Keimung gebracht und transgene Pflanzen wurden mittels eines eingebrachten Herbizidresistenzgens selektioniert.

2.2.3 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zur Kreuzung wurden die Stamen unreifer Blüten der Pollen-Empfänger-Pflanzen mit einer Pinzette entfernt. Pollen der Donor-Pflanzen wurden auf die Narben der auf die beschriebene Weise emaskulierten Blüten der Empfänger-Pflanzen gebracht.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse von Plasmid-DNA erfolgte die Präparation nach einem modifizierten Protokoll der sogenannten *TELT Microquick* Methode (Holmes und Quigley, 1981) oder durch eine alkalische Lyse und anschließende Reinigung über Ionenaustauschchromatographiesäulen. Hierzu wurden Kits der Firmen *Qiagen* (Hilden) und *Macherey & Nagel* (Düren) verwendet. Die Herstellerangaben wurden befolgt.

2.3.1.2 Präparation von genomischer DNA

Zur Präparation kleiner Mengen pflanzlicher genomischer DNA wurden zunächst 1-2 Blätter in flüssigem N₂ eingefroren und in gefrorenem Zustand kurz gemörsert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Zugabe von 400 μ l DNA-Extraktionspuffer (Zusammensetzung: 200 mM Tris/Cl pH7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS); mischen; kurz bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- 300 μ l des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführen; mit 300 μ l Isopropanol mischen
- 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 200 μ l TE lösen; für PCR wurden 2 μ l DNA-Lösung verwendet.

2.3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA Fragmenten für die verschiedenen Klonierungen erfolgte über präparative Gelelektrophorese mit Hilfe des *GFX DNA Purification Kits* der Firma Amersham (Braunschweig). PCR-Produkte wurden ebenfalls mit diesem Kit aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wie Größenseparation von DNA und RNA, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Restriktionsspaltung von DNA, Dephosphorylierung von 5'-Enden, Auffüllen überhängender Enden von DNA-Fragmenten, Ligationen, Bakterientransformationen, DNA-Sequenzierungen und PCR-Reaktionen erfolgten nach den Protokollen in Ausubel et al. (1996).

2.3.3 Konstruktion der Plasmide

Im folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit konstruierten und verwendeten Plasmide beschrieben. Sie wurden durch Restriktionsspaltungen mit geeigneten Enzymen und durch Sequenzierung kontrolliert und bestätigt.

2.3.3.1 UFO-Promotor-Deletionsderivate

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten UFO-Promotor-Deletionsderivate findet sich im Ergebnisteil in Abb. 3.14.

5'-Deletionen: pMHUFO1-pMHUFOD8

Die Plasmide pMHUFO1, pMHUFOD1, pMHUFOD2, pMHUFOD3, pMHUFOD4, pMHUFOD5, pMHUFOD6, pMHUFOD7, pMHUFOD8 wurden konstruiert, um das GUS-Reportergen unter der Kontrolle verschiedener Fragmente des *UFO*-Promotors zu exprimieren. Die entsprechenden Fragmente wurden mittels PCR unter Verwendung von pUFOp als Matrize amplifiziert. Durch die benutzten Primer wurde am 5'-Ende jeweils eine HindIII-Schnittstelle sowie am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingeführt. Tabelle (2.4) zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer und der resultierenden

Deletionsderivate. Alle Längenangaben und Positionsangaben in dieser Arbeit beziehen sich jeweils auf das letzte Basenpaar der am 3'-Ende eingeführten XbaI-Schnittstelle. Die Promotorfragmente wurden in das Plasmid pCRII-TOPO subkloniert. Aus den resultierenden Plasmiden (pUFull, pUD1, pUD2, pUD3, pUD4, pUD5, pUD6, pUD7 und pUD8) wurden die Promotorfragmente durch Restriktionsspaltung mit HindIII und XbaI herausgeschnitten, aufgereinigt und jeweils in einen mit HindIII und XbaI gespaltenen pGPTV-BAR-Vektor kloniert. Die Fragmente D5A, D5C und D5D wurden mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt, mit HindIII und XbaI geschnitten und jeweils in in einen mit HindIII und XbaI gespaltenen pGPTV-BAR-Vektor kloniert.

5'-Primer	Position 5'-Primer	Fragment- länge (bp)	3'-Primer	Position 3'-Primer	Verwendeter Expressionsvektor	resultierendes Plasmid
UFOPFF	-3733	3733	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFO1
UFOD1	-3232	3232	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD1
UFOD2	-2807	2807	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD2
UFOD3	-2307	2307	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD3
UFOD4	-1841	1841	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD4
UFOD5	-1362	1362	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD5
UFOD5A	-1241	1241	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD5A
UFOD5C	-1058	1058	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD5C
UFOD5D	-925	925	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD5D
UFOD6	-832	832	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD6
UFOD7	-591	591	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD7
UFOD8	-209	209	UFOPRX	-1	pGPTV-BAR	pMHUFOD8

Tab. 2.4: Übersicht über die hergestellten 5'-Deletionsderivate

Fusionen mit dem CaMV35S-Minimal-Promotor: pMHUFOD5AR-pMHUFOD5AR

Für die Fusion der UFO-Promotor-Fragmente D5aR, D5bR, D5cR und D5cR mit der *CaMV35S*-Minimalpromotor-Sequenz wurden diese zunächst durch PCR mit pUFOp als Matrize amplifiziert. Durch die benutzten Primer wurde am 5'-Ende jeweils eine HindIII-Schnittstelle sowie am 3'-Ende eine SallI-Schnittstelle eingeführt. Tabelle (2.5) zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer und der resultierenden Deletionsderivate. Die Längenangaben beziehen sich jeweils auf das letzte Basenpaar der BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende des UFO-Promotors aus pUFOp. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in pCRII-

TOPO zwischenkloniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pD5ARTOPO, pD5BRTPOPO, pD5CRTPOPO und pD5DRTOPO bezeichnet. Aus diesen wurden die Fragmente durch Restriktionsspaltung mit HindIII und SalI herausgeschnitten, aufgereinigt und jeweils in den mit HindIII und SalI gespaltenen Vektor pK373 kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pK373-D5aR, pK373-D5bR, pK373-D5cR und pK373-D5dR bezeichnet. Aus diesen Plasmiden wurde jeweils die aus Promotorfragment, CaMV35S-MinimalPromotor, *uidA-Gen* und *CaMV35S-Terminator* zusammengesetzte Kassette durch Restriktionsspaltung mit HindIII und SacI herausgeschnitten, aufgereinigt und in den mit HindIII und SacI gespaltenen Vektor pGREEN-nos-BAR kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pMHUFOD5AR, pMHUFOD5BR, pMHUFOD5CR bzw. pMHUFOD5DR bezeichnet.

5'-Primer	Position 5'-Primer	Fragmentlänge (bp)	3'-Primer	Position 3'-Primer	Verwendeter Expressionsvektor	resultierendes Plasmid
UFOD5A	-1241	453	UFOD5R	-788	pGREEN-nos-BAR	pMHUFOD5aR
UFOD5B	-1178	390	UFOD5R	-788	pGREEN-nos-BAR	pMHUFOD5bR
UFOD5C	-1058	270	UFOD5R	-788	pGREEN-nos-BAR	pMHUFOD5cR
UFOD5D	-925	137	UFOD5R	-788	pGREEN-nos-BAR	pMHUFOD5dR

Tab. 2.4: Übersicht über die hergestellten Deletionsderivate als Minimalpromotor-Fusionen

Fusionen mit UFO-100-Sequenz: pMHUFOD3F9 und pMHUFOD5F9

Die *UFO*-Promotor-Deletionsderivate pMHUFOD3F9 und pMHUFOD5F9 wurden durch rekombinante PCR unter Verwendung der Primer UFOD3, 3-D4F9, 5-D9F4, UFOD5, 3-D6F9, und 5-D9F6 hergestellt. Zunächst wurden Einzelfragmente amplifiziert, die dann über PCR-vermittelte Ligation miteinander fusioniert wurden. Die resultierenden Fragmente wurden über eingeführte HindIII/XbaI-Schnittstellen in den mit HindIII und XbaI gespaltenen pGPTV-BAR-Vektor kloniert.

Deletionen innerhalb des UFO-Promotors: pMHUFODelD3-D4, pMHUFODelD3-D6, pMHUFODelD5-D6

Zunächst wurden unter Verwendung der Primer UFOPFF, UFOD3RE, UFOD4E, UFOD5RE, UFOD6E und UFOPRX Einzelfragmente amplifiziert. Dabei wurden am 5'-Ende eine HindIII-Schnittstelle und am 3'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle bzw. am 5'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingeführt. Die PCR-Produkte wurden dann mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, miteinander ligiert und in den mit HindIII und XbaI gespaltenen pGPTV-BAR-Vektor kloniert.

2.3.3.2 Plasmide für Hefe-1-Hybrid-Experimente**pHISi-D5a-c**

Das *UFO*-Promotor-Fragment D5a-c wurde mittels PCR mit pUFOp als Matrize und den Primern UFOD5AE und UFOD5CRX amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit EcoRI und XbaI geschnitten und in einen mit EcoRI und XbaI geöffneten pHISi-Vektor kloniert.

pLacZi-D5a-c

Das *UFO*-Promotor-Fragment D5a-c wurde mittels PCR mit pUFOp als Matrize und den Primern UFOD5A und UFOD5CRS2 amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine HindIII-Schnittstelle und am 3'-Ende eine SalI-Schnittstelle eingeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit EcoRI und XbaI geschnitten und in einen mit HindIII und SalI geöffneten pLacZi-Vektor kloniert.

pHISi-D5-5c

Das *UFO*-Promotor-Fragment D5-5c wurde mittels PCR mit pUFOp als Matrize und den Primern UFOD5E und UFOD5CRX amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingeführt wurde. Das PCR-Produkt

wurde aufgereinigt, mit EcoRI und XbaI geschnitten und in einen mit EcoRI und XbaI geöffneten pHISi kloniert.

pLacZiD5-5c

Das *UFO*-Promotor-Fragment D5a-c wurde mittels PCR mit pUFOp als Matrize und den Primern UFOD5 und UFOD5CRS2 amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine HindIII-Schnittstelle und am 3'-Ende eine Sall-Schnittstelle eingeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit EcoRI und XbaI geschnitten und in einen mit HindIII und Sall geöffneten pLacZi kloniert.

2.3.4 Hefe-1-Hybrid System

Das Hefe 1-Hybrid System wird zur Identifizierung DNA-bindender Proteine verwendet. Hierzu wird eine Fusion aus der zu untersuchenden DNA-Sequenz mit einem Minimalpromotor und einem Reportergen durch homologe Rekombination stabil ins Genom eines geeigneten Stammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* integriert. Ein zweiter Hefestamm wird mit Plasmiden, die Fusionen von *Arabidopsis*-cDNAs mit einer transkriptionellen Aktivierungsdomäne exprimieren, transformiert. Nach Paarung der beiden Hefestämme kann im neu entstandenen Hefestamm nach Bindung von translatierten Fusionsproteinen an die zu untersuchende DNA-Sequenz auf die Expression des Reportergens selektioniert werden. Die DNA-bindenden Proteine können dann durch Sequenzierung der cDNAs identifiziert werden. Abb. 2.1 zeigt eine schematische Darstellung des dem Hefe-1 Hybrid System zugrundeliegenden Prinzips.

In der vorliegenden Arbeit wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Hefe-1-Hybrid-Experimenten die Plasmide pHISiD5-5a und pLacZiD5-5a bzw pHISiD5-5c und placZiD5-5c. stabil ins Genom des Hefestammes YTS-1 integriert.

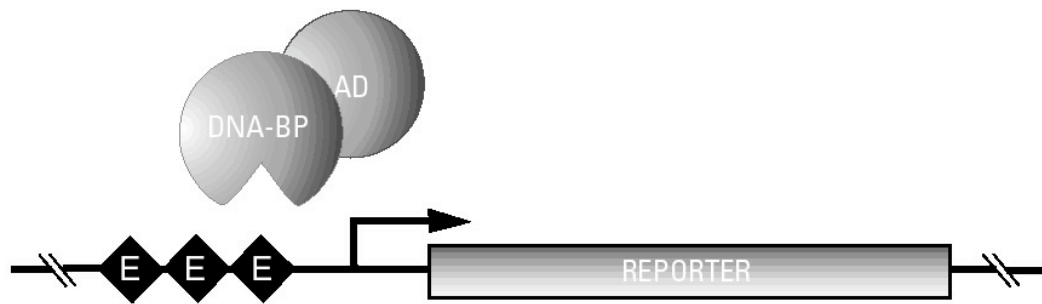


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung des Prinzips des Hefe-1-Hybrid Systems. Bei der Bindung des Fusionsproteins (DNA-BP: DNA-bindendes Protein; AD: Aktivierungsdomäne) an die zu untersuchenden DNA-Sequenzen (E) wird die Transkription des Reportergens aktiviert. Die Abbildung wurde dem *Matchmaker 1-Hybrid System User Manual (Clontech, PT1031-1, <http://www.clontech.com>)* entnommen.

2.3.4.1 Integration von Reporterkonstrukten ins Genom von *S. cerevisiae*

Die durch Restriktionsspaltung linearisierten Plasmide wurden durch homologe Rekombination ins Genom des Hefestammes YTS-1 integriert. Die Integration erfolgte nach den Angaben im *Clontech Yeast Protocols Handbook (PT3024-1; <http://www.clontech.com>)*. Durch Integration des pLacZi-Derivats und nachfolgende Integration des pHISi-Derivats in einen Hefestamm wurden Doppel-Reporterstämme erzeugt. Diese wurden mit MHD5a-c, MHD5-5c und MHUFOBOX bezeichnet.

2.3.4.2 Paarung zweier Hefestämme

Die Paarung der Hefestämme MHD5a-c und MHD5-5c mit dem von Dr. Hans Sommer zur Verfügung gestellten Hefestamm AH109 mit der cDNA-Bank aus *Arabidopsis*-Sproßspitzen wurde gemäß des Protokolls im *Matchmaker Library Construction & Screening Kit-Handbuch (Clontech, PT3529-1, <http://www.clontech.com>)* durchgeführt.

2.3.4.3 Identifizierung von transaktivierenden Hefeklonen mittels HIS/3AT-Selektion und in vivo- β -Gal-Färbung

Transaktivierende Hefeklone wurden nach der Paarung auf SD-HIS/-URA/-LEU-Platten mit 15mM 3AT und XX μ M X- β -Gal auf Aktivierung des *LacZ*-Reportergens und des *HIS*-Reportergens selektioniert.

2.3.4.4 Amplifikation der Arabidopsis-cDNAs aus Hefeklonen

Die durch die HIS/3AT und *in vivo*- β -Gal-Färbung selektierten Hefeklone wurden auf entsprechenden Medien neu ausplattiert und einzelne Kolonien als Matrize für PCR mit den Primern MHT7 und MH3AD verwendet. Für diese Kolonie-PCR wurde eine verlängerte initiale Denaturierungszeit von 5 min verwendet. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe der BLAST-Software auf der Internetseite von TAIR mit der *Arabidopsis*-Genomdatenbank abgeglichen und die entsprechenden Gene identifiziert.

2.4 Histologische Techniken

2.4.1 Nicht-radioaktive RNA *in situ*-Hybridisierung

Die RNA *in situ*-Hybridisierung wurde leicht modifiziert nach Jackson (1991) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet die Fixierung des frischen Gewebes, dessen Einbettung in Paraffin (*Paraplast Plus*, Sigma, Deisenhofen), die Herstellung der Schnitte, die Herstellung der Sonden, sowie die Detektion der Transkripte von Interesse mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde und einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin Antikörper. Für die *in vitro* Transkription der Sonden wurden folgende Plasmide verwendet:

CLV3-Sonde: pNB4/35 (N. Beinert); *WUS*-Sonde: pMHWUS16; *UFO*-Sonde: pR1UFO (R. Simon); *GUS*-Sonde: pGUS/Bam (T. Kirch). Alle genannten Vektoren sind Derivate von pBluescriptKS+.

2.4.2 Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität (GUS-Färbung)

Die β -Glucuronidase-Färbung in transgenen Pflanzen wurde nach einem modifizierten Färbeprotokoll von Sieburth und Meyerowitz (1997) durchgeführt. Das β -Glucuronidase Enzym spaltet hierbei das farblose Substrat *X-Gluc* (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure, Cyclohexylammonium-Salz, *Duchefa*), das dann als blauer Farbniederschlag in der Zelle detektiert werden kann.

- Pflanzengewebe 4-12 h bei 37°C in X-Gluc Färbelösung inkubieren
- mit 70% und 100% Ethanol das Chlorophyll entfernen (jeweils 1-4 h bei RT)
- Pflanzen in 50% und 100% Rotihistol klären (optional)
- Pflanzen in Immersionsöl überführen
- Die Embryonen und Keimlinge wurden als *whole mount* Präparat ausgewertet. Ältere Infloreszenzen wurden nach der GUS-Färbung fixiert, in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten.
- X-Gluc Färbelösung: 50 mM NaPO₄, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 10 mM x-Gluc
- Fixativ: 50% Ethanol, 5% Essigsäure, 3,7% Formaldehyd

2.5 Mikroskopische Techniken

2.5.1 Nomarsky-Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem *Axioskop* Mikroskop mit Nomarsky-Optik der Firma *Zeiss* und einer angeschlossenen *Axiocam* Digitalkamera der Firma *Zeiss* angefertigt. Dies geschah mit Hilfe der zugehörigen Software *Axio Vision*.

2.5.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GFP-Expressionsanalysen wurden mit einem MZFL-III Mikroskop der Firma *Leica* und den Filtern GFP1 und GFP3 (Plant GFP) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer angeschlossenen *Hitachi*-Videokamera gemacht.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von Regulatoren der *UFO*-Expression durch Mutagenese von transgenen *UFO::GFP*-Pflanzen

Um Gene zu identifizieren, die die Expression des *UFO*-Gens regulieren, wurde ein Mutagenese-Screen durchgeführt. Funktionsverlust-Mutationen in Genen, die positive Regulatoren der *UFO*-Expression kodieren, sollten zu einer Verkleinerung der *UFO*-Expressionsdomäne oder einem völligen Ausfall der *UFO*-Expression führen, während Funktionsverlust-Mutationen in Genen, die negative Regulatoren oder Repressoren kodieren, zu ektoptischer *UFO*-Expression führen könnten. In diesem Screen wurde bereits im Keimlingsstadium nach Veränderungen der *UFO*-Expressionsdomäne gesucht. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, daß auch solche Mutanten identifiziert werden können, die in einem Screen für Blütenphänotypen nicht gefunden würden. So könnte eine Mutation in einem Regulator der *UFO*-Expression z.B. durch einen frühen Arrest des Sproßmeristems dazu führen, daß sich keine Blüten entwickeln und ein Blütenphänotyp somit verborgen bliebe.

Zur Identifizierung solcher das *UFO*-Expressionsmuster modifizierenden Mutationen wurde die M_2 -Generation von 4000 mit EMS mutagenisierten Einzelpflanzen auf Veränderungen des *UFO*-Expressionsmusters überprüft. Dafür wurde ein GFP-Reportergen, das unter der Kontrolle des *UFO*-Promotors exprimiert wird, genutzt. Die Mutagenese und das Screening wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

M_0 -Generation: homozygot für *UFO::GFP* und *Kan^R*; Samen mit EMS mutagenisiert

□ M_1 -Generation: homozygot für *UFO::GFP* und *Kan^R*; heterozygot für EMS-induzierte Mutationen (4000 Einzelpflanzen); Selbstung und damit Etablierung von 4000 Zelllinien

□ M_2 -Generation: homozygot für *UFO::GFP* und *Kan^R*; segregiert homozygote EMS-induzierte Mutationen; Aussaat in Mikrotiterplatten; Screen nach Modifikation des GFP-Expressionsmusters im Keimlingsstadium

M₂-Geschwisterpflanzen von Keimlingen, die eine Veränderung des GFP-Musters zeigen, wurden für die phänotypische Analyse auf Erde ausgesät.

Die mutagenisierten M₂-Linien wurden von Rüdiger Simon zur Verfügung gestellt. Von jeder individuellen M₂-Linie wurden ca. 50 Samen in ein Feld einer 24-Feld Mikrotiterplatte auf 0.2% Agarose ausgesät und nach dreitägiger Inkubation bei 4°C in der Dunkelheit zur Keimung gebracht. Nach 4-6 Tagen wurden die Keimlinge auf Veränderungen des GFP-Expressionsmusters unter Kontrolle des *UFO*-Promotors unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Die Bezeichnung der einzelnen Linien wurde nach Aussaat in die Mikrotiterplatten vorgenommen (Platte Nr.-Feld Nr.; z.B. P17-08 für Platte Nr.17, Feld 8).

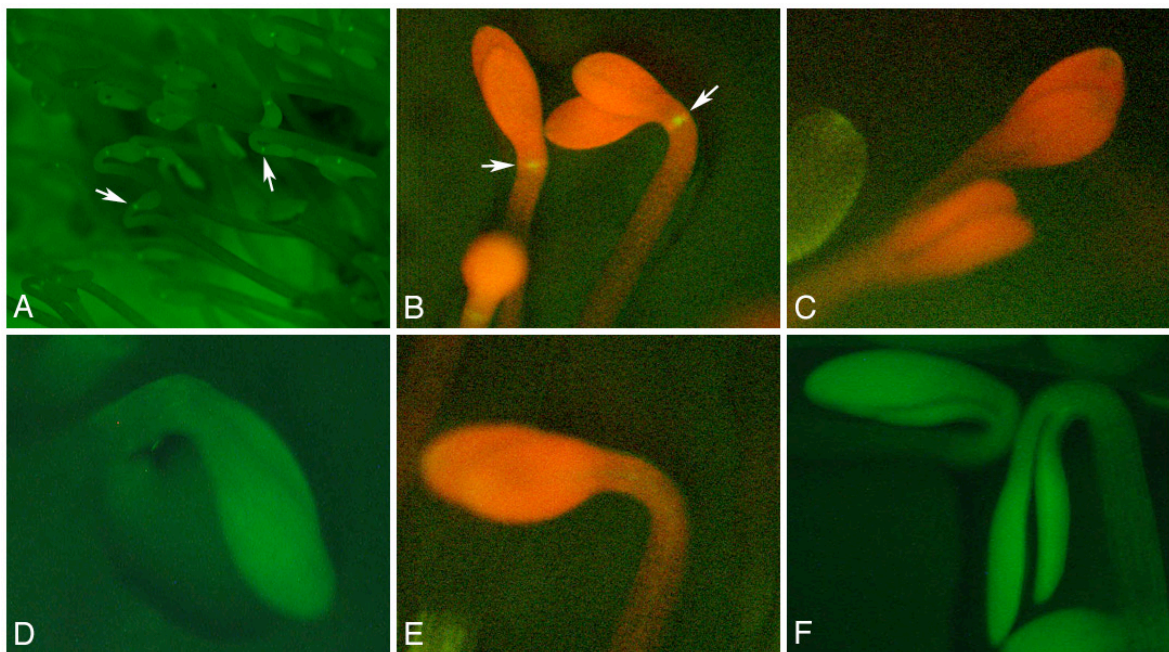


Abb. 3.1: Mutagenese-Screen von transgenen *UFO::GFP*-Pflanzen. Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter Verwendung zweier unterschiedlicher Filter (A, D, F: Filter GFP3; B, C, E: Filter GFP1). Die Keimlinge sind aufgrund der Chlorophyll-Fluoreszenz rot (Filter GFP1) bzw. grün (Filter GFP3) gefärbt. A, B: Ausgangslinie *UFO::GFP*; GFP-Expression unter Kontrolle des *UFO*-Promotors (Pfeile) ist im Sproßmeristem als gelbgrüne Fluoreszenz sichtbar. C-F: Verlust der GFP-Expression in Individuen mutagenisierter Einzellinien. C: Linie P54-01, D: Linie P72-10, E: Linie P98-13, F: Linie 106-23.

Unter den 4000 analysierten Einzellinien konnten 5 Linien identifiziert werden, in denen Keimlinge segregierten, die einen Verlust der GFP-Expression zeigten. Diese wurden näher

untersucht. Im folgenden wird auf jede dieser Linien einzeln eingegangen; Abb. 3.1 zeigt eine Übersicht.

3.1.1 Linie P17-08: Transgeninaktivierung und Kosuppression des *UFO*-Gens

In Linie P17-08 exprimierten 9 von 26 Keimlingen kein GFP. Nach Aussaat auf Erde zeigten 6 der 18 gekeimten Pflanzen einen Blütenphänotyp. In den Blüten fehlten Petalen und Stamen; diese waren zum Teil durch filamentöse Organe ersetzt. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für *ufo*-Mutanten. Zusätzlich wurde eine Störung des negativen Sproßgravitropismus der Seitentriebe beobachtet.

Für das Auftreten des Phänotyps können verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß es sich bei der Mutation um einen Funktionsverlust in einem positiven Regulator der *UFO*-Expression handelt, der neben der Aktivierung der *UFO*-Expression auch das gravitropische Wachstum der sekundären Infloreszenzen kontrolliert. Andererseits könnte der beobachtete Phänotyp das Resultat zweier unabhängiger Mutationen in unterschiedlichen Genen sein. Sollten die betroffenen Gene in diesem Falle nicht gekoppelt sein, müßten der Blütenphänotyp und der Gravitropismus-Phänotyp nach einer Auskreuzung mit dem Wildtyp in der F₂-Generation getrennt auftreten. Um dies zu überprüfen, wurden mutante Pflanzen mit wildtypischen gekreuzt. In der F₂-Generation konnte bei 133 untersuchten Mutanten in keinem Fall eine Trennung der Phänotypen beobachtet werden. Das spricht für eine einzelne Mutation oder eine enge Kopplung zweier mutanter Gene.

Allerdings wurde beobachtet, daß der Phänotyp in den F₂-Linien mit unterschiedlichen Verhältnissen segregierte (Tab. 3.1). Ein Allelismus-Test durch Kreuzung von M₂-Pflanzen der Linie P17-08 mit *ufo-6*-Mutanten konnte schließlich zeigen, daß die für den Blütenphänotyp ursächliche Mutation allelisch mit *ufo* ist. Das beruht auf der Beobachtung, daß Pflanzen der F₁-Generation dieser Kreuzung einen *ufo*-mutanten Phänotyp zeigten. Aufgrund der unklaren Segregationsverhältnisse wird vermutet, daß es sich bei der Ursache für den Blütenphänotyp und die fehlende GFP-Expression nicht um eine Funktionsverlust-Mutation in *UFO*, sondern um ein epigenetisches Phänomen, nämlich eine Inaktivierung des *UFO::GFP*-Transgens und daraus folgende mit Kosuppression des *UFO*-Gens handelt. Dafür spricht auch, daß *UFO* in *ufo*-Mutanten exprimiert wird (Samach et al., 1999). Ein

ufo-Funktionsverlust würde also nicht zum Verlust der *UFO*-Expression (und auch nicht zum Verlust der *UFO::GFP*-Expression) führen.

Interessanterweise kartiert die Mutation *shoot gravitropism 2 (sgr2)*, die einen Verlust des negativen Gravitropismus der Seitentriebe zeigt, in der Nähe von *UFO* auf Chromosom 1 (Kato et al., 2002). Es könnte also sein, daß die Stilllegung eines größeren genomischen Bereichs für den in Linie P17-08 auftretenden Phänotyp verantwortlich ist. Linie P17-08 wurde daher als Kandidat für eine Mutante in einem Regulator der *UFO*-Expression ausgeschlossen und nicht weiter untersucht.

Kreuzung Nr. (F2-Generation)	Wildtyp	Mutanten	Rate
1	57	6	9,5:1
2	47	12	3,9:1
3	45	2	22,5:1
4	69	6	11,5:1
5	26	3	8,7:1
6	83	11	7,5:1
7	58	20	2,9:1
8	31	6	5,2:1
9	41	8	5,1:1
10	58	18	3,2:1
11	78	17	4,6:1
12	35	4	8,8:1
13	31	9	3,4:1
14	37	8	4,6:1
15	24	5	4,8:1
16	16	4	4:1

Tab. 3.1: Segregation des *ufo*/Sproßgravitropismus-Phänotyps in der F2-Generation der Kreuzungen von Einzelpflanzen der Linie P17-08 mit Col-0-Pflanzen. Die Segregationsverhältnisse konnten keinen Aufschluß darüber geben, ob es sich um eine einzelne, rezessive Mutation handelt. Die unterschiedlichen Segregationsraten in der F2-Generation der Einzelkreuzungen sprechen für einen epigenetischen Effekt.

3.1.2 Linie P72-10 – kein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Verlust der GFP-Expression

In Linie P72-10 exprimierten 10 von 20 M₂-Pflanzen kein GFP. Nach Aussaat von 44 Samen auf Erde konnten unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden: 12 der 41 gekeimten Pflanzen waren wildtypisch; 6 Pflanzen zeigten Zwergwachstum und starben

nach der Produktion weniger Blätter und 6-8 zumeist steriler Blüten ab (Phänotyp I). Diese Blüten produzierten eine wildtypische Anzahl aller Blütenorgane, die Blüten blieben jedoch klein und öffneten sich nicht und die Blütenorgane waren nicht voll entwickelt. Zwei dieser Pflanzen produzierten jeweils eine fertile Blüte und wenige Samen, so daß diese Linien propagiert werden konnten.

Bei 14 weiteren Pflanzen wurden sterile Blüten beobachtet (Phänotyp II). Auch diese Blüten produzierten eine wildtypische Anzahl von Blütenorganen. Möglicherweise lag die Ursache für die Sterilität der Blüten in einer gestörten Produktion reifen Pollens; die Antheren der sterilen Blüten blieben unreif und geschlossen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung dieser Pflanzen wurden wenige fertile Blüten produziert, so daß Samen geerntet werden konnten.

9 weitere Pflanzen zeigten eine gekerbte Blattform und im Allgemeinen eine Störung der Apikaldominanz, es wurde eine große Anzahl an primären, sekundären und tertiären Infloreszenzen produziert (Phänotyp III). Diese Infloreszenzen produzierten wenige Blüten, die nur in ca. 50% der Fälle fertil waren. Alle Blüten wiesen eine wildtypische Anzahl von Blütenorganen auf, die Organe waren jedoch teilweise nicht voll entwickelt.

Phänotyp M2	GFP+	GFP-	n.d.
wt	-	19	4
wt	13	9	9
wt	14	7	5
wt	18	8	7
wt	21	5	11
wt	12	3	10
wt	17	11	17
I	-	-	5
II	9	9	8
II	21	7	9
II	-	-	29
III	24	11	7
III	12	2	11

Tab. 3.2: Segregation der GFP-Expression in der M₃-Generation von Linie P72-10. In allen phänotypischen Klassen segregierten Keimlinge, die keine GFP-Expression zeigten. Es konnte kein Zusammenhang zwischen einem der beobachteten Phänotypen und dem Verlust der GFP-Expression gezeigt werden.

Um eine Korrelation der beobachteten Phänotypen mit dem Verlust der GFP-Expression herzustellen, wurden Samen von 13 M₃-Einzelpflanzen der unterschiedlichen phänotypischen Klassen auf Platten ausgesät, im Dunkeln zur Keimung gebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf GFP-Expression analysiert. Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse dieses Experiments. Keine phänotypische Klasse konnte eindeutig dem Verlust der GFP-Expression zugeordnet werden, da in der Nachkommenschaft aller M₂-Pflanzen sowohl GFP-exprimierende als auch nicht exprimierende Keimlinge segregierten. Linie P72-10 wurde daher nicht weiter bearbeitet.

3.1.3 Linie P98-13 und Linie P106-23 – Transgeninaktivierung und Kosuppression des *UFO*-Gens

In den Linien P98-13 und P106-23 segregierten Keimlinge, die kein GFP exprimierten. Nach Aussaat von M₂-Pflanzen auf Erde konnte in beiden Linien *ufo*-ähnliche Phänotypen beobachtet werden: Petalen und Stamen fehlten teilweise oder ganz bzw. waren durch Mosaikorgane aus beiden Geweben oder filamentöse Organe ersetzt, was dazu führte, daß die Blüten nicht durch Eigenpollen befruchtet wurden (Abb. 3.2). In Linie 98-13 war dieser Phänotyp stärker ausgeprägt. Mit dem weiteren Verlauf der Entwicklung der Pflanzen beider Linien zeigte sich der Phänotyp allerdings als fortschreitend schwächer ausgeprägt; d.h. es wurden zunehmend mehr wildtypische Petalen und Stamen und damit fertile Blüten produziert.

Pollenakzeptor	Pollendonorpflanze	Anzahl <i>ufo</i> -Mutanten (n=20)
98-13	<i>ufo-2 +/-</i>	7
98-13	<i>ufo-2 +/-</i>	12
98-13	<i>ufo-2 +/-</i>	6
98-13	<i>ufo-2 +/-</i>	17
98-13	<i>ufo-2 +/-</i>	10
98-13	wildtyp	16
98-13	wildtyp	9
98-13	wildtyp	4
106-23	<i>ufo-2 +/-</i>	n.d.
106-23	wildtyp	n.d.

Tab. 3.3: Ergebnisse der Kreuzungen von Pflanzen der Linien P98-13 bzw. P106-23 mit *ufo-2*-heterozygoten und wildtypischen Pflanzen. In der F1-Generation aller Kreuzungen segregierten Pflanzen, die einen *ufo*-Funktionsverlust-Phänotyp zeigten.

Von Pflanzen beider Linien wurden Samen abgeerntet und erneut auf GFP-Expression untersucht, wobei die Anwesenheit des *UFO::GFP*-Transgens durch Kanamycin-Selektion bestätigt wurde.

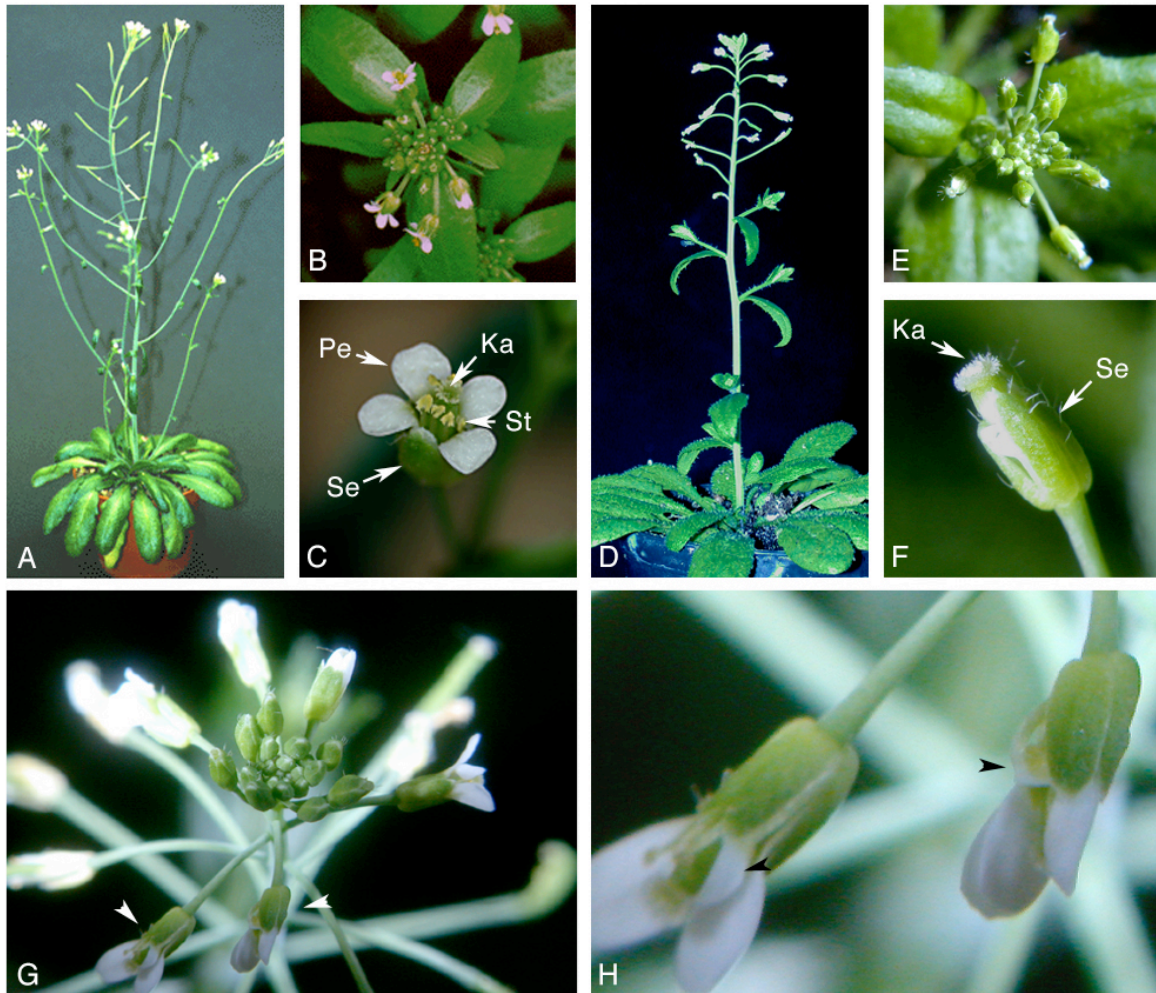


Abb. 3.2: Phänotyp mutanter Pflanzen der Linien P98-13 und P106-23. A-C: Wildtyp; D-F: Linie P98-13; G, H: Linie P106-23. A: Habitus einer wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanze. B: Aufsicht auf eine wildtypische *Arabidopsis*-Infloreszenz. Geöffnete Blüten mit Petalen sind zu sehen. C: Nahaufnahme einer wildtypischen Blüte. Sepalen (Se), Petalen (Pe), Stamen (St) und Karpelle (Ka) D: Habitus einer Pflanze der Linie P98-13. Durch das Fehlen reifer Stamen findet keine Pollinierung der Blüten statt. Deshalb sind im Vergleich zum Wildtyp keine Schoten zu sehen. E: Aufsicht auf eine Infloreszenz einer Pflanze der Linie P98-13. Die Blüten bleiben ungeöffnet; Karpelle und Sepalen sind wildtypisch. F: Nahaufnahme einer Blüte. Sepalen (Se) und Karpelle (Ka) sind wildtypisch; Stamen sind nicht vorhanden, Petalen sind verkürzt und durch die Sepalen verdeckt. G: Infloreszenz einer Pflanze der Linie P106-23. Im Vordergrund sind zwei Blüten mit nur 3 Petalen zu sehen. (Pfeilspitzen) H: Nahaufnahme der beiden Blüten. Die Pfeilspitzen zeigen auf verkürzte Petalen.

In keinem Fall wurde GFP-Expression beobachtet. Um festzustellen, es sich um Mutationen im *UFO*-Gen handelt, wurden Allelismus-Tests durchgeführt. Dafür wurden mutante Einzelpflanzen mit *ufo*-heterozygoten Pflanzen bzw. Wildtypen gekreuzt und die F1-Generation auf das Auftreten von *UFO*-Funktionsverlust-Phänotypen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt. In der F1-Generation aller Kreuzungen segregierten *ufo*-Funktionsverlust-Phänotypen mit unterschiedlichen Segregationsraten. Das Auftreten der Phänotypen war unabhängig davon, ob die Pollendonoren *ufo*-heterozygot oder wildtypisch waren. Aufgrund der Beobachtung, daß die Ursache für den Phänotyp allelisch mit *UFO* ist und der unklaren Segregationsverhältnisse wird davon ausgegangen, daß die fehlende GFP-Expression nicht durch eine Funktionsverlust-Mutation in *UFO*, sondern durch eine Inaktivierung des *UFO::GFP*-Transgens und daraus folgende mit Kosuppression des *UFO*-Gens verursacht wurde. Die Linien P98-13 und P106-23 wurden daher nicht weiter bearbeitet.

3.1.4 Linie P54-01 – ein neues Allel von *WUSCHEL*

In Linie P54-01 segregierten in der M₂-Generation Keimlinge, in denen keine GFP-Expression zu beobachten war. 7 von 32 ausgezählten Keimlingen exprimierten kein GFP. Nach Aussaat von 40 M₂-Pflanzen auf Erde zeigten 10 einen mutanten Phänotyp: Nach der Produktion von 1-3 Primärblättern stellte das Sproßmeristem die Aktivität ein (Abb. 3.3). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurden Adventivmeristeme angelegt, die jedoch nach der Produktion eines oder weniger Blätter verfrüht terminierten. Die Infloreszenzen dieser Pflanzen terminierten ebenfalls verfrüht mit der Produktion einiger Blätter; Blüten wurden nicht initiiert. Der beobachtete Phänotyp tritt auch in *wus*-Mutanten auf (Laux et al., 1996), was die Vermutung nahelegte, daß es sich hier um eine Mutation im *WUS*-Gen handeln könnte. Deswegen wurde genomische DNA aus zwei homozygot mutanten, zwei potentiell heterozygoten Pflanzen der Linie P54-01 und aus zwei wildtypischen Pflanzen des Hintergrundes *Col-0* isoliert. Unter Verwendung der Oligonukleotide MHwus1 und MHwus2 wurde das *WUS*-Gen aus den genomischen DNA-Proben mittels PCR amplifiziert. Um Fehler bei der Amplifikation der *WUS*-DNA zu unterbinden, wurde eine DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und unter Verwendung der Primer wusseq1-wusseq12 sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten ergab, dass in den homozygoten Mutanten ein Basenaustausch

erfolgt war, der zu einer Umwandlung des Gln-Codons an Position 44 in ein Stopcodon (CAA → TAA) führt. In der *WUS*-Sequenz der heterozygoten Pflanzen konnte an dieser Position ein überlagerndes Messergebnis (C und T) festgestellt werden, während bei den wildtypischen Kontrollpflanzen das erwartete Gln-Codon CAA vorhanden war. Es wurde geschlossen, daß es sich bei der Mutation in Linie P54-01 um ein bislang unbekanntes Allel von *wus* handelt. Dieses wird im folgenden mit *wus-5* bezeichnet.



Abb. 3.3: Phänotyp von *wus-1*-Mutanten und den im Mutagenese-Screen identifizierten *wus-5*-Mutanten. **A, B:** *wus-1*; ca. 21 Tage nach Keimung. In *wus-1*-Mutanten verliert das Sproßmeristem die Stammzellen. Die kontinuierliche Anlage neuer Blattprimordien ist unterbrochen (Pfeil); nach der Produktion von drei Primärblättern hat das Meristem seine Aktivität eingestellt. **C, D:** Der Phänotyp von *wus-5*-Mutanten ist dem von *wus-1*-Mutanten identisch.

3.1.5 Zusammenfassung der Mutagenese

Im Screen von 4000 EMS-mutagenisierten *UFO::GFP*-Einzellinien in der M₂-Generation konnten fünf Linien identifiziert werden, in denen keine GFP-Expression unter Kontrolle des *UFO*-Promotors stattfand. Bei drei der isolierten Linien (Linie 17-08; 98-13; 106-23) lag die Ursache für den Verlust der GFP-Expression mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer Inaktivierung des *UFO::GFP*-Transgens. Die damit einhergehenden *ufo*-Funktionsverlust-

Phänotypen sind wahrscheinlich auf eine mit der Transgeninaktivierung einhergehende Kosuppression des *UFO*-Gens zurückzuführen. Es kann zusammenfassend gesagt werden, daß Transgeninaktivierung und Kosuppression ein Nachteil dieser Art von Mutagenese-Screens auf der Basis eines Transgens sein können.

In einer weiteren Linie (P72-10) segregierten in der M₂-Generation mehrere mutante Phänotypen und es konnte kein Zusammenhang mit dem Verlust der GFP-Expression und einem (oder mehrerer) der Phänotypen gefunden werden.

Die Identifizierung von *wus-5* als für den Verlust der GFP-Expression in Linie 54-01 ursächliche Mutation zeigt allerdings den großen Vorteil dieser Strategie und rechtfertigt ihre Anwendung voll und ganz: In einem Screen nach Blütenphänotypen, die auf einen Verlust der *UFO*-Expression hinweisen könnten, wäre diese Mutation nicht aufgedeckt worden. Das liegt daran, daß der in *wus-5*-Mutanten auftretende Meristemdefekt dazu führt, daß sich keine Blüten entwickeln. Durch die Suche nach Veränderungen des Expressionsmusters im Keimlingsstadium konnte also hier eine Mutante gefunden werden, die in einem Screen in einem späteren Entwicklungsstadium möglicherweise nicht gefunden worden wäre.

Um die Rolle von *WUS* als potentiellen Aktivator der *UFO*-Expression genauer zu definieren, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

3.2 Untersuchungen zur Rolle von *WUS* bei der Aktivierung von *UFO*

3.2.1 In *wus-1* Mutanten wird *UFO* nicht exprimiert

In den im Mutagenese-Experiment identifizierten *wus-5* Mutanten konnte im Keimlingsstadium keine GFP-Expression unter Kontrolle des *UFO*-Promotors beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob *UFO* in *wus*-Mutanten generell nicht exprimiert wird, wurden *in-situ* Hybridisierungen mit einer *UFO*-RNA-Sonde an Adventivmeristemen und Infloreszenzmeristemen *wus-1*-mutanter Pflanzen durchgeführt. Zusätzlich wurden homozygote transgene *UFO::GFP*-Pflanzen mit heterozygoten *wus-1*-Mutanten gekreuzt und homozygot *wus-1*-mutante Individuen der F₂-Generation auf GFP-Expression untersucht.

3.2.1.1 *In situ*-Hybridisierungen

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden Gewebeschnitte ca. 4 Wochen alter *wus-1*-mutanter Pflanzen verwendet. Die Schnitte wurden auf das Vorhandensein von Adventivmeristemen bzw. Infloreszenzmeristemen überprüft und mit einer *UFO*-RNA-Sonde hybridisiert. Abb. 3.4 zeigt exemplarisch einen Schnitt durch ein mit der *UFO*-RNA-Sonde hybridisiertes vegetatives *wus-1*-Adventivmeristem (A) und ein *wus-1*-Infloreszenzmeristem (B). In keiner der 8 untersuchten Pflanzen konnte *UFO*-Expression nachgewiesen werden. Parallel behandelte wildtypische Infloreszenzmeristeme zeigten *UFO*-Expression. In diesen Stadien wird *UFO* in *wus*-mutanten Meristemen also nicht exprimiert. Für die Untersuchung der *UFO*-Expression im Keimlingsstadium wurde das *UFO::GFP*-Reportergen verwendet, das sich in diesem Stadium besser darstellen läßt.

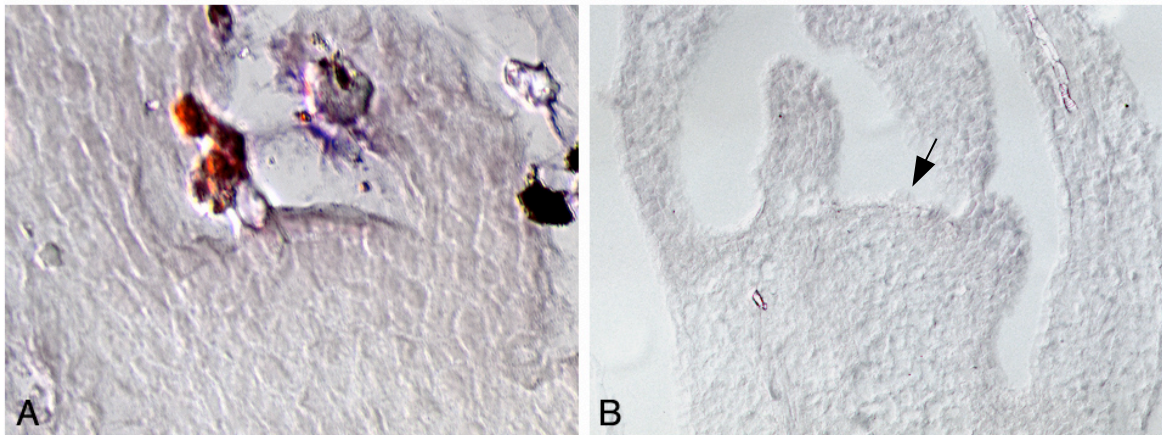


Abb. 3.4: In *wus-1*-mutanten Meristemen wird *UFO* nicht exprimiert. *In situ*-Hybridisierung mit einer *UFO*-Antisense-RNA-Sonde. Schnitte durch ein (A) Adventivmeristem und (B) Infloreszenzmeristem (Pfeil) einer *wus-1*-mutanten Pflanze. *UFO*-Expression ist nicht detektierbar.

3.2.1.2 GFP-Fluoreszenz (*UFO::GFP* x *wus-1*)

Um zu überprüfen, ob *wus*-Mutanten im Keimlingsstadium *UFO* exprimieren, wurden *wus-1*-heterozygote Pflanzen mit *UFO::GFP*-Pflanzen gekreuzt und die F2-Generation auf GFP-Expression untersucht. In keinem der für *wus-1* homozygoten Keimlinge konnte GFP-Expression unter der Kontrolle des *UFO*-Promotors nachgewiesen werden. In allen Geschwisterpflanzen, die heterozygot für *wus-1* oder wildtypisch waren, wurde GFP-Expression im *UFO*-Muster detektiert (Abb. 3.5). Die Anwesenheit des *UFO::GFP*-Transgens in den untersuchten Pflanzen wurde durch Kanamycin-Selektion bestätigt.

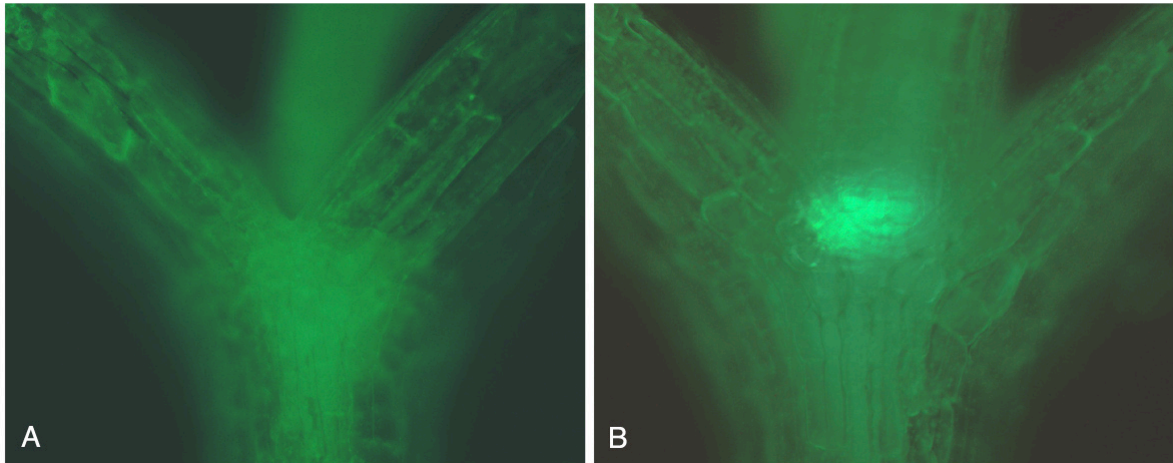


Abb. 3.5: GFP-Expression unter Kontrolle des UFO-Promotors in *wus-1 x UFO::GFP*-Pflanzen. A: In homozygot *wus-1*-mutanten Individuen wird *UFO::GFP* nicht exprimiert. B: In heterozygoten und wildtypischen Geschwisterpflanzen wurde GFP-Expression im *UFO*-Muster detektiert.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß funktionsfähiges WUS-Protein für die Expression des *UFO*-Gens essentiell ist. Aus den durchgeführten Experimenten läßt sich jedoch nicht schließen, ob *WUS* ein direkter positiver Regulator der *UFO*-Expression ist, oder ob durch die Funktion des WUS-Proteins nur die Voraussetzungen dafür geschaffen werden, daß *UFO* exprimiert werden kann. Dies kann durch *WUS*-Fehlexpressionsexperimente näher untersucht werden: Falls *WUS* ein direkter Aktivator von *UFO* ist, sollte ektope *WUS*-Expression zu ektope *UFO*-Expression führen.

3.2.2 Durch *WUS*-Überexpression (*35S::WUS-GR*) wird *UFO*-Expression im Meristem verstärkt aktiviert

Um festzustellen, ob ektope *WUS*-Expression zu ektope *UFO*-Expression führt, wurde die Expression von *UFO* in transgenen Pflanzen untersucht, in denen *WUS* unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors exprimiert wird. Da einfache Überexpression des *WUS*-Gens die Entwicklung der Pflanzen generell stark schädigt, wurde eine induzierbare Version verwendet. (*35S::WUS-GR*, Brand et al., 2002). *UFO*-Expression wurde in diesen Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach Induktion der *WUS*-Überexpression untersucht: *35S::WUS-GR*-Pflanzen wurden dazu mit dem *UFO*-Reporter gen *pMHUFO1* transformiert und *UFO*-Expression in der T2-Generation durch GUS-Färbungen detektiert. Außerdem wurde getestet, ob *WUS*-Fehlexpression *UFO*-Expression in der Wurzel und in Blüten aktivieren kann.

3.2.2.1 *WUS* aktiviert *UFO*-Expression im Sproßmeristem

WUS-Überexpression wurde in *MHUF01/35S::WUS-GR*-Pflanzen 8 Tage nach der Keimung durch Besprühen mit 1 μ M Dexamethasonlösung induziert. Eine parallel ausgesäte Kontrollgruppe wurde nicht mit Dexamethason behandelt. In induzierten Pflanzen sind die Primärblätter nach unten geneigt und Blattprimordien wachsen nicht weiter aus (Brand et al., 2002; Abb. 3.6).

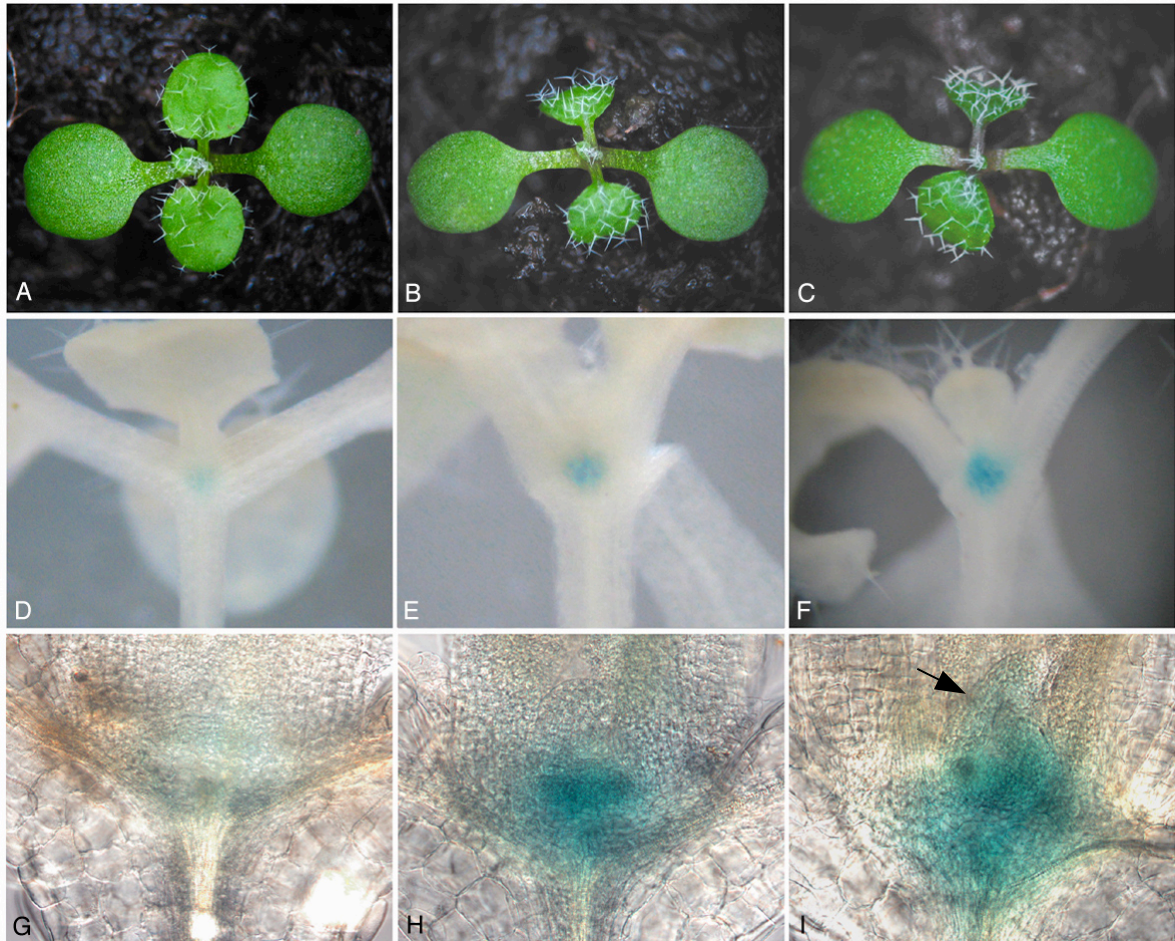


Abb. 3.6: Expression des *UFO*-Reportergens *pMHUF01* in induzierten und uninduzierten *35S::WUS-GR*-Pflanzen. **A-C:** Phänotyp von *pMHUF01/35S::WUS-GR*-Pflanzen; uninduziert (**A**), 24 Stunden nach Induktion (**B**), 48 Stunden nach Induktion (**C**). **D-I:** GUS-Färbungen von *pMHUF01/35S::WUS-GR*-Keimlingen **D, G:** uninduziert; *UFO::GUS*-Aktivität ist auf das Sproßmeristem beschränkt. **E, H:** 24 Stunden nach Induktion; *UFO::GUS*-Aktivität ist im Vergleich zu uninduzierten Pflanzen stärker und in einer vergrößerten, das Sproßmeristem umgebenden Domäne zu sehen. **F, I:** 48 Stunden nach Induktion. Die *UFO::GUS*-Expressionsdomäne dehnt sich weiter aus; auch junge Blattprimordien zeigen *UFO::GUS*-Expression (Pfeil).

Induzierte Pflanzen wurden anhand dieses Phänotyps identifiziert, 24 Stunden und 48 Stunden nach Induktion abgeerntet und einer GUS-Färbung unterzogen. Parallel wurden Pflanzen der Kontrollgruppe abgeerntet und gefärbt.

In Pflanzen der Kontrollgruppe wurde *UFO*-Expression im wildtypischen Muster detektiert. Die 24 Stunden nach Induktion abgeernteten Keimlinge zeigten eine Ausdehnung der *UFO*-Expressionsdomäne in das das Meristem umgebende Gewebe; auch die Intensität der Färbung war stärker als in der Kontrollgruppe. Diese mit einer Verbreiterung der Expressionsdomäne einhergehende Verstärkung der *UFO*-Expression wurde in den nach 48 Stunden abgeernteten Pflanzen noch offensichtlicher (Abb. 3.6). Durch konstitutive *WUS*-Expression wird *UFO*-Expression also verstärkt. Allerdings wurde *UFO* nicht ektopisch exprimiert. Dies läßt darauf schließen, daß konstitutive *WUS*-Expression *UFO*-Expression zwar in meristematischer Umgebung aktivieren kann, jedoch nicht ausreichend ist, *UFO* in allen Geweben zu aktivieren. Möglicherweise benötigt *WUS* also im Meristem exprimierte Kofaktoren für die Aktivierung von *UFO*.

3.2.2.2 Aktivierung der *UFO*-Expression durch *WUS* in Wurzeln

Im Zusammenwirken mit Auxin kann *WUS*-Fehlexpression in Wurzeln zur Bildung von ektopischem Sproßgewebe und somatischen Embryonen führen (Zuo et al., 2002). Unter diesen Bedingungen hat *WUS* das Potential, *CLV3*-Expression getrennt vom Sproßmeristemkontext in Wurzeln zu aktivieren (Gallois et al., 2004). Um zu überprüfen, ob ektopische Expression von *WUS* unter hohen Auxinkonzentrationen auch *UFO*-Expression in der Wurzel aktivieren kann, wurden *35S::WUS-GR/MHUF01*-Pflanzen auf Induktormedium (0,1 μ M NAA und 1 μ M Dexamethason) ausgesät und 10 Tage nach der Keimung GUS-Färbungen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Pflanzen an den Wurzeln bereits kallusartiges Gewebe produziert (Abb. 3.7; A, B), das zum Teil chlorophyllhaltig war und somit Eigenschaften von Sproßgewebe hatte; zum Teil waren somatische Embryonen sichtbar. Parallel auf Platten ohne Auxin und Dexamethason ausgesäte Kontrollpflanzen des gleichen Genotyps blieben wildtypisch. Pflanzen, die auf Medium, das nur Dexamethason enthielt, ausgesät worden waren, zeigten nur den oben beschriebenen *WUS*-Überexpressionsphänotyp.

Im kallusartigen Sproßgewebe der induzierten *35S::WUS-GR/MHUF01* war starke GUS-Aktivität in einem unregelmäßigen Muster vorhanden (Abb 3.7; C, D). Dabei erstreckte

sich das Expressionsmuster über weite Bereiche des Gewebes; ein *UFO*-ähnliches Muster war nicht zu erkennen. Aus dem Kallusgewebe herauswachsende Primordien verloren die GUS-Expression. In einigen Fällen war starke GUS-Expression von der Basis des Hypokotyls über weite Teile der Wurzel und ektopisches Sproßgewebe zu beobachten (Abb. 3.7, F). GUS-Aktivität war in diesen Pflanzen also nicht ausschließlich in ektopischem Sproßgewebe vorhanden, sondern auch in äußerlich unveränderten Geweben.

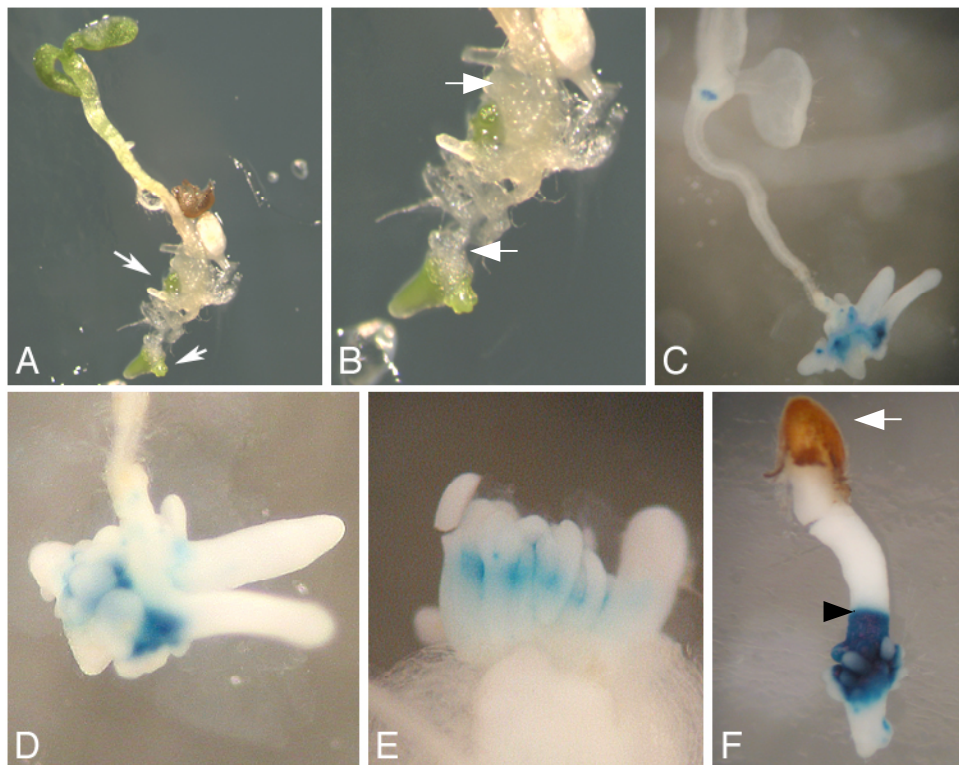


Abb. 3.7: Induktion von *UFO* in ektopischem Sproßgewebe und in der Wurzel. **A, B:** Phänotyp der auf Induktormedium gekeimten *35S::WUS-GR/pMHUFO1*-Pflanzen (10 Tage nach der Keimung). **A:** Übersicht über einen Keimling. Die Pfeile zeigen auf chlorophyllhaltiges ektopisches Sproßgewebe im Wurzelbereich. **B:** Ausschnittsvergrößerung des Wurzelbereichs. Das ektopische Sproßgewebe wächst aus chlorophyllfreiem kallusartigen Gewebe (Pfeile) heraus. **C-F:** GUS-Färbungen. **C:** Übersicht über einen Keimling. Starke *UFO::GUS*-Aktivität im Sproßmeristem und im kallusartigen Gewebe an der Wurzel. **D:** Im kallusartigen Sproßgewebe ist starke GUS-Aktivität in einem unregelmäßigen Muster vorhanden. Auswachsende Primordien zeigen keine Färbung. **E:** Gruppe somatischer Embryonen im Torpedo-Stadium; starke *UFO::GUS*-Aktivität im Bereich der Sproßmeristeme. **F:** Keimling; die Samenschale (weißer Pfeil) bedeckt die Kotyledonen. Starke *UFO::GUS*-Expression erstreckt sich von der Basis des Hypokotyls (schwarze Pfeilspitze) über weite Teile der Wurzel und ektopisches Sproßgewebe.

Somatische Embryonen zeigten starke *GUS*-Expression im Bereich des Sproßmeristems. Die Expression erschien allerdings wesentlich stärker und auch ausgedehnter als in wildtypischen Embryonen.

Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß ektopische Expression von *WUS* bei hohen Auxinkonzentrationen *UFO* auch in Wurzeln aktivieren kann. Da sich die Expression des *UFO*-Reportergens nicht auf die meristematischen Gewebe beschränkte, kann gesagt werden, daß *WUS* unter diesen Bedingungen *UFO*-Expression auch unabhängig von meristematischen Kofaktoren aktivieren kann.

3.2.2.3 Aktivierung der *UFO*-Expression durch *WUS*-Fehlexpression in Blüten

WUS-Überexpression führte im vegetativen Sproßmeristem zu einer starken Aktivierung des *UFO*-Reportergens *MHUF01*. Wird auch das *UFO*-Expressionsmuster in Blüten durch *WUS* kontrolliert?

Da die in dieser Arbeit verwendeten *35S::WUS-GR*-Pflanzen nach der Blühinduktion nach Induktion mit Dexamethason keinen *WUS*-Fehlexpressionsphänotyp zeigten, wurden für dieses Experiment Pflanzen benutzt, in denen *WUS* unter der Kontrolle des *LFY*-Promotors exprimiert wird (*LFY::WUS*-Pflanzen; Lohmann et al., 2001). Der *LFY*-Promotor ist in allen Zellen von Blütenmeristemen bis zum Stadium 2 der Blütenentwicklung aktiv. Die Blüten der *LFY-WUS*-Pflanzen hatten vergrößerte Blütenmeristeme, die im Vergleich zum Wildtyp eine größere Anzahl von Blütenorganen produzierten. Dabei wurden hauptsächlich zusätzliche Stamen gebildet (Abb. 3.8; A, B). Teilweise war an der abaxialen Basis der Sepalen meristematisches Gewebe zu finden. Um zu überprüfen, ob *UFO* in den Blüten dieser Pflanzen ektopisch exprimiert wird, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit *UFO*- und *WUS*-RNA-Sonden durchgeführt und die Expressionsmuster verglichen.

Im Sproßmeristem wurde wildtypische *WUS*-Expression nachgewiesen. Wie erwartet, wurde *WUS* in Blütenprimordien bis inklusive Stadium 2 in allen Zellen exprimiert (Abb. 3.8, C). Allerdings wurde ektopische *WUS*-Expression auch an der abaxialen Seite der Petiolen und an der Peripherie von älteren Blütenprimordien detektiert (Abb. 3.8, C, D). In Blütenprimordien des Stadium 1 war keine ektopische *UFO*-Expression vorhanden; in Stadium 2 bis 3 war die Expression von *UFO* wildtypisch (Abb. 3.8, E). In frühen Stadien der Blütenentwicklung fand also keine Aktivierung durch die ektopische *WUS*-Expression statt. In älteren Blütenprimordien wurde *UFO*-RNA – wie auch *WUS*-RNA – an der

Peripherie der Blüten nachgewiesen (Abb. 3.8, F, G). Hier wurden *WUS* und *UFO* also ko-exprimiert. In diesem Bereich entwickelte sich ektopisches meristematisches Gewebe, in dem sowohl *WUS* als auch *UFO* stark exprimiert wurden (Abb. 3.8, H, I).

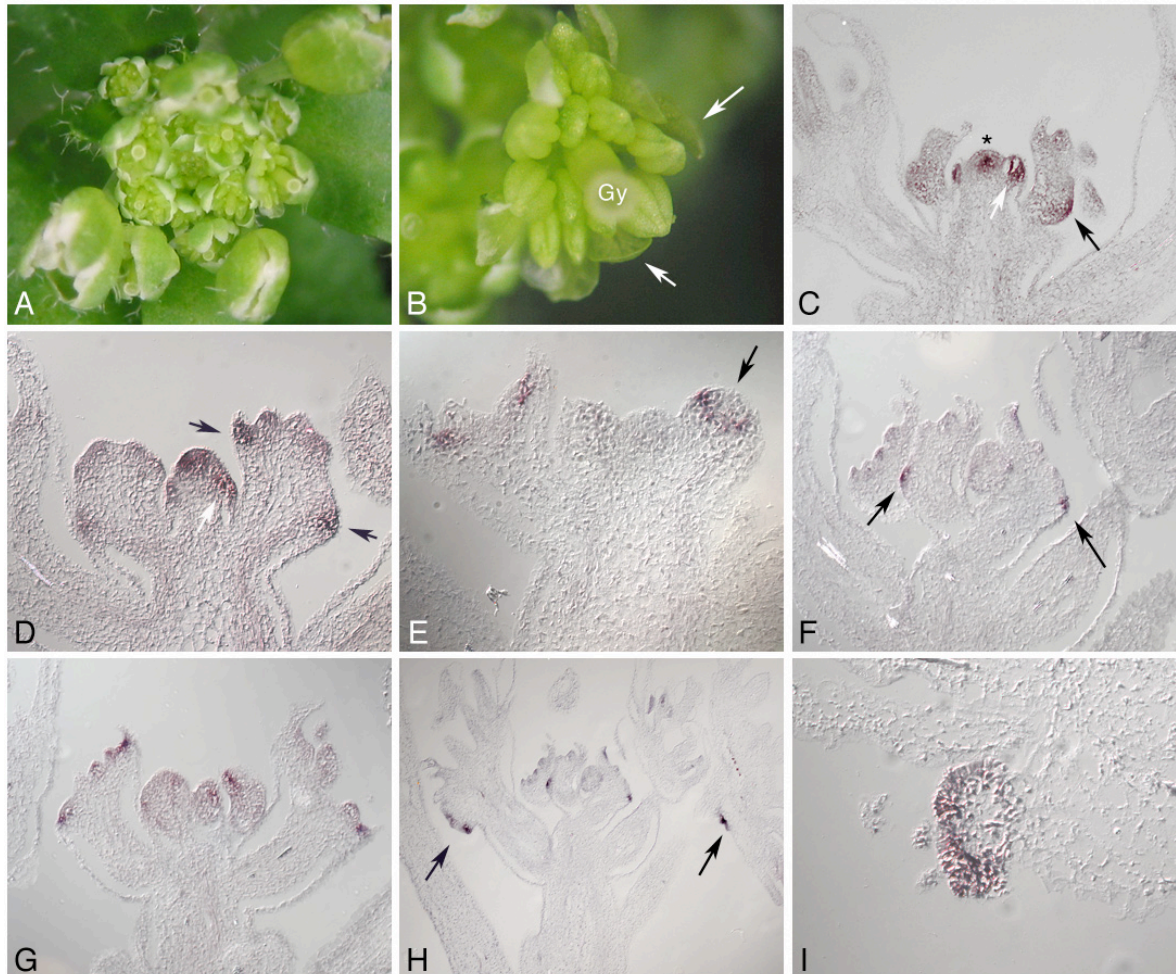


Abb. 3.8: Expression von *WUS* und *UFO* in *LFY::WUS*-Pflanzen. **A, B:** Phänotyp; **C-I:** *In situ*-Hybridisierungen an Längsschnitten durch Infloreszenzen mit *WUS*- (**C, D**) und *UFO*-Antisense-RNA-Sonden (**E-I**). **A:** Aufsicht auf eine *LFY::WUS*-Infloreszenz. Zahlreiche Blüten mit überzähligen Blütenorganen werden gebildet. **B:** Aufsicht auf eine unreife Blüte mit entfernten Sepalen. Die Petalen (weiße Pfeile) sind noch grün und nicht ausgewachsen. Das Gynoeceum (Gy) ist von zahlreichen Stamen umgeben. **C:** *WUS*-Expression im Sproßmeristem (*) ist wildtypisch; in Blütenprimordien des Stadiums 1 und 2 (weißer Pfeil) wird *WUS* in allen Zellen exprimiert. Außerdem wird *WUS* an der abaxialen Seite der Petiole exprimiert (schwarzer Pfeil). **D:** *WUS*-Expression an der Peripherie eines älteren Blütenprimordiums (schwarze Pfeile). **E:** In Stadium 2-Blüten (Pfeil) ist *UFO*-Expression im wildtypischen Muster vorhanden. **F, G:** In späteren Stadien der Blütenentwicklung wird *UFO* an der Peripherie der Blüten exprimiert. **H:** Starke *UFO*-Expression in ektopischen Meristemen an der Blütenbasis (Pfeile); **I:** *UFO*-Expression in einem ektopischen Meristem

In *LFY::WUS*-Blütenmeristemen früher Entwicklungsstadien findet also keine ektopische Aktivierung der *UFO*-Expression statt, während in späteren Stadien das *UFO*-Expressionsmuster der ektopischen *WUS*-Expression folgt. In ektopischen Meristemen, die an der Basis älterer Blüten entstehen, werden *WUS* und *UFO* stark ko-exprimiert.

3.2.2.4 In *clv3*-mutanten Infloreszenzmeristemen wird *UFO* ektopisch exprimiert

In den Sproß- und Blütenmeristemen von *clavata*-Mutanten wird *WUS* in einer vergrößerten Domäne exprimiert. Das hat zur Folge, daß Stammzellen in Sproß- und Blütenmeristemen akkumulieren und die Meristeme vergrößert sind. Um zu testen, ob die ektopische Expression von *WUS* in *clv*-Mutanten auch eine Ausdehnung der *UFO*-Expressionsdomäne zur Folge hat, wurde *UFO*-Expression in *clv3*-Mutanten durch GUS-Färbungen und *in situ*-Hybridisierung untersucht.

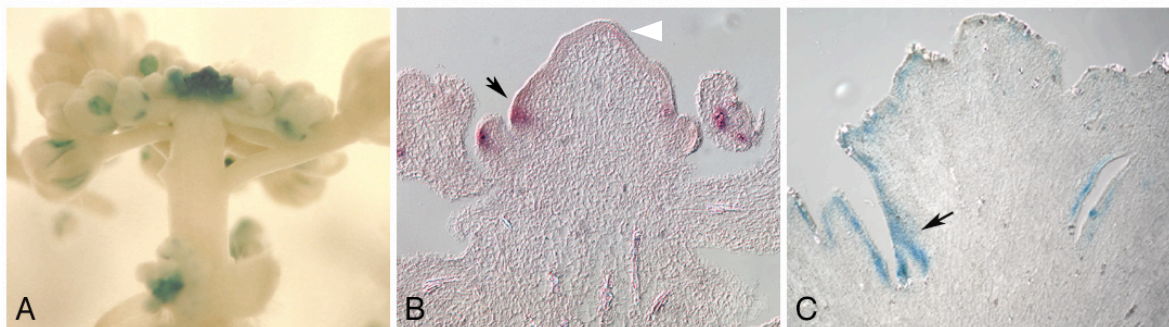


Abb. 3.9: Expression von *UFO* in *clv3*-mutanten Infloreszenzen. A, C: GUS-Färbungen; B: *In situ*-Hybridisierung mit einer *UFO*-Antisense-RNA-Sonde. A: starke *UFO::GUS*-Expression im Infloreszenzmeristem und in Blüten. B: *UFO*-Expression ist an der Peripherie des faszierten Meristems am stärksten (Pfeil); im Infloreszenzmeristem selbst wird *UFO* schwach exprimiert (weiße Pfeilspitze). C: *UFO::GUS*-Expression in einem stark faszierten, älteren *clv3*-mutanten Infloreszenzmeristem. *UFO::GUS* wird in einer breiten Expressionsdomäne unterhalb der äußeren Zellagen des Infloreszenzmeristems exprimiert.

In den Infloreszenzmeristemen von *clv3-2 x MHUFO1*-Pflanzen wurde *UFO::GUS* stark exprimiert. Dabei war kein klares Expressionsmuster erkennbar, vielmehr war das gesamte Infloreszenzmeristem angefärbt (Abb. 3.9; A). Auch in Blüten wurde *UFO::GUS* stark exprimiert. In Längsschnitten zeigte sich die *UFO::GUS*-Expression in einem breiten Streifen unterhalb der äußeren Zellagen (Abb. 3.9; C) und erinnerte damit an *WUS*-Expression in *clv3-2*-mutanten Infloreszenzmeristemen (Brand et al., 2000).

In situ-Hybridisierungen mit *UFO*-RNA-Sonden an *clv3-2*-mutanten Infloreszenzen zeigten im Infloreszenzmeristem selbst allerdings nur schwache *UFO*-Expression; das

stärkste Signal war an der Peripherie der faszierten Infloreszenzmeristeme vorhanden (Abb. 3.9; B). Insgesamt läßt sich sagen, daß *UFO::GUS* in *clv*-mutanten Meristemen ektopisch exprimiert wird.

3.2.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In *wus*-Mutanten wird *UFO* nicht exprimiert. Die Tatsache, daß ektopische *WUS*-Expression *UFO*-Expression zwar im meristematischen Kontext, jedoch nicht in der gesamten Pflanze aktiviert, weist darauf hin, daß *WUS* im Meristem exprimierte Kofaktoren für die Aktivierung von *UFO* benötigt. Bei hohen Auxinkonzentrationen kann *WUS* ektopische *UFO*-Expression in der Wurzel aktivieren. *WUS*-Fehlexpression in Blüten führt in frühen Entwicklungsstadien nicht zu ektopischer *UFO*-Expression. In späteren Stadien das folgt *UFO*-Expressionsmuster der ektopischen *WUS*-Expression. In ektopischen Meristemen, die an der Basis älterer Blüten entstehen, werden *WUS* und *UFO* stark ko-exprimiert. Auch in *clv3*-mutanten Infloreszenzmeristemen wird *UFO* ektopisch exprimiert. Das *UFO::GUS*-Expressionsmuster korreliert dabei mit den *WUS*-Expressionsmuster.

3.2.3 Aktiviert *STM* die Expression von *UFO*?

Als Kandidat für einen Aktivator der *UFO*-Expression gilt das *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) Gen. Dies beruht auf der Beobachtung, dass *UFO*-Expression in *stm*-mutanten Embryonen bereits vor dem Auftreten des *stm*-mutanten Phänotyps und dem Verlust des Sproßmeristems fehlt (Long et al., 1998).

3.2.3.1 In *stm-5*-Mutanten wird *UFO* nicht exprimiert

Um zu überprüfen, ob *STM* tatsächlich *UFO* aktiviert, wurde zunächst *UFO*-Expression im Keimlingsstadium von *stm*-Mutanten analysiert. Dazu wurde das *UFO::GFP*-Reportergen durch Kreuzung in den *stm-5*-mutanten Hintergrund gebracht und die GFP-Expression in Pflanzen der F2-Generation unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In keinem der für *stm-5* homozygoten Keimlinge konnte GFP-Expression unter der Kontrolle des *UFO*-Promotors nachgewiesen werden. In allen Geschwisterpflanzen, die heterozygot für *stm-5* oder wildtypisch waren, wurde GFP-Expression im *UFO*-Muster detektiert (Abb. 3.10; A). Die Anwesenheit des *UFO::GFP*-Transgens in den untersuchten Pflanzen wurde durch Kanamycin-Selektion bestätigt.

Das Ergebnis läßt – wie im Falle von WUS – den Schluß zu, daß auch funktionsfähiges STM-Protein für die Expression des *UFO*-Gens essentiell ist. Es läßt sich jedoch nicht schließen, ob *STM* ein direkter positiver Regulator der *UFO*-Expression ist, oder ob *UFO*-Expression von STM abhängig ist, weil *STM* eine grundsätzliche Funktion in der frühen Meristementwicklung spielt. Auch hier wurden Fehlexpressions-Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob *STM* allein die Expression von *UFO* aktivieren kann.

3.2.3.2 Ektopische Expression von *STM* reicht nicht aus, um *UFO* in allen Geweben zu aktivieren

Dafür wurde die Expression von *UFO* in transgenen Pflanzen untersucht, in denen *STM* unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors exprimiert wird. Auch hier wurde eine induzierbare Version verwendet (*35S::STM-GR*, Brand et al., 2002). *35S::STM-GR*-Pflanzen wurden mit dem *MHUFOD1*-Pflanzen gekreuzt und die F₂-Generation vor und nach der Induktion untersucht. Uninduzierte Pflanzen exprimierten das Reportergen im wildtypischen Muster (Abb. 3.10; B, C). Im Keimlingsstadium induzierte *35S::STM-GR/MHUFOD1*-Pflanzen produzierten eine große Anzahl kleiner, gelappter Blätter mit ektopischen Stipeln. Auf den adaxialen Blattoberflächen wurden ektopische Meristeme gebildet.

Sollte *STM* allein für die Aktivierung der *UFO*-Expression ausreichen, würde man in diesen Pflanzen Expression des *UFO*-Reportergens in allen Geweben erwarten. Dies war nicht der Fall.

Das *UFO*-Reportergen wurde im Sproßmeristem und in ektopischen Meristemen stark exprimiert. Zum Teil war *UFO::GUS*-Expression auch in den Leitbündeln vorhanden; allerdings nie in der gesamten Pflanze (Abb. 3.10; D, E). Daraus kann geschlossen werden, daß Expression von *STM* allein nicht ausreicht, um *UFO*-Expression zu aktivieren. Die starke Expression des Reportergens in ektopischen Meristemen weist allerdings darauf hin, daß *STM* zumindest einen verstärkenden Effekt auf die Expression von *UFO* ausübt. Eine Erklärung für die Beschränkung der *STM*-Expression auf meristematische Gewebe könnte sein, daß *STM* zwar *UFO*-Expression aktiviert, für die Aktivierung der Expression aber meristematische Kofaktoren benötigt.

3.2.3.3 *STM* ist kein direkter Aktivator der *UFO*-Expression

Um die Rolle von *STM* bei der Aktivierung der *UFO*-Expression weiter zu untersuchen, wurde ein Transgen verwendet, in dem das *STM*-Protein mit der starken viralen Transkriptions-Aktivierungsdomäne VP16 (Triezenberg et al., 1988; Cousens et al., 1989) fusioniert wurde und damit konstitutiv aktiv ist. Durch die konstitutive Aktivität des Fusionsproteins kann die Notwendigkeit einer Anwesenheit von gewebespezifischen Kofaktoren umgangen werden. Das Fusionsprotein wird unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors exprimiert (pAF51; *35S::STM-VP16*; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A.G. Fernandez und M.K. Barton, Madison, USA).

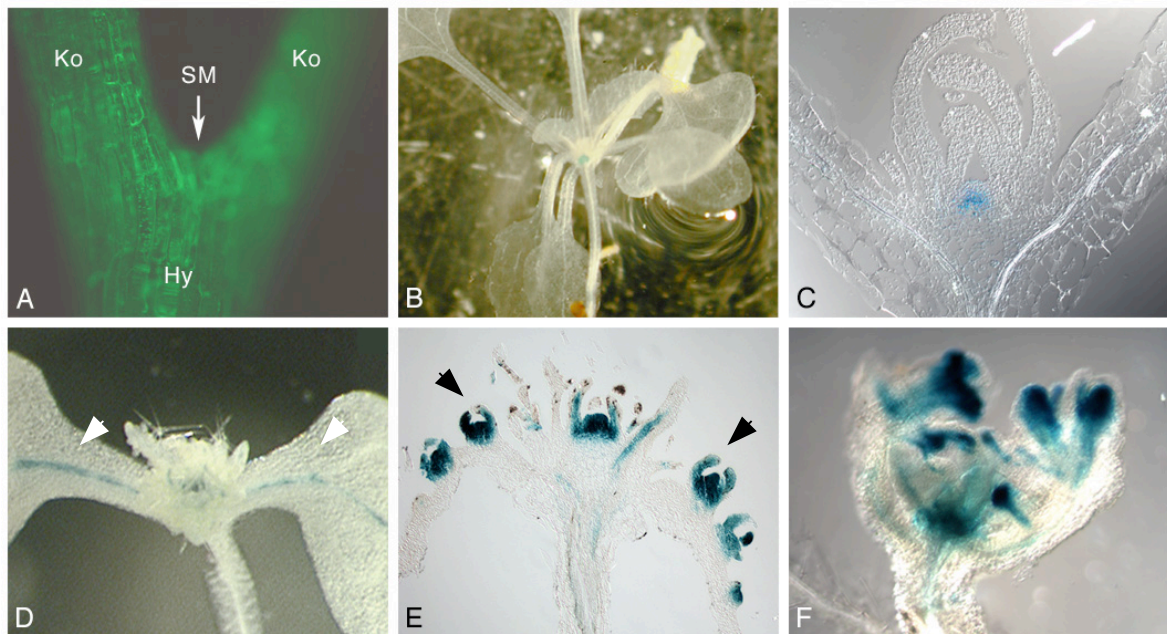


Abb. 3.10: Abhängigkeit der *UFO*-Expression von *STM*. **A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines *UFO::GFP* x *stm-5*-Keimlings. Keine GFP-Expression unter Kontrolle des *UFO*-Promotors. Ko: Kotyledonen; Hy: Hypokotyl; SM: Sproßmeristem **B-E:** *35S::STM-GR* x *MHUFOD1*; GUS-Färbungen. **B, D:** Übersicht; **C, E:** Längsschnitte. **B, C:** Ohne Dexamethason-Induktion wird das *UFO*-Reporter gen im wildtypischen Muster exprimiert. **D, E:** Dexamethason-induzierte *35S::STM-GR* x *MHUFOD1*-Pflanzen exprimieren das *UFO*-Reporter gen in Leitbündeln (weiße Pfeile) und ektopischen Meristemen (schwarze Pfeile). **F:** *35S::STM-VP16/MHUFOD1*; GUS-Färbung. Starke *UFO::GUS*-Expression in ektopischen Meristemen. Das *UFO*-Reporter gen wird jedoch nicht in allen Geweben exprimiert.

Das Transgen wurde in *MHUFOD1*-Pflanzen gebracht und die T1-Generation durch GUS-Färbung auf die Expression des *UFO*-Reporter gens untersucht. Bei einer direkten Aktivierung von *UFO* durch *STM* sollte das *UFO*-Reporter gen durch die Aktivität der VP16-Domäne in allen Geweben exprimiert werden.

Die transgenen Pflanzen zeigten eine Verdickung des Hypokotyls und produzierten gestreckte Kotyledonen und kleine, schmale Blätter. Auf den Oberflächen von Blättern und Kotyledonen befand sich eine große Anzahl ektopischer Meristeme. In diesen Meristemen und im Sproßmeristem wurde das *UFO*-Reportergen stark exprimiert; allerdings beschränkte sich die Expression auf diese Gewebe (Abb. 3.10; F). Im Hypokotyl und in der Wurzel konnte keine GUS-Aktivität beobachtet werden. Daraus läßt sich schließen, daß das STM-VP16-Fusionsprotein (und damit wahrscheinlich auch *STM*) *UFO*-Expression nicht direkt aktiviert. Somit wirkt *STM* also möglicherweise durch die Aktivierung von positiven Regulatoren der *UFO*-Expression.

3.3 Regulation der *UFO*-Expression durch *cis*-Sequenzen

Um *cis*-regulatorische Sequenzen im 3,7 kb umfassenden *UFO*-Promotor zu identifizieren, wurden einerseits Datenbanksuchen und Sequenzvergleiche durchgeführt, andererseits wurden eine Deletionsanalyse mithilfe von transgenen Pflanzen, in die verschiedene Promotorfragment/Reportergen-Fusionen eingebracht wurden, durchgeführt.

3.3.1 Suche nach regulatorischen Elementen anhand von Sequenzdaten

Zur Identifikation konservierter regulatorischer Elemente wurde zunächst die Sequenz des *UFO*-Promotors mit den Promotorsequenzen zweier potentiell orthologer Gene aus anderen Spezies verglichen. Diese Strategie geht von der Beobachtung aus, daß die Regulation der Genexpression in vielen Fällen zwischen verwandten Spezies evolutiv konserviert ist (Hong et al., 2003). Durch die zum Teil hohe Homologie von Transkriptionsfaktoren können auch deren DNA-Bindungsmotive in Promotorsequenzen konserviert sein. Dieses Verfahren wurde erfolgreich bei einer Studie zur Identifizierung regulatorischer Elemente im Promotor des Blütenorganidentitätsgens *AP3* angewandt (Hill et al., 1998). Anhand hochkonservierter Regionen in den verglichenen, im allgemeinen nicht konservierten Promotorsequenzen konnten die Autoren dieser Studie distinkte regulatorische Elemente identifizieren.

In dieser Arbeit wurden die Promotoren des *UFO*-Orthologs *FIMBRIATA* (*FIM*) aus *Antirrhinum majus* und ein Teil der Promotorsequenz des potentiellen *UFO*-Orthologs aus *Brassica oleracea* (im folgenden mit *BoUFO* bezeichnet) als Vergleichssequenzen verwendet. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme *Compare* und *DotPlot* aus

dem Wisconsin GCG Package analysiert. Die *FIMBRIATA*-Promotorsequenz wurde von Dr. Rüdiger Simon und Dr. E. S. Coen (John Innes Center, Norwich, UK) zur Verfügung gestellt.

3.3.1.1 Vergleich *UFO*-Promotor/*Brassica-UFO*-Promotor-Sequenz

Zunächst wurde genomische DNA aus Blumenkohl, einer Zuchtform von *Brassica oleracea*, isoliert. Mithilfe der auf Basis der *Arabidopsis UFO*-Promotor-Sequenz ausgewählten Oligonukleotide BoUFOpr2 und BoUFOpr4 als 5'-Primer und BoUFO1 als 3'-Primer konnten zwei überlappende Fragmente des Promotors von *BoUFO* amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden in pCRII-TOPO kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe des Programms *SeqMan* aus dem *Lasergene*-Softwarepaket zusammengefügt. Es wurden 1237 bp 5' des Startcodons von *BoUFO* erhalten. Diese wurden mit dem Programm *Compare* (Parameter: Fenster: 21, Stringenz: 14) mit den 1200 in 5'-Richtung des Startcodons gelegenen Basenpaaren des *UFO*-Promotors verglichen und das Ergebnis in einem *Dotplot*-Graphen dargestellt (Abb. 3.11, A). Bereiche mit großer Sequenzhomologie werden in diesem Graph als diagonale Linie sichtbar.

Aufgrund der insgesamt hohen Homologie der beiden Sequenzen konnte kein Rückschluss auf zwischen den beiden Spezies konservierte regulatorische Elemente gezogen werden. Die hohe Homologie der beiden Sequenzen könnte darauf hinweisen, daß die gesamte untersuchte Region eine entscheidende Rolle bei der transkriptionellen Regulation des *UFO*-Gens spielt; andererseits könnte auch die nahe Verwandtschaft der beiden Spezies die Ursache der hohen Konservierung über die gesamte Sequenz sein.

3.3.1.2 Vergleich *UFO*-Promotor/*FIM*-Promotor

In einem weiteren Ansatz wurde die *FIM*-Promotorsequenz mit der des *UFO*-Promotors verglichen. Dazu wurden eine 3407 bp umfassende, 5' des *FIM*-Transkriptionsstarts gelegene Sequenz mithilfe des Programms *Compare* (Parameter: Fenster: 21, Stringenz: 14) mit der 3733 bp umfassenden *UFO*-Promotorsequenz abgeglichen und das Ergebnis als *Dotplot*-Graph dargestellt (Abb. 3.11, B). Im Allgemeinen konnten keine weitreichenden konservierten Bereiche identifiziert werden. Allerdings konnte ein 35 bp umfassendes Sequenzmotiv identifiziert werden, das eine Sequenzidentität von 80% aufwies (27 von 35

bp; Abb. 3.11, C). Dieses Sequenzmotiv (im folgenden mit *UFO/FIM*-Box bezeichnet) befindet sich im *UFO*-Promotor an der Position zwischen -881 und -847; im *FIM*-Promotor zwischen -204 und -170. Die hohe Sequenzhomologie dieses Motivs kann im Kontext der beiden ansonsten sehr wenig konservierten Promotoren als Hinweis auf ein konserviertes regulatorisches Element gedeutet werden.

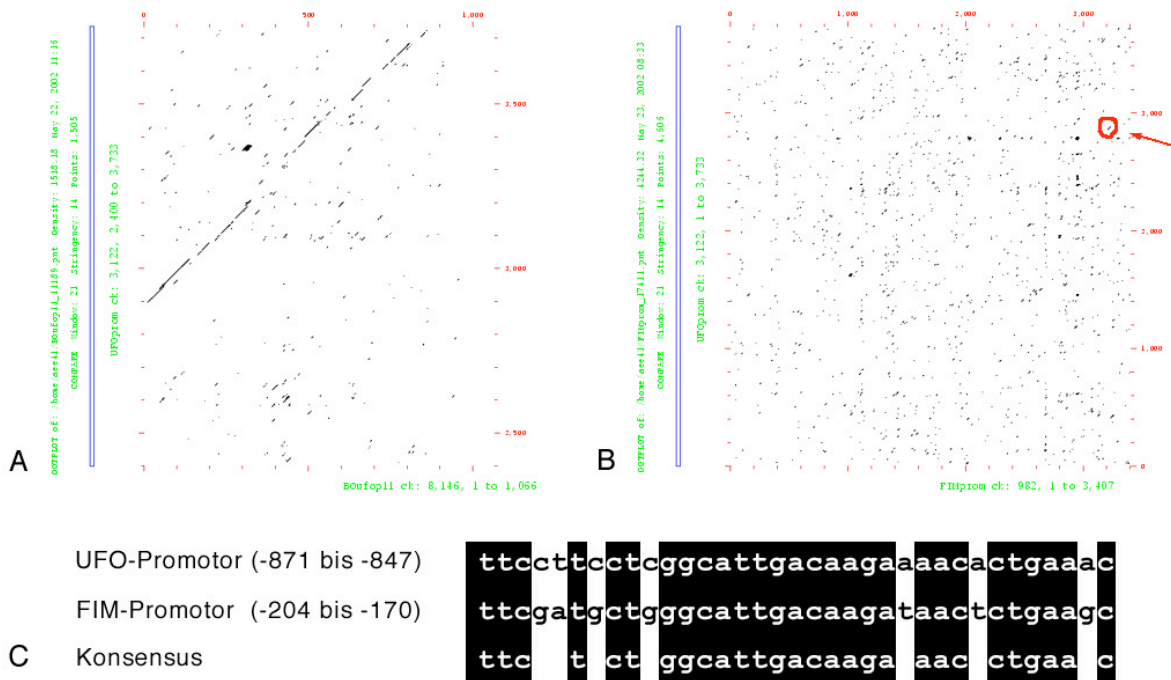


Abb. 3.11: Vergleich der UFO-Promotorsequenz mit den Promotoren von BoUFO und FIM. A,B: *Dotplot*-Graphen des Vergleichs der Promotorsequenzen von **A**: *UFO / BoUFO*; **B**: *UFO / FIM*. Diagonale Linien zeigen Bereiche an, in denen die Sequenz konserviert ist. **A**: Auf der x-Achse ist die Sequenz von -1 bis -1066 des *BoUFO*-Promotors dargestellt; auf der y-Achse die Sequenz von -1 bis -1233 des *UFO*-Promotors. Die untersuchten Teilsequenzen der Promotoren weisen einen hohen Grad an Konservierung auf. **B**: Auf der x-Achse ist die Sequenz von -1 bis -3407 des *FIM*-Promotors dargestellt, auf der y-Achse die Sequenz des *UFO*-Promotors. Im Allgemeinen läßt sich keine Konservierung der Sequenzen ablesen. Ein 35 bp langer Sequenzabschnitt mit hoher Homologie ist durch einen roten Kreis (Pfeil) gekennzeichnet. **C**: Sequenz und Position des konservierten Motivs zwischen *UFO*-Promotor und *FIM*-Promotor. 27 der 35 Basen (80%) sind identisch.

3.3.1.3 Datenbanksuchen nach bekannten Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven

Die *UFO*-Promotorsequenz wurde zusätzlich auf das Vorhandensein bekannter Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive untersucht. Dafür wurde die Sequenz einem

Datenbankabgleich mit Hilfe der *PLACE Signal Scan* Software unterzogen. Desweiteren wurden bekannte Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive mit Hilfe der Suchfunktionen des Programms *Editseq* aus dem *Lasergene*-Softwarepaket gesucht.

Die Rolle von *API* als Aktivator der *UFO*-Expression in Blüten – wird *UFO*-Expression durch MADS-Box-Transkriptionsfaktoren reguliert?

Aufgrund der Beobachtung, daß Funktionsverlust-Mutationen in *APETALAI* (*API*), einem MADS-Box-Transkriptionsfaktor, einen Verlust der *UFO*-Expression in Blüten nach Stadium 3 zur Folge haben (Lee et al., 1997), kann angenommen werden, daß *API* an potentielle Bindungsmotive für MADS-Box-Transkriptionsfaktoren (sogenannte CARG-Boxen; Schwarz-Sommer et al., 1992; Wynne und Treisman, 1992; Huang et al., 1993; Shiraishi et al., 1993) im *UFO*-Promotor bindet und *UFO*-Expression in Blüten reguliert. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde zunächst die Expression des *UFO*-Reportergens *MHUF01* in *ap1*-mutanten Infloreszenzen durch GUS-Färbungen und *in situ*-Hybridisierung genauer untersucht und mit der Expression des Reporter gens im Wildtyp verglichen. Dafür wurden durch Kreuzung hergestellte *ap1-1* x *MHUF01*-Pflanzen verwendet.

Die GUS-Färbungen zeigten, daß das Reporter gen in *ap-1*-mutanten Pflanzen in Blüten, die älter waren als Stadium 2, nicht exprimiert wurde (Abb. 3.12, C). Vielmehr schien sich die Expression auf das Infloreszenzmeristem zu beschränken. Um eine genauere Auflösung zu erreichen, wurden an Infloreszenzen dieser Pflanzen *in situ*-Hybridisierungen mit GUS-Antisense-RNA-Sonden durchgeführt. Expression des Reporter gens konnte im wildtypischen *UFO*-Muster im Infloreszenzmeristem und in seltenen Fällen auch in Blüten des frühen Stadium 2 nachgewiesen werden (Abb. 3.12; E, F). Blüten späterer Entwicklungsstadien exprimierten das Reporter gen nicht. Daraus kann geschlossen werden, daß *UFO* in *ap1*-mutanten Blüten – wenn überhaupt – nur in einem sehr frühen Entwicklungsstadium exprimiert wird und *API* zumindest formal als Aktivator der *UFO*-Expression in Blüten gesehen werden kann. Die Beobachtung, daß nur wenige Blütenprimodien des Stadium 2 das Reporter gen exprimieren, könnte daraus resultieren, daß in *ap1*-Mutanten eine Störung der Identität von Blütenmeristemen vorliegt; diese zeigen teilweise Eigenschaften von Sproßmeristemen. ZITAT

Es ist also möglich, daß die Aktivierung von *UFO* in Blütenmeristemen durch die Bindung

des AP1-Proteins an CArG-Motive im *UFO*-Promotor zustande kommt. Daher wurde CArG-Box-Motiven bei den Datenbanksuchen nach Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven besondere Aufmerksamkeit gegeben.

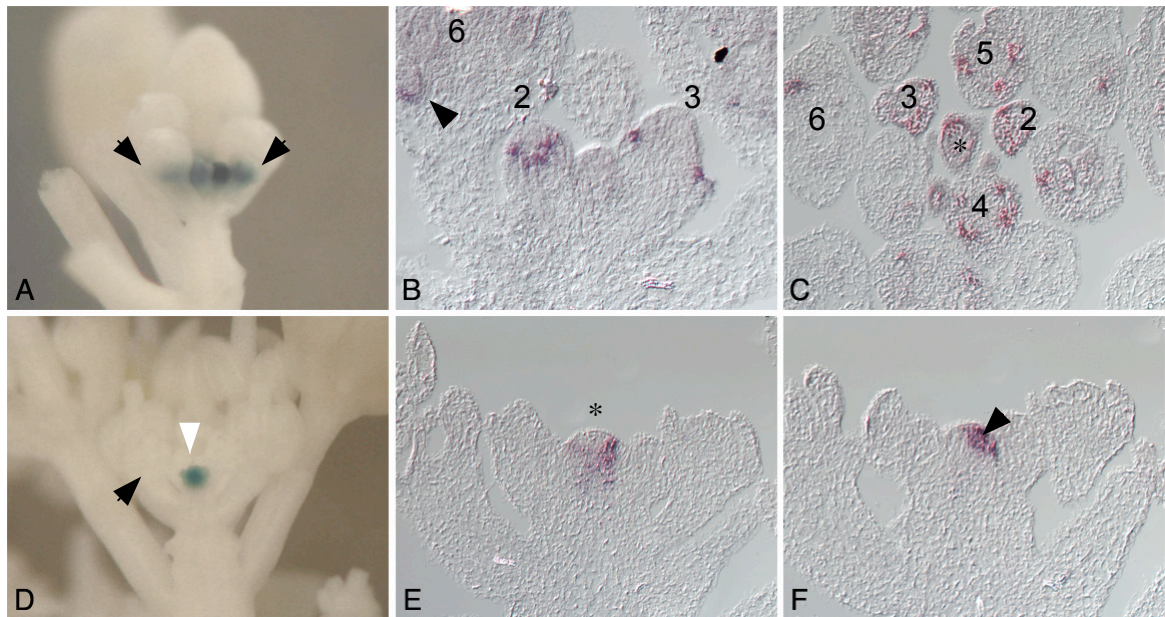


Abb. 3.12: Vergleich der Expression des *UFO*-Reportergens *pMHUFO1* im Wildtyp und in *ap1-1*-Mutanten. A-C: Wildtyp/*pMHUFO1*; D-F: *ap1-1* x *pMHUFO1*. A: GUS-Färbung der Infloreszenz einer *pMHUFO1*-Pflanze. GUS-Aktivität ist in Blütenprimordien verschiedener Entwicklungsstadien vorhanden (Pfeilspitzen). B, C: *In situ*-Hybridisierungen mit *GUS*-Antisense-RNA-Sonden. Die Entwicklungsstadien der Blütenprimordien sind durch Zahlen angegeben. B: Längsschnitt; *GUS*-RNA ist in Blütenprimordien der Stadien 2, 3 und 6 (an der Basis der Petalenprimordien; Pfeilspitze) vorhanden. C: Querschnitt; *GUS*-RNA wurde im Infloreszenzmeristem (Stern) und in Blütenprimordien der Stadien 2 bis 6 nachgewiesen. D: GUS-Färbung der Infloreszenz einer *ap1-1* x *MHUFO1*-Pflanze. *UFO::GUS*-Expression ist im Infloreszenzmeristem (weiße Pfeilspitze), aber nicht in Blüten (schwarze Pfeilspitze) vorhanden. E, F: *In situ*-Hybridisierungen mit *GUS*-Antisense-RNA-Sonden. *GUS*-RNA wurde im Infloreszenzmeristem (E, Stern) und in seltenen Fällen in Blütenprimordien des frühen Stadium 2 (F, Pfeilspitze) nachgewiesen.

Der *UFO*-Promotor beinhaltet mehrere CArG-Boxen

In der *UFO*-Promotorsequenz konnten mehrere potentielle MADS-Box-Bindungsmotive identifiziert werden (Bezeichnung und Position siehe Tab.3.4 und Abb.3.13). Darunter befinden sich zwei Motive, die der engeren Definition des CArG-Motivs (C(A/T)₆)GG entsprechen. Diese befinden sich an den Positionen -1765 bzw. -809. Sechs weitere CArG-ähnliche Motive mit der Sequenzabfolge C(A/T)₈G (CArGCW₈-Motiv) wurden

identifiziert (Tab. 3.4). Für diese Variation des CArG-Motivs konnte gezeigt werden, daß das MADS-Box-Protein AGL15 an entsprechende Sequenzen bindet (Tang et al., 2003). Es besteht die Möglichkeit, daß weitere, nicht näher charakterisierte MADS-Box-Transkriptionsfaktoren an diese Sequenzen binden.

Bezeichnung	Motiv	Sequenz	Position
CArG1	C(AT) ₆ GG	CAAATAAGG	-1734
CArG2	C(AT) ₆ GG	CCATTATAG	-1017
CArGCW ₈ -1	C(AT) ₈ G	CTATAATTTG	-3412
CArGCW ₈ -2	C(AT) ₈ G	CTAAAAATGG	-3039
CArGCW ₈ -3	C(AT) ₈ G	CCTTAAATAAG	-2168
CArGCW ₈ -4	C(AT) ₈ G	CATTAAATTG	-1751
CArGCW ₈ -5	C(AT) ₈ G	CAAATTTTG	-777

Tab. 3.4: Potentielle Bindungsmotive für MADS-Box-Transkriptionsfaktoren. Bezeichnung, Typ, Sequenz und Position der einzelnen Motive sind angegeben.

Interessanterweise befindet sich ein CArGCW₈-Motiv in unmittelbarer Nähe eines der beiden klassischen CArG-Motive. Die erste Base von Motiv CArGCW₈-4 liegt 9 bp 5' von Motiv CArG1; möglicherweise handelt es sich bei diesen beiden Motiven um gekoppelte MADS-Box-Bindungsmotive. Abb. 3.13 zeigt eine Übersicht über die Lage der einzelnen Motive im *UFO*-Promotor.

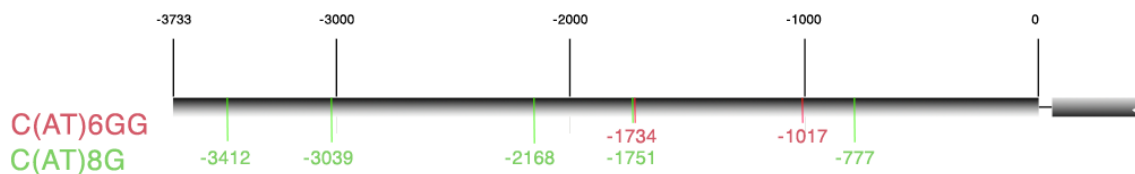


Abb. 3.13: Lage der identifizierten CArG-Motive (C(AT)₆GG) und CArGCW₈-Motive (C(AT)₈G) im *UFO*-Promotor. CArG-Motive sind in rot dargestellt, CArGCW₈ in grün. Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf die letzte Base der in *pMHUFO1* am 3'-Ende des *UFO*-Promotors eingeführten XbaI-Schnittstelle und die jeweils erste Base der Motive.

Weitere Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive

Die Datenbanksuchen nach bekannten pflanzlichen Transkriptionsfaktor-Bindestellen ergaben eine Vielzahl potentieller Bindungsmotive. Da viele dieser Motive aus kurzen Segmenten mit vier Basenpaaren bestehen und diese Basenparkombinationen schon

aufgrund zufälliger Verteilung häufig vorkommen, ist dies bei der Beurteilung der Relevanz der einzelnen Motive zu beachten. So konnten unter anderem allein 17 GATA-Box-Motive und 13 potentielle Bindungsmotive für MYC-Transkriptionsfaktoren (Konsensussequenz: GANNTG) gefunden werden. GATA-Box-Motive spielen in Pflanzen bei der Regulation einer Reihe unterschiedlicher Gene eine Rolle und kontrollieren unter anderem die Expression lichtspezifischer und gewebespezifischer Gene (Teakle et al., 2002). Aufgrund der einfachen Konsensussequenz und der gleichmäßigen Verteilung der GATA- und MYC-Motive in der *UFO*-Promotosequenz werden diese hier nicht näher behandelt.

Bezeichnung / Motiv	Sequenz	Position	Literaturangabe
Myb1At / WAACCA	AAACCA	-3032 / (-)	Abe et al., 2003
Myb1At / WAACCA	AAACCA	-2916 / (-)	Abe et al., 2003
Myb1At / WAACCA	TAACCA	-2818 / (+)	Abe et al., 2003
Myb1At / WAACCA	AAACCA	-2313 / (-)	Abe et al., 2003
Myb1At / WAACCA	AAACCA	-1493 / (+)	Abe et al., 2003
Myb2At / TAACTG	TAACTG	-2512 / (-)	Urao et al., 1993
Myb2ConsensusAt / YAACKG	CAACTG	-3389 / (-)	Abe et al., 2003
Myb2ConsensusAt / YAACKG	TAACGG	-673 / (-)	Abe et al., 2003
Myb2ConsensusAt / YAACKG	CAACTG	-505 / (+)	Abe et al., 2003
MybCore / CNGTTR	CTGTTA	-2849 / (+)	Urao et al., 1993
MybPlant / MACCWAMC	CACCAAAC	-752 / (+)	Sablowski et al., 1994
MybPlant / MACCWAMC	CACCAACC	-360 / (-)	Sablowski et al., 1994

Tab. 3.5: Auflistung der potentiellen Myb-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive im *UFO*-Promotor.

Die Bezeichnungen entsprechen der Annotierung in der PLACE-Datenbank. W = A/T; Y = C/T; K = G/T; N = A/C/G/T; R = A/G; M = A/C. (+) = Orientierung in 5'-3'-Richtung; (-) = Orientierung in 3'-5'-Richtung. Die Literaturangaben beziehen sich auf die Identifizierung der entsprechenden Motive in *Arabidopsis*.

Zusätzlich konnten 12 potentielle Myb-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive identifiziert werden, unter anderem potentielle Bindungsstellen für AtMyb1 und AtMyb2. Für diese Myb-Transkriptionsfaktoren wurde gezeigt, daß sie eine Rolle bei der Aktivierung von Genen, die die Signaltransduktion des Pflanzenhormons Abscisinsäure betreffen, spielen (Abe et al., 2003). Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß andere, bislang uncharakterisierte Myb-Transkriptionsfaktoren an dieselben Motive binden können und damit auch bei der Aktivierung der *UFO*-Expression eine Rolle spielen. Tabelle 3.5 zeigt eine Übersicht über die identifizierten potentiellen Myb-Bindungsmotive im *UFO*-Promotor.

Aufgrund der oben beschriebenen Aktivierung der *UFO*-Expression durch *WUS* wurde auch nach potentiellen *WUS*-Bindungsmotiven gesucht. Bislang wurde nur ein solches Motiv beschrieben; *WUS* bindet an das Sequenzmotiv TTAAT(G/C)(G/C) im zweiten Intron des *AG*-Gens und aktiviert dort kooperativ mit *LFY* die *AG*-Expression (Lohmann et al., 2001). Im *UFO*-Promotor ist dieses Sequenzmotiv nicht vorhanden. Es ist aber möglich, daß *WUS* an andere, bislang unbekannte Motive bindet.

An der Position –3238 befindet sich ein potentiell Bindungsmotiv für das Homöodomänen-Protein AtHB6 mit der Sequenz CAATTAATTA (Himmelbach et al., 2002). Das könnte auf eine Bindung des AtHB6-Proteins an den *UFO*-Promotor hinweisen. Möglicherweise repräsentiert das Motiv aber auch eine potentielle Bindestelle für andere Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren. Dafür spricht, daß AtHB6 als Aktivator von Genen der Abscisinsäure-Signaltransduktion nicht unbedingt eine Rolle in der Kontrolle der *UFO*-Expression spielen muß.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die Datenbanksuchen allein keine endgültige Aussage über die Relevanz der potentiellen Bindungsmotive gemacht werden kann. Allerdings können diese Daten bei der Interpretation der Ergebnisse einer Promotor-Deletionsanalyse hilfreich sein.

3.3.2 Deletionsanalyse des *UFO*-Promotors

Um cis-regulatorische Elemente im *UFO*-Promotor anhand von Modifikationen des *UFO*-Expressionsmodells zu identifizieren, wurde eine Promotor-Deletionsanalyse durchgeführt. Dafür wurde in transgenen Pflanzen das *GUS*-Reportergen (*uidA*) unter Kontrolle verschiedener *UFO*-Promotorfragmente exprimiert und die Expressionsmuster der verschiedenen Deletionsderivate untersucht. Abb. 3.14 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Deletionsderivate. Die transgenen Pflanzen wurden entsprechend der die Deletionsderivate enthaltenden Plasmide, mit denen sie transformiert wurden, bezeichnet (Deletionsderivat *pMHUFO1* / transgene Pflanze *MHUFO1*). In den folgenden Abbildungen sind die jeweils verwendeten Deletionsderivate schematisch dargestellt.

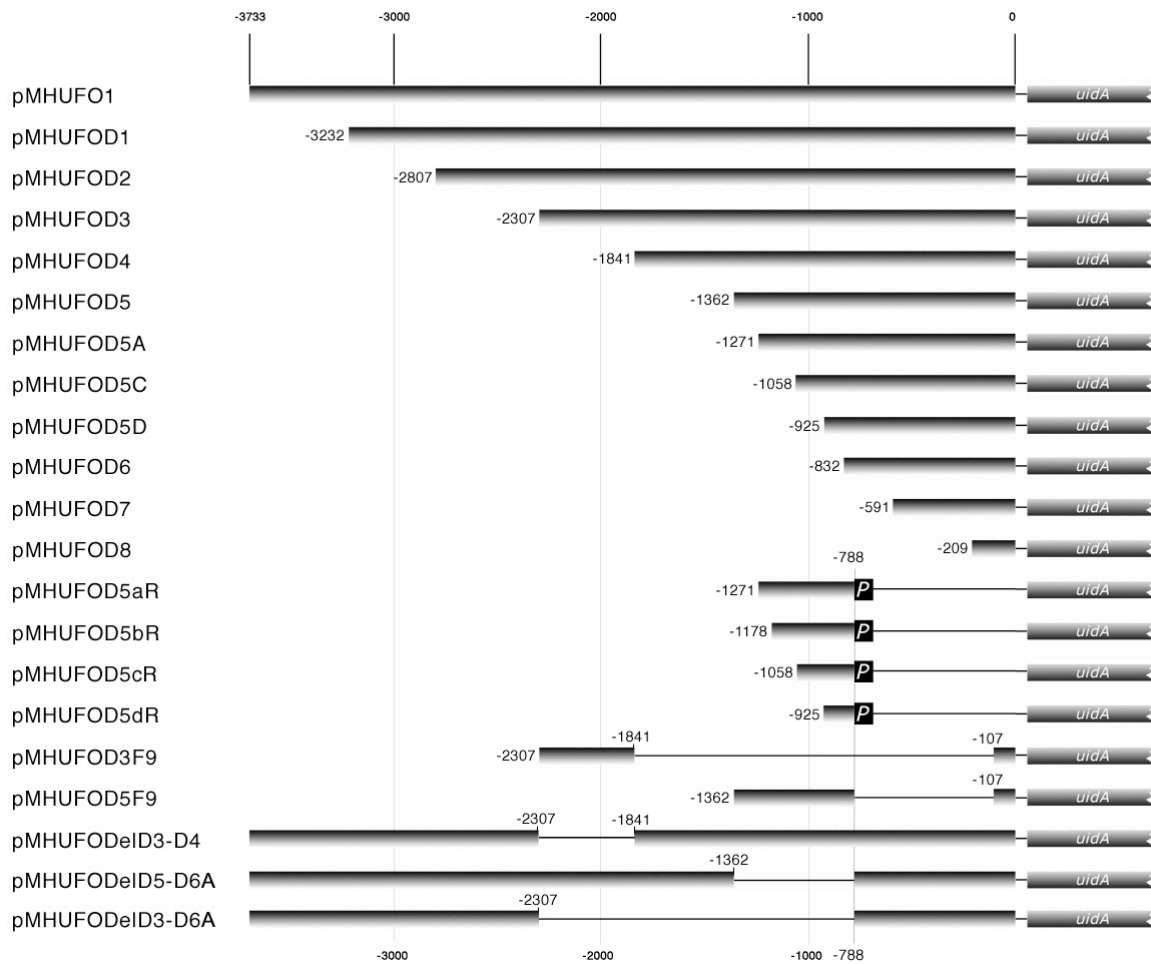


Abb. 3.14: Schematische Übersicht über die verwendeten Promotor-Deletionsderivate. Die Positionsangaben (Zahlen) beziehen sich auf die letzte Base der in *pMHUFO1* am 3'-Ende des *UFO*-Promotors eingeführten *XbaI*-Schnittstelle. P: *CaMV35S*-Minimalpromotor.

3.3.2.1 *MHUFO1*, *MHUFOD1* und *MHUFOD2* zeigen das wildtypische Muster

In *MHUFO1*-Pflanzen konnte ein GUS-Expressionsmuster nachgewiesen werden, das dem wildtypischen *UFO*-Expressionsmuster entspricht. Dies wurde durch GUS-Färbungen gezeigt und durch *in situ*-Hybridisierung mit einer *GUS*-Antisense-RNA Sonde bestätigt. *GUS*-Expression konnte in der Embryogenese, in Keimlingen, vegetativen Sproßapices sowie in Infloreszenz- und Blütenmeristemen im wildtypischen Muster nachgewiesen werden. *MHUFOD1* und *MHUFOD2*-Pflanzen zeigten in keinem Entwicklungsstadium von Sproß- und Blütenmeristemen eine Veränderung des wildtypischen *UFO*-Expressionsmusters. Das läßt darauf schließen, daß sich in der Sequenz zwischen -3733 bis

–2807 keine entscheidenden cis-regulatorischen Elemente befinden. Abbildung 3.15 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse.

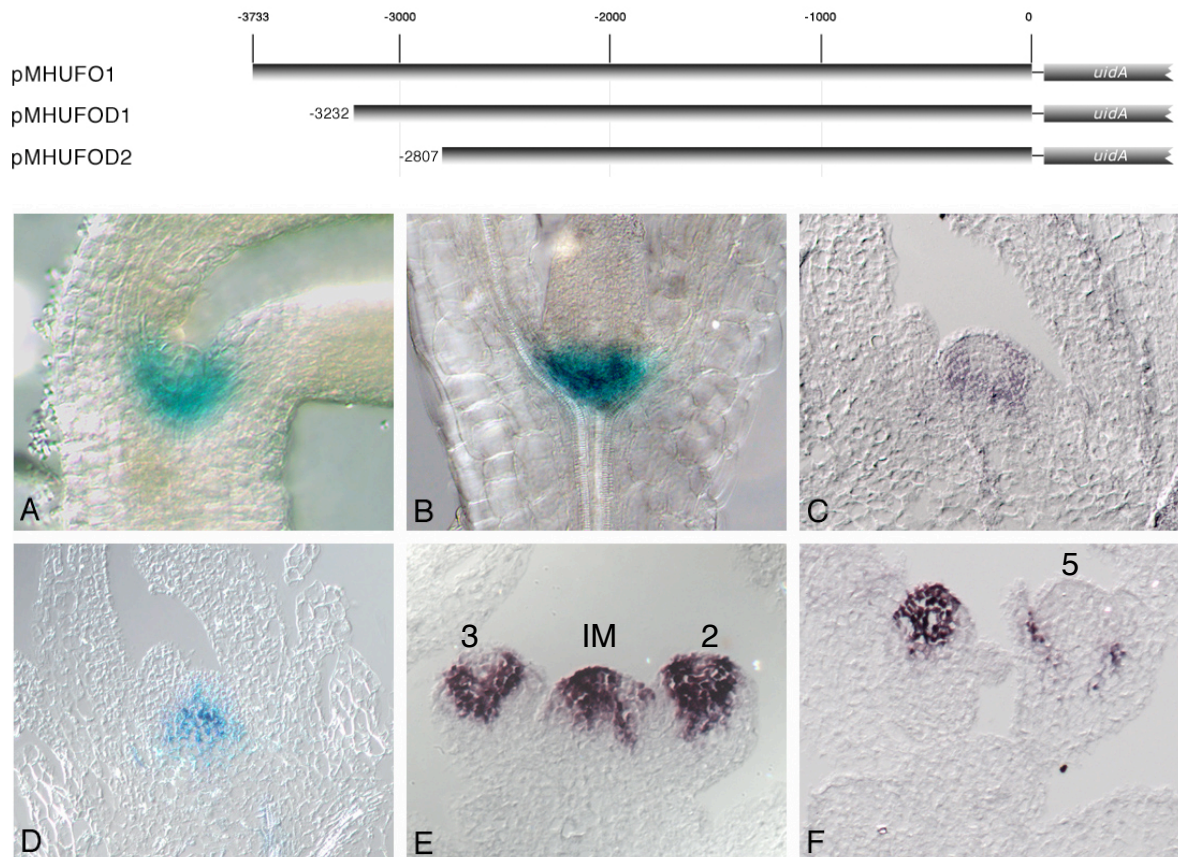


Abb. 3.15: MHUFO1, MHUFOD1 und MHUFOD2 zeigen das wildtypische UFO-Expressionsmuster. Expression des *UFO*-Reportergens *MHUFO1* (A-C) sowie der Deletionsderivate *MHUFOD1* (D) und *MHUFOD2* (E, F). **A:** Reifer Embryo; GUS-Expression im *UFO*-Muster im Sproßmeristem. **B:** Keimlingsstadium; GUS-Expression im Sproßmeristem. **C:** Längsschnitt durch ein vegetatives Meristem. GUS-Expression wurde durch RNA-*in situ*-Hybridisierung mit einer *GUS*-Antisense-RNA-Sonde detektiert. **D:** GUS-Expression im vegetativen Meristem; Längsschnitt. **E, F:** GUS-Expression im Infloreszenzmeristem und in Blüten verschiedener Entwicklungsstadien (Stadien sind durch Zahlen angegeben); RNA-*in situ*-Hybridisierungen mit *GUS*-Antisense-RNA-Sonden. **E:** Expression im Infloreszenzmeristem (IM) und in Blüten der Stadien 2 und 3. **F:** GUS-Expression in einem frühen Blütenprimordium und an der Basis der Petalen-Primordien einer Blüte des Stadium 5.

3.3.2.2 *MHUFOD3* verliert Expression in Blüten nach Stadium 3

MHUFOD3-Pflanzen zeigten in keinem Entwicklungsstadium eine Veränderung des wildtypischen *UFO*-Expressionsmusters im Sproßmeristem. In Blütenmeristemen konnte allerdings keine *UFO*-Expression in späteren Stadien der Blütenentwicklung beobachtet werden: In Stadium 2 und 3 der Blütenentwicklung entsprach das Expressionsmuster dem

wildtypischen, in den nachfolgenden Stadien wurde das Reportergen nicht exprimiert (Abb. 3.16, A-C).

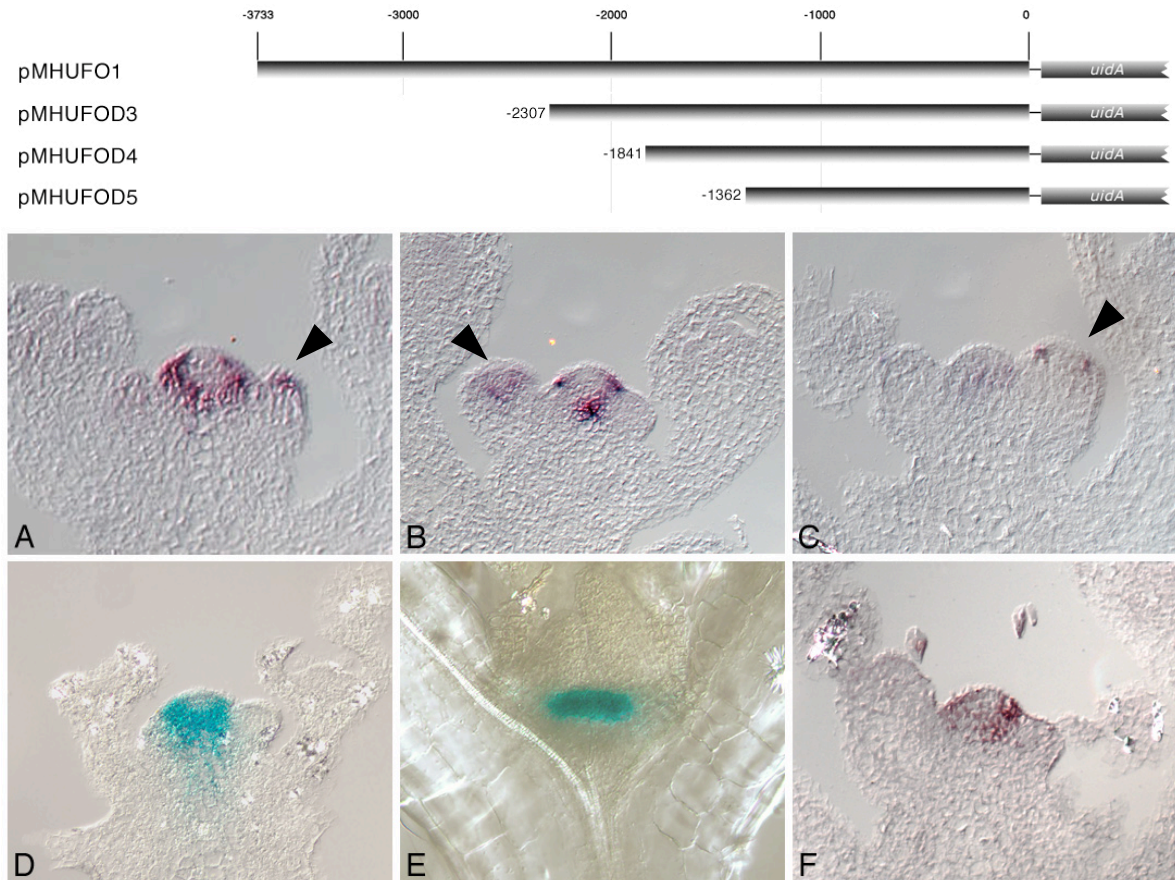


Abb. 3.16: *UFO::GUS* Expression in *MHUFOD3*, *MHUFOD4* und *MHUFOD5*. A-C: *MHUFOD3*; *In situ*-Hybridisierungen an Längsschnitten von Infloreszenzen von *MHUFOD3*-Pflanzen mit einer *GUS*-Antisense *RNA*-Sonde. **A: Das Expressionsmuster im Infloreszenzmeristem entspricht dem wildtypischen *UFO*-Expressionsmuster. *GUS*-Expression ist in einem Blütenprimordium des frühen Stadium 2 (Pfeilspitze) sichtbar. **B:** Neben der Expression im Infloreszenzmeristem wurde *GUS*-*RNA* im *UFO*-Muster in Blütenprimordien des späten Stadium 2 (Pfeilspitze) nachgewiesen. **C:** *GUS*-*RNA* wurde in Blütenprimordien des frühen Stadium 3 nachgewiesen (Pfeilspitze). In späteren Stadien der Blütenentwicklung konnte *GUS*-*RNA* nicht detektiert werden. **D:** *MHUFOD4*, *GUS*-Färbung einer Infloreszenz einer *MHUFOD4*-Pflanze; Längsschnitt. *GUS*-Aktivität im Infloreszenzmeristem; in Blüten wird das Reportergen nicht exprimiert. **E, F:** *MHUFOD5*. **E:** *whole mount*-*GUS*-Färbung eines *MHUFOD5*-Keimlings. Starke *GUS*-Aktivität im Sproßmeristem im wildtypischen *UFO*-Muster. **F:** *In situ*-Hybridisierung an einer Infloreszenz einer *MHUFOD5*-Pflanze (Längsschnitt) mit einer *GUS*-Antisense *RNA*-Sonde. *GUS*-*RNA* wurde im Infloreszenzmeristem im wildtypischen *UFO*-Muster detektiert. In Blüten wurde keine *GUS*-*RNA* nachgewiesen.**

Das läßt darauf schließen, daß sich in der Sequenz zwischen UFOD2 und UFOD3 (-2807 bis -2307) ein oder mehrere cis-regulatorische Elemente befinden, die *UFO*-Expression in Stadium 4-6 der Blütenentwicklung positiv regulieren.

3.3.2.3 *MHUFOD4* verliert Expression in Blüten vollständig

In *MHUFOD4*-Pflanzen entsprach das *GUS*-Expressionsmuster im Sproßmeristem in allen Entwicklungsstadien dem wildtypischen *UFO*-Expressionsmuster. In Blütenmeristemen wurde in keiner der untersuchten Pflanzen ($n > 100$) Expression des Reportergens nachgewiesen (Abb. 3.16, D). Das läßt zwei Schlüsse zu: Erstens kann gesagt werden, daß sich in der Sequenz zwischen UFOD3 und UFOD4 (-2307 bis -1841) ein oder mehrere cis-regulatorische Elemente befinden, die die *UFO*-Expression in Blütenprimordien früher Stadien kontrollieren.

Zweitens kann geschlossen werden, daß *UFO*-Expression in Blütenmeristemen und im Sproßmeristem voneinander trennbar sind und von verschiedenen cis-Elementen gesteuert wird.

3.3.2.4 *MHUFOD5* zeigt dasselbe Expressionsmuster wie *MHUFOD4*

Die Expression des Reportergens in *MHUFOD5*-Pflanzen unterschied sich nicht von der in *MHUFOD4*-Pflanzen (Abb. 3.16; F). Daher kann angenommen werden, daß sich im Sequenzabschnitt zwischen UFOD4 und UFOD5 (-1841 bis -1362) keine cis-regulatorischen Elemente befinden, die die Expression von *UFO* im Sproßmeristem beeinflussen.

Die T-DNA-Insertionslinie SALK_036804 zeigt einen schwachen *ufo*-Funktionsverlust-Phänotyp

Zieht man den vollständigen Verlust der *GUS*-Expression in Blüten von *MHUFOD4*- und *MHUFOD5*-Pflanzen in Betracht, sollte auch eine T-DNA-Insertion an dieser Position die Expression von *UFO* in Blüten unterbinden. Die T-DNA-Insertionslinie SALK_036804 (Alonso et al., 2003) trägt eine T-DNA-Insertion an Position -1590 des *UFO*-Promotors. Die Position der Insertion wurde durch PCR mit den Primern LBB1 und UFOD2 bestätigt. Pflanzen, die homozygot für diese Insertion sind, sollten also einen *ufo*-Funktionsverlust-Phänotyp zeigen.

Tatsächlich zeigten die Blüten homozygoter Pflanzen nur einen teilweisen Verlust von Petalen und Stamen (Abb. 3.17); dieser Phänotyp ist also schwächer als beim starken *ufo-2*-Allel: Petalen und Stamen waren vorhanden, jedoch in geringerer Anzahl als im Wildtyp. Dieses neue *ufo*-Allel wird im folgenden mit *ufo-15* bezeichnet.

Wie ist diese Diskrepanz zwischen Erwartung und Beobachtung zu erklären? Eine Möglichkeit ist, daß in *ufo-15* – anders als in *MHUFOD4* bzw. *pMHUFOD5* – eine Restaktivität des *UFO*-Promotors in Blüten vorhanden ist. Das könnte daran liegen, daß in der T-DNA-Linie – im Gegensatz zu den Deletionsderivaten – die 5´ der Insertion gelegene *UFO*-Promotorsequenz noch vorhanden ist. Möglicherweise können diese Sequenzen eine *UFO*-Restaktivität in Blüten gewährleisten.

Es könnte allerdings auch sein, daß in die in *MHUFOD4* und *MHUFOD5* verwendeten Promotorfragmente noch schwache *GUS*-Expression in Blüten aktivieren, die aber unterhalb der Nachweisgrenze für *in situ*-Hybridisierung bzw. *GUS*-Färbungen liegt. Diese schwache Expression könnte jedoch noch ausreichend sein, um die korrekte Spezifizierung einiger Petalen und Stamen zu gewährleisten. T-DNA



Abb. 3.17: Phänotyp homozygoter *ufo-15*-Mutanten. Die Pflanzen zeigen einen schwachen *ufo*-Funktionsverlust-Phänotyp. **A, B:** Infloreszenzen; die Blüten produzieren weniger Petalen und Stamen als der Wildtyp. **C:**Blüte. Der erste und vierte Wirtel sind wildtypisch. Im zweiten und dritten Wirtel sind nur eine Petale und drei Stamen vorhanden. Ein Stamen ist verkürzt (Pfeilspitze).

3.3.2.5 Die Sequenz zwischen –2307 und –1841 ist notwendig für *UFO*-Expression in Blüten (*MHUFODelD3-D4*)

Mit dem Deletionsderivat *MHUFODelD3-D4* wurde getestet, ob die zwischen *UFOD3* und *UFOD4* (-2307 bis -1841) gelegenen regulatorischen Elemente essentiell für die Expression von *UFO* in Blüten sind. Da in *MHUFOD4* zusätzlich die weiter 5´gelegenen

Sequenzen deletiert sind, könnte es sein, daß diese Sequenzen mitverantwortlich für *UFO*-Expression in Blüten sind.

Tatsächlich führte die Deletion der Sequenz zwischen -2307 und -1841 in *MHUFODelD3-D4* zu einem Verlust der GUS-Expression in Blüten. Das Expressionsmuster im Sproßmeristem blieb unverändert, allerdings war die Färbung relativ schwach (Abb. 3.18; A, B). Somit kann gesagt werden, daß die zwischen UFOD3 und UFOD4 gelegenen cis-Elemente essentiell für die Expression von *UFO* in Blüten sind. Interessanterweise wurde auch in Blüten späterer Entwicklungsstadien keine Expression gefunden. Das weist darauf hin, daß die zwischen UFOD2 und UFOD3 (-2807 bis -2307) liegenden, für die Blütenexpression in Stadium 4-6 notwendigen cis-Elemente von den Elementen zwischen UFOD3 und UFOD4 abhängig sind. Der Sequenzbereich zwischen -2307 und -1841 enthält also die für die *UFO*-Expression in Blüten grundlegenden cis-Elemente.

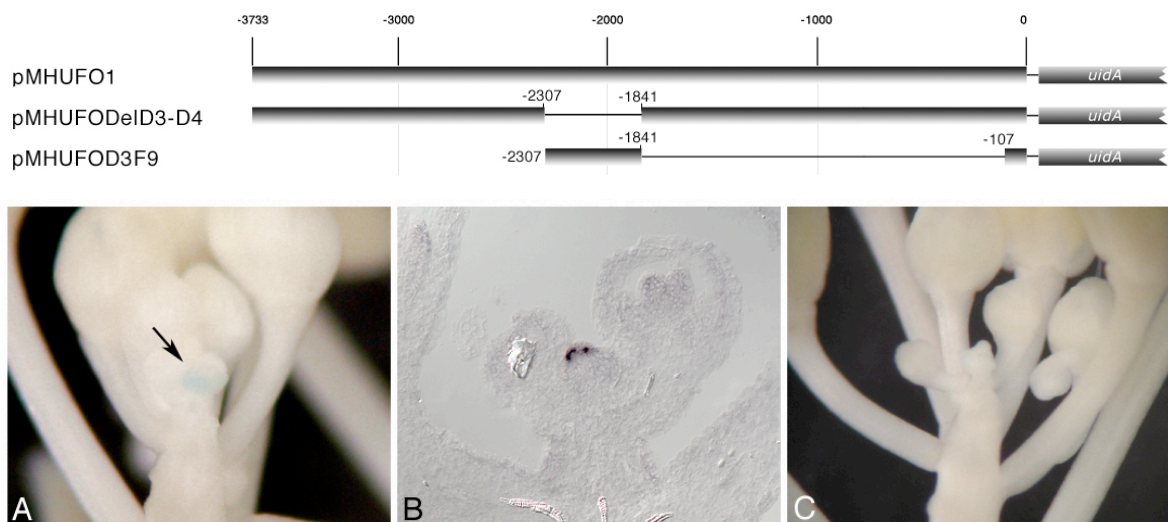


Abb. 3.18: Die Teilsequenz zwischen -2307 und -1841 ist notwendig, aber nicht ausreichend für *UFO*-Expression in Blüten. A, B: *MHUFODelD3-D4*, C: *MHUFOD3F9*; A: GUS-Färbung einer Infloreszenz, im Infloreszenzmeristem ist schwache GUS-Aktivität vorhanden (Pfeil); in Blüten wird GUS nicht exprimiert. B *In situ*-Hybridisierung mit einer *GUS*-Antisense-RNA-Sonde. *GUS*-RNA wird nur im Infloreszenzmeristem exprimiert. C: GUS-Färbung einer Infloreszenz, keine GUS-Aktivität in Sproß- und Blütenmeristemen.

3.3.2.6 *MHUFOD3F9*: Ist die Sequenz zwischen -2307 und -1841 ausreichend, um *UFO*-Expression in Blüten zu aktivieren?

Die Analyse der *MHUFODelD3-D4*-Pflanzen hat gezeigt, daß sich zwischen -2307 und -1841 cis-Elemente befinden, die für *UFO*-Expression in Blüten notwendig sind. Sind diese Elemente aber ausreichend, um *UFO*-Expression in Blüten unabhängig von anderen

cis-Elementen zu aktivieren? Um dies zu klären, wurde ein Deletionsderivat konstruiert, in dem dieser Sequenzabschnitt mit dem Bereich zwischen –107 bis –1, der die Bindestellen für den basalen Transkriptionsapparat enthält (Ilha Lee und Detlef Weigel, unpublizierte Daten), fusioniert sind (*MHUFOD3F9*). Mit diesem Transgen transformierte Pflanzen wurden in der T1- und der T2-Generation durch GUS-Färbungen auf Expression des Reportergens untersucht. Keine der 48 untersuchten Pflanzen zeigte eine Färbung (Abb. 3.18; C). Die in der Promotor-Teilsequenz von –2307 und –1841 enthaltenen cis-Elemente sind also nicht ausreichend, *UFO*-Expression in Blüten allein zu treiben. Es muß davon ausgegangen werden, daß dafür weitere Enhancer-Elemente notwendig sind.

3.3.2.7 *MHUFOD6*, *MHUFOD7* und *MHUFOD8*: keine Expression

Wie oben bereits beschrieben, bleibt das *UFO*-Expressionsmuster im Sproßmeristem bei den Deletionsderivaten *MHUFOD1* bis *MHUFOD5* unverändert. Das heißt, daß in der 5' von *UFOD5* gelegenen Sequenz, also zwischen –3733 und –1362, keine cis-regulatorischen Elemente liegen, die *UFO*-Expression im Sproßmeristem beeinflussen.

In *MHUFOD6*-, *MHUFOD7*- und *MHUFOD8*-Pflanzen konnte in keinem Entwicklungsstadium *GUS*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.19).

Die Tatsache, daß *MHUFOD5* noch das wildtypische Expressionsmuster im Sproßmeristem zeigt, *MHUFOD6* hingegen keine Expression mehr, läßt darauf schließen, daß sich im Bereich zwischen *UFOD5* und *UFOD6* (also zwischen –1362 und –832) ein oder mehrere cis-Elemente befinden, die für die Expression von *UFO* im Sproßmeristem notwendig sind. Interessanterweise befindet sich in diesem Bereich, nämlich zwischen –881 und –847, auch der die im Sequenzvergleich identifizierte homologe Sequenzabschnitt des *UFO*-Promotors mit dem *FIM*-Promotor. Um die cis-Elemente zwischen *UFOD5* und *UFOD6* näher einzugrenzen und die Relevanz des homologen Bereichs zu testen, wurden als nächstes die Deletionsderivate *MHUFOD5A*, *MHUFOD5C* und *MHUFOD5D* untersucht.

Zusätzlich wurden Teile dieses Sequenzbereichs durch Fusionen mit dem *CaMV35S*-Minimalpromotor in den Deletionsderivaten *MHUFOD5AR*, *MHUFOD5BR*, *MHUFOD5CR* und *MHUFOD5DR* untersucht.

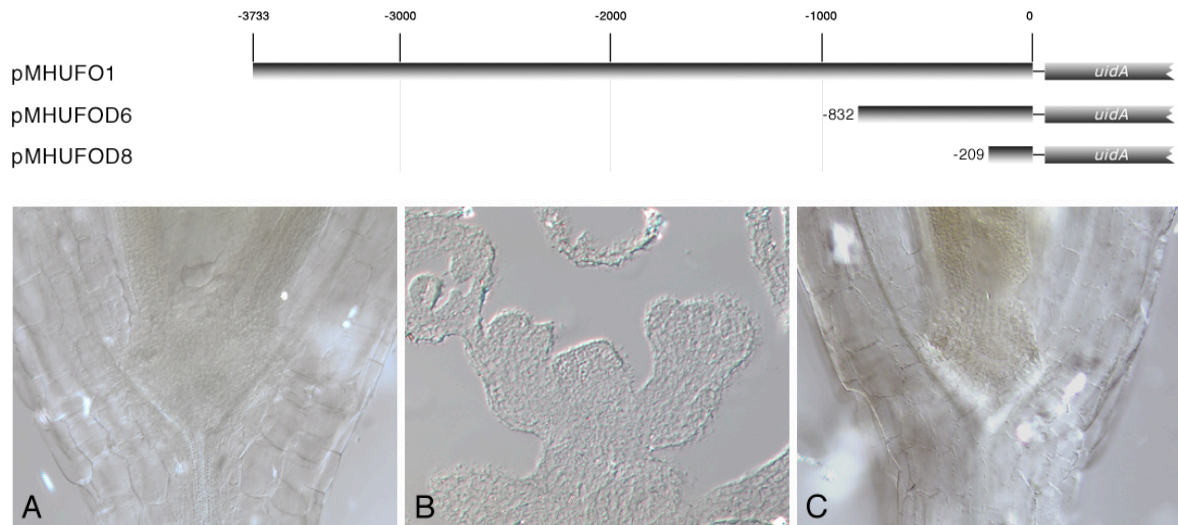


Abb. 3.19: Die Deletionsderivate *MHUFOD6* und *MHUFOD8* zeigen keine Expression. GUS-Färbungen von *MHUFOD6*- und *MHUFOD8*-Pflanzen. GUS-Expression ist nicht detektierbar. **A, B:** *MHUFOD6*; **A:** Keimling; **B:** Längsschnitt durch eine Infloreszenz. **C:** *MHUFOD8*; Keimling.

3.3.2.8 *MHUFOD5A* zeigt einen Teilverlust des Sprossmeristemusters; *MHUFOD5C* und *MHUFOD5D* zeigen keine Expression

Beim Deletionsderivat *MHUFOD5A* ist wie in den zuvor beschriebenen Deletionsderivaten *MHUFOD4* und *MHUFOD5* in Blüten keine *UFO*-Expression vorhanden. Zudem ist ein Teilverlust des Expressionsmusters im Sproßmeristem zu sehen: Anstelle der tassenförmigen *UFO*-Expressionsdomäne bleibt bei diesem Transgen nur der zentrale, in tieferen Schichten des Sproßmeristem liegende Teil des Musters übrig. Das *UFO*-Expressionsmuster im Sproßmeristem setzt sich also aus zwei Teildomänen zusammen. Interessanterweise entspricht die in *MHUFOD5A* verbleibende, zentrale Teildomäne dem *WUS*-Expressionsmuster im Sproßmeristem (vgl. Abb. 3.20; D).

Die Veränderung des Musters wurde zuerst durch GUS-Färbungen an Infloreszenzen gezeigt und – wegen der besseren zellulären Auflösung – durch *in situ*-Hybridisierung bestätigt (Abb. 3.20; A, B). Allerdings war das Muster nur in 50% der 20 untersuchten Pflanzen erkennbar; in den übrigen 50% konnte keine Expression detektiert werden.

In vegetativen Meristemen von *MHUFOD5A*-Pflanzen konnte keine Reporterexpression nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits daran liegen, daß *MHUFOD5A* nur in Infloreszenzmeristemen exprimiert wird; es könnte allerdings auch sein, daß die im

Allgemeinen sehr schwache Expression in diesen Pflanzen aufgrund der kleinen Expressionsdomäne durch GUS-Färbung nicht detektiert werden konnte.

Die Veränderung des Expressionsmusters zwischen UFOD5 und UFOD5A weist auf ein in diesem Bereich (–1362 bis –1241) liegendes cis-Element hin, das für die Festlegung des peripheren Teils der *UFO*-Expressionsdomäne im Sproßmeristem notwendig ist. Möglicherweise befindet sich in diesem Bereich ein weiteres Element, das für die Expression in vegetativen Meristemen essentiell ist.

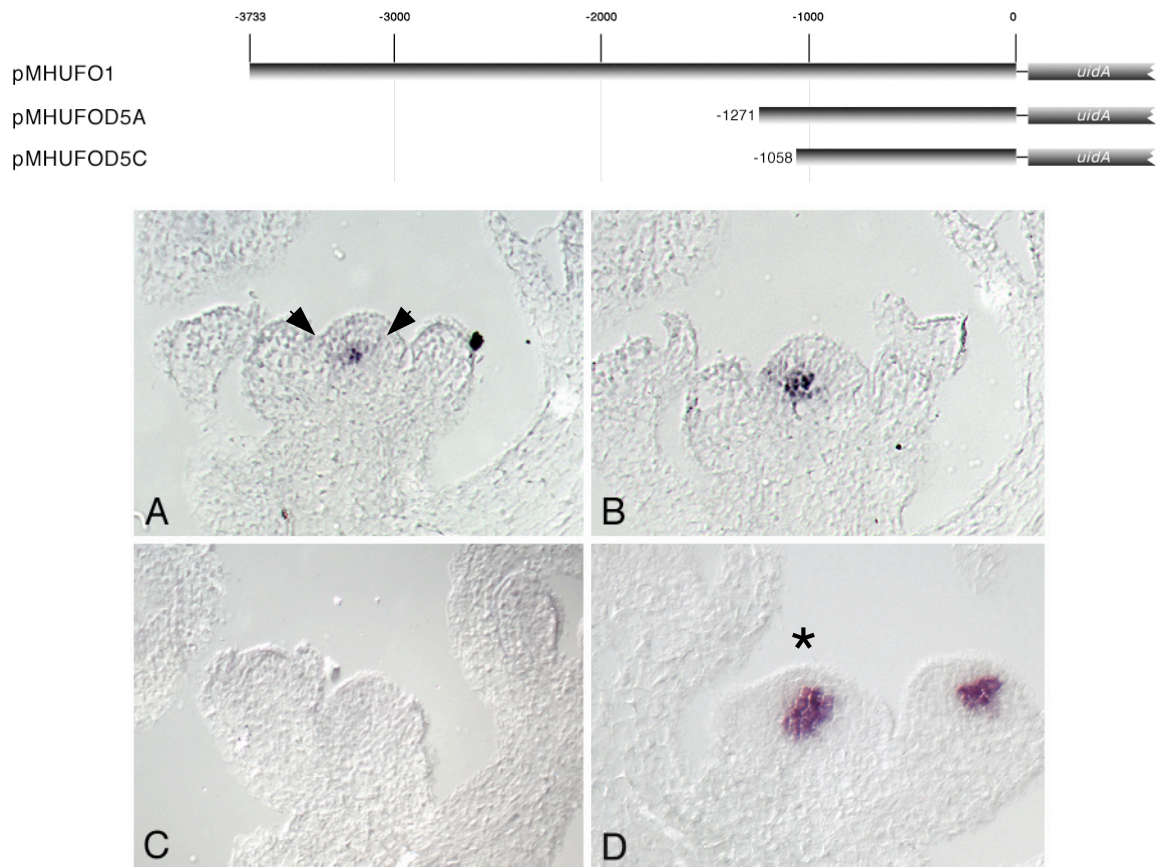


Abb. 3.20.: Teilverlust des *UFO*-Expressionsmusters im Sproßmeristem von *MHUFOD5A*-Pflanzen und Verlust der Expression in *MHUFOD5C*-Pflanzen. Längsschnitte durch Infloreszenzmeristeme; *in situ*-Hybridisierung mit einer *GUS*-Antisense-RNA-Sonde **A, B**: *MHUFOD5A*; Die Expressionsdomäne beschränkt sich auf das Zentrum des Sproßmeristems. An den Flanken (Pfeilspitzen) wird das *GUS*-Reportergen nicht exprimiert. **C**: In *MHUFOD5C*-Pflanzen wird *GUS* nicht exprimiert. **D**: *WUS*-Expression im Infloreszenzmeristem (*).

In *MHUFOD5C*- und *MHUFOD5D*-Pflanzen konnte in keinem Entwicklungsstadium *GUS*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.21; C). Es kann geschlossen werden, daß im Bereich zwischen UFOD5A und UFOD5C (also zwischen –1241 und –1058) ein

weiteres cis-Element liegt, das für die Expression von *UFO* im Zentrum des Sproßmeristems benötigt wird. Im Bereich zwischen –1058 und dem Transkriptionsstart liegen demnach keine regulatorischen Elemente, die *UFO*-Expression unabhängig von anderen, weiter 5´ gelegenen cis-Elementen aufrechterhalten können. Die *UFO/FIM-Box* (–881 bis –847) trägt nach diesem Ergebnis nicht entscheidend zur Kontrolle der *UFO*-Expression bei.

3.3.2.9 Fusionen von Promotorfragmenten mit dem *CaMV35S*-Minimalpromotor und der –100bp-Region des *UFO*-Promotors zeigen keine Expression

Die Deletionsderivate *MHUFOD5AR*, *MHUFOD5BR*, *MHUFOD5CR* und *MHUFOD5DR* zeigten keine GUS-Expression. Das könnte daran liegen, daß die in diesen Deletionsderivaten vorhandenen Promotorfragmente nicht ausreichend sind, um *UFO*-Expression unabhängig von anderen cis-Elementen anzutreiben. Um auszuschließen, daß das Ausbleiben der Expression mit dem *CaMV35S*-Minimalpromotor zusammenhängt, wurde ein weiteres Deletionsderivat hergestellt, in dem der gesamte Sequenzbereich zwischen –1362 und –788 mit dem Bereich zwischen –107 bis –1 fusioniert ist (*MHUFOD5F9*). Auch *MHUFOD5F9*-Pflanzen zeigten keine GUS-Expression. Daraus läßt sich schließen, daß die in diesem Bereich gelegenen cis-Elemente nicht ausreichen, um *UFO*-Expression unabhängig von anderen cis-Elementen des *UFO*-Promotors anzutreiben.

3.3.2.10 Das “Sproßelement” ist redundant (*MHUFODelD5-D6A*)

Die Analyse der 5´-Deletionsderivate *MHUFOD5* und *MHUFOD6* hat gezeigt, daß der Sequenzbereich zwischen –1362 und –788 notwendig für die Aktivierung der *UFO*-Expression im Sproßmeristem ist. Es könnte aber sein, daß durch das Fehlen der 5´ von –1362 gelegenen Sequenzen weitere cis-Elemente deletiert sind, die *UFO*-Expression im Sproßmeristem zusammen mit den cis-Elementen zwischen –1362 und –788 steuern. Deshalb wurde ein weiteres Deletionsderivat hergestellt, in dem genau der Bereich zwischen *UFOD5* und *UFOD6* deletiert ist (*MHUFODelD5-D6A*).

Die Analyse der transgenen Pflanzen ergab, daß eine Deletion der Sequenz zwischen *UFOD5* und *UFOD6* nicht ausreicht, um *UFO*-Expression im Sproßmeristem zu unterbinden. Das Expressionsmuster glich dem wildtypischen *UFO*-Expressionsmuster (Abb. 3.21). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die in *MHUFODelD5-D6A* deletierten cis-

Elemente nicht allein für die Expression von *UFO* im Sproßmeristem verantwortlich sind, sondern redundant mit anderen Elementen zusammenwirken.

3.3.2.11 *MHUFODelD3-D6A* zeigt dasselbe Muster wie *MHUFODelD3-D4*

In *MHUFODelD3-D6*-Pflanzen glich das *GUS*-Expressionsmuster dem von *MHUFODelD3-D4*-Pflanzen. Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die cis-Elemente zwischen -1362 und -788 redundant sind.

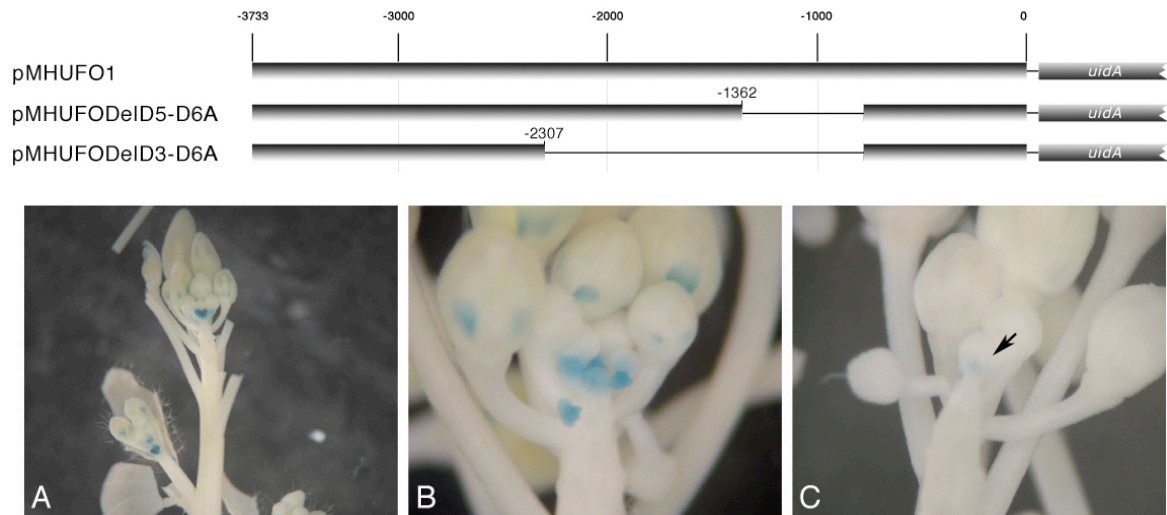


Abb. 3.21: GUS-Expression in *MHUFODelD5-6A*- und *MHUFODelD3-6A*-Pflanzen. A, B: *MHUFODelD5-6A*-Pflanzen exprimieren *UFO::GUS* im wildtypischen Muster. C: *MHUFODelD3-6A*-Pflanzen exprimieren *UFO::GUS* schwach im Sproßmeristem (Pfeil).

3.3.2.12 Zusammenfassung der Deletionsanalyse

Durch Deletion verschiedener Fragmente des *UFO*-Promotors konnten mehrere Bereiche eingegrenzt werden, in denen sich cis-regulatorische Elemente befinden, die für die *UFO*-Expression notwendig sind. Es konnte gezeigt werden, daß Promotor-Deletionsderivate, in denen die Sequenz von -3733 bis -2307 fehlt, in Blüten im Stadium 3-6 keine *UFO*-Expression mehr zeigten. Da das Derivat *MHUFOD2*, in dem alle Sequenzen 5' von -2807 deletiert sind, noch das wildtypische Expressionsmuster zeigt, kann geschlossen werden, daß zwischen -2807 und -2307 cis-Elemente liegen, die für die Blütenexpression ab Stadium 3 notwendig sind. Die Aktivität dieser cis-Elemente ist allerdings abhängig von der Anwesenheit des Sequenzbereichs zwischen -2307 und -1841 : Da beim Deletionsderivat *MHUFODelD3-D4*, in dem genau dieser Sequenzbereich deletiert ist,

keine Expression in Blüten gefunden wurde, kann geschlossen werden, daß sich in diesem Bereich die für die *UFO*-Expression in Blüten entscheidenden cis-Elemente befinden. Allerdings reicht eine Fusion dieses Sequenzbereichs mit dem Bereich zwischen -107 und -1 nicht aus, um *UFO*-Expression in Blüten zu aktivieren, was darauf hinweist, daß weitere Enhancer-Elemente für die *UFO*-Expression in Blüten notwendig sind.

Die Tatsache, daß durch die Deletion dieser Sequenzen die *UFO*-Expression in Blüten völlig unterbunden wird, die Expression im Sproßmeristem jedoch wildtypisch bleibt, zeugt vom modularen Aufbau des *UFO*-Promotors: Sproßmeristem- und Blütenexpression sind trennbar. Für die Expression im Sproßmeristem sind die Sequenzen von -1362 bis -1 ausreichend. Da Deletionsderivate, die 1058 oder weniger Basenpaare 5' des Transkriptionsstarts übriglassen, keine Expression zeigen, wird geschlossen, daß sich im Bereich zwischen -1362 und -1058 cis-Elemente befinden, die die *UFO*-Expression im Sproßmeristem kontrollieren. Diese sind allerdings nicht absolut notwendig und agieren wahrscheinlich zusammen mit anderen, redundanten Elementen. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, daß eine Deletion genau des Sequenzbereichs zwischen -1362 und -788 (*MHUFODelD5-D6A*) das vollständige, wildtypische *UFO*-Expressionsmuster zeigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die in diesem Bereich liegenden cis-Elemente allein nicht ausreichend sind, um *UFO*-Expression im Sproßmeristem zu aktivieren.

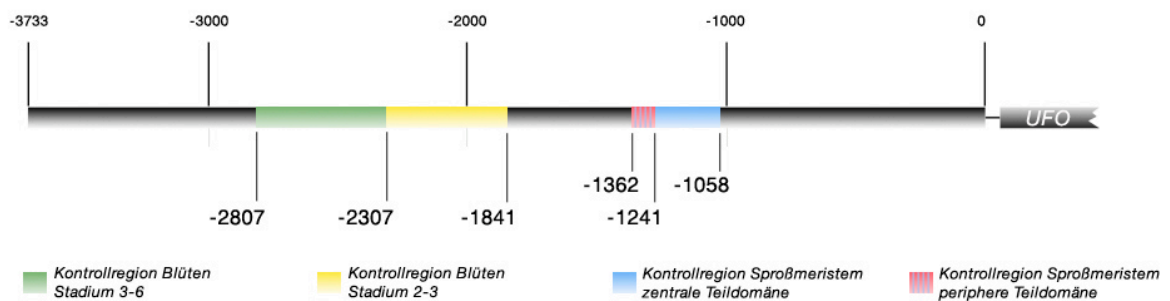


Abb. 3.22: Modularer Aufbau des *UFO*-Promotors. Schematische Darstellung der in dieser Arbeit identifizierten Kontrollregionen für die Expression von *UFO* in Blüten und im Sproßmeristem. Der in grün dargestellte Bereich zwischen -2807 und -2307 ist notwendig für die Expression in Blüten des Stadiums 3 bis 6. Die Aktivität der darin enthaltenen cis-Element ist abhängig von der Anwesenheit der im Bereich zwischen -2307 und -1841 gelegenen Sequenz (gelb). Dieser Bereich enthält cis-Elemente, die die Expression in Blüten des Stadiums 2-3 steuern. Der blau dargestellte Bereich enthält redundante Kontrollelemente für die Expression im Sproßmeristem; die Kontrollregion für die periphere Teildomäne des Sproßmeristemusters ist in rot/blau gestreift dargestellt.

Interessanterweise setzt sich das *UFO*-Expressionsmuster im Sproßmeristem aus zwei Teildomänen zusammen (einer zentralen und einer peripheren Teildomäne) zusammen, wie die Analyse des Deletionsderivats *MHUFOD5A* zeigte. Im Bereich zwischen –1362 und –1241 müssen sich cis-Elemente befinden, die für die periphere Teildomäne des *UFO*-Expressionsmusters im Sproßmeristem notwendig sind. Im Bereich zwischen –1241 und –1058 sollten sich also cis-Elemente befinden, die die *UFO*-Expression in der zentralen Teildomäne steuern. Abb. 3.22 zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit identifizierten Kontrollelemente.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß *UFO*-Expression durch mehrere, teilweise voneinander abhängige cis-Elemente im *UFO*-Promotor kontrolliert wird. Diese Elemente sind teilweise redundant, was die Identifizierung einzelner, entscheidender Elemente erschwert.

3.3.3 Hefe-1-Hybrid-Experimente

Um Proteine zu identifizieren, die an cis-regulatorische Elemente im *UFO*-Promotor binden und damit *UFO*-Expression aktivieren, wurden auf Basis der Ergebnisse der Promotor-Deletionsanalyse zwei unabhängige Hefe-1-Hybrid-Experimente durchgeführt. Für den ersten Screen wurde die Teilsequenz zwischen –1241 und –1058, also der Bereich, in dem sich die cis-Elemente für die zentrale Teildomäne des *UFO*-Expressionsmusters im Sproßmeristem befinden, verwendet. Im zweiten Experiment wurde die Teilsequenz zwischen –1362 und –1058 verwendet. Dieser Sequenzabschnitt enthält zusätzlich die cis-Elemente, die für die periphere Teildomäne des Musters notwendig sind. Die Wahl zweier sich überschneidender Fragmente wurde getroffen, um zu ermöglichen, daß in beiden unabhängigen Experimenten dieselben promotorbindenden Proteine gefunden werden.

Die entsprechenden Sequenzbereiche wurden in die Reporterplasmide kloniert und durch Transformation Hefestämme hergestellt, die sowohl das HIS-Reportergen und das LacZ-Reportergen unter der Kontrolle der genannten Teilsequenzen enthielten. Diese wurden mit dem die cDNA-Bank enthaltenen Stamm gepaart und die Nachkommenschaft auf Expression der Reportergene selektioniert. Die enthaltenen cDNAs wurden durch Kolonie-PCR amplifiziert und durch Datenbankabgleiche mit der BLAST-Software identifiziert.

1. Screen mit der Teilsequenz zwischen –1241 bis –1058

Nach der Paarung der Hefestämme wurden 83 putativ positive Hefeklone isoliert. Acht dieser Klone wuchsen bei erneutem Ausstreichen auf Selektionsmedium nicht an. Aus weiteren acht Klonen konnte keine *Arabidopsis*-cDNA amplifiziert werden; diese wurden nicht weiter bearbeitet. Die Sequenzierung der verbliebenen 67 cDNAs ergab ein weit gestreutes Bild: Neben acht potentiellen Transkriptionsfaktoren wurden auch acht ribosomale Proteine, drei Histone, eine Vielzahl von Enzymen und auch eine putative LRR-Rezeptorkinase gefunden. Über 15 Gene konnte keine weiterreichende Information gefunden werden; sie kodieren für unbekannte bzw. hypothetische Proteine. Keiner der sequenzierten Klone wurde mehrmals und unabhängig voneinander identifiziert. Die für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene wurden weiter untersucht. Eine Auflistung findet sich in Tabelle 3.6.

Annotierung	Kodiert für:	T-DNA-Ins. (Anzahl)
1.Screen mit der Teilsequenz –1241 bis –1058		
At1g11650	Unbekanntes Protein, Homologie zu ACBF-DNA-binding Protein	nein
At1g47740	Unbekanntes Protein mit hoher Homologie zu EREBP-4-TF	nein
At2g45450	Unbekanntes Protein, Homologie mit Reis HD-ZIP-Proteinen	nein
At3g12630	Unbekanntes Protein, Homologie zu Zink-Finger-Proteinen	ja (2)
At3g47680	Unbekanntes Protein, Myb-Domänen repeat signatures	nein
At3g59060	Putativer bHLH-Transkriptionsfaktor	ja (4)
At4g02220	Putatives Zink-Finger-Protein	ja (4)
At5g67300	Putatives Myb-verwandtes Protein	ja (3)
2.Screen mit der Teilsequenz –1362 bis -1058		
At1g13790	Hypothetisches Protein, ähnlich zu <i>Zea mays</i> X-1-TF	ja (5)
At1g14770	PHD-Finger	nein
At1g15910	Putativer Transkriptionsfaktor, ähnlich zu <i>Zea mays</i> X-1	ja (1)
At1g19000	Myb-Transkriptionsfaktor	ja (2)
At1g19220	Auxin-response-factor ARF11	ja (1)
At1g60670	Exprimiertes Protein, schwache Homologie mit putativem Reis-TF	nein
At1g75510	Putativer Transkriptions-Initiations-Faktor	nein
At3g10760	Myb-Transkriptionsfaktor	ja (3)
At3g38900	BZIP-Protein	ja (4)
At4g22480	Zink-Finger ähnliches Protein	ja (1)
At5g10650	Pspzf Zink-Finger-Protein	ja (4)

Tab. 3.6: Auflistung der in den beiden Hefe1-Hybrid-Screens gefundenen potentiellen Transkriptionsfaktoren. Mit den in roter Schrift dargestellten Genen wurden Expressionsanalysen durchgeführt. In der rechten Spalte ist angegeben, ob T-DNA-Insertionslinien erhältlich waren und wenn ja, wie viele verschiedene Insertionen untersucht wurden.

2. Screen mit der Teilsequenz zwischen -1362 und -1058

In diesem Experiment wurden zunächst 246 putativ positive Hefeklone isoliert und einer erneuten Selektion unterzogen. Dabei wurden 74 Klone, die starkes Wachstum auf dem Selektionsmedium und eine starke X-Gal-Färbereaktion zeigten, für die Sequenzierung ausgewählt. Aus fünf der ausgewählten Klone konnte keine *Arabidopsis*-cDNA amplifiziert werden. Wie beim ersten Screen zeigte sich nach der Sequenzierung ein weit gestreutes Spektrum an Interaktoren: Neben 11 potentiellen Transkriptionsfaktoren wurden sechs Histone, drei ribosomale Proteine und eine große Anzahl an Enzymen gefunden. Über 12 Gene konnten keine weiteren Informationen gefunden werden; sie kodieren für unbekannte bzw. hypothetische Proteine. Außer Histon H3, das sechs mal vorhanden war, konnte keiner der Klone mehrfach gefunden werden. Es wurde auch keine cDNA gefunden, die im ersten Screen identifiziert worden war. Das spricht gegen die Relevanz der in beiden Screens gefundenen Interaktionen, da sich die verwendeten Promotorfragmente in einem weiten Bereich überschneiden. Die für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene wurden weiter untersucht. Eine Auflistung findet sich in Tabelle 3.6.

Für die weitere Untersuchung der in den beiden Screens identifizierten potentiellen *UFO*-Promotor bindenden Proteine wurden Pflanzen analysiert, die T-DNA-Insertionen in den entsprechenden Genen beinhalten. Nicht für alle Gene waren T-DNA-Insertionslinien erhältlich; in Tab. 3.6 ist angegeben, welche Linien untersucht wurden. Sollte eines der gefundenen Gene einen transkriptionellen Aktivator der *UFO*-Expression kodieren, könnte eine T-DNA-Insertion zur Folge haben, daß *UFO* nicht mehr oder schwächer exprimiert wird. Dies hätte einen *ufo*-Funktionsverlust-Phänotyp zur Folge.

Das war nicht der Fall: Keine der untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten zeigte einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Es kann also geschlossen werden, daß unter den untersuchten, putativen Interaktoren kein Gen ist, dessen Funktionsverlust einen Ausfall der *UFO*-Expression zur Folge hat. Allerdings kann es sein, daß sich redundante Regulatoren der *UFO*-Expression darunter befinden.

Acht der gefundenen Gene wurden durch RNA-*in situ*-Hybridisierung weiter untersucht. Um *in vivo* an den *UFO*-Promotor zu binden, müßten potentielle Aktivatoren der *UFO*-Expression in Zellen exprimiert werden, in denen auch *UFO* exprimiert wird. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Tabelle 3.7 zusammengefaßt.

Gen	Expression
At1g60670	keine Expression in Infloreszenzen nachgewiesen
At1g15910	ubiquitäre Expression in Infloreszenzen
At5g22480	ubiquitäre Expression; stärker in Blütenprimordien; (Abb. XX; A, B)
At1g19220	ubiquitäre Expression, stärker in einzelnen Zellen von Blütenprimordien (Abb. XX; C)
At1g47740	schwache ubiquitäre Expression
At5g67300	starke Expression in Stamen, Karpellen und Ovulen; Sproßmeristem (Abb. XX; D, E)
At3g59060	keine Expression in Infloreszenzen nachgewiesen
At3g47680	ubiquitäre Expression in Infloreszenzen (Abb. XX, F)

Tab. 3.7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyse von acht in den Hefe-1-Hybrid-Screens identifizierten potentiellen Interaktoren.

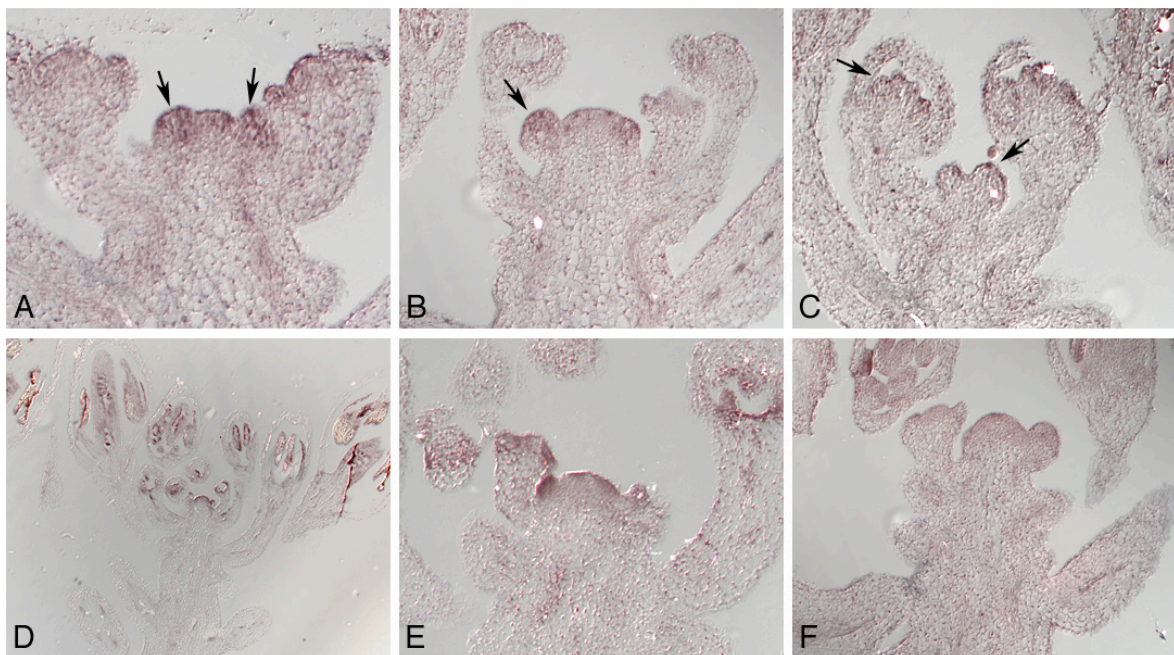


Abb. 3.23: Expression von potentiellen Interaktoren. RNA-*in situ*-Hybridisierungen an Längsschnitten wildtypischer Infloreszenzen. **A , B:** At5g22480. Neben einer starken Hintergrundexpression wurde Expression in einzelnen Zellen von Blütenprimordien (Pfeile) und im Sproßmeristem detektiert. **C:** At1g19220. Neben einer starken Hintergrundexpression wurde At1g19220-RNA in Zellen der äußeren Zellagen von Blütenprimordien und Organprimordien (Pfeile) nachgewiesen. **D , E:** At5g67300 wird im Sproßmeristem und in Petalen, Stamen, Karpellen und Ovulen stark exprimiert. **F:** At3g47680 wird ubiquitär exprimiert.

Für At1g60670 und At59060 konnte keine Expression in Infloreszenzen nachgewiesen werden. At1g15910, At1g47740 und At3g47680 wurden ubiquitär exprimiert, hier konnte kein gewebespezifisches Expressionsmuster nachgewiesen werden. Auch für At5g22480 und At1g19220 wurde eine starke Hintergrundexpression nachgewiesen, allerdings wurden

die Gene in einzelnen Geweben stärker exprimiert: At5g22480-Expression war in Blütenprimordien stärker als in anderen Geweben. Ein definiertes Muster war aber nicht zu erkennen, vielmehr beschränkte sich die stärkste Expression auf einzelne Zellen der Blütenprimordien (Abb. 3.23; A, B). Auch At1g19220 wurde in einzelnen Zellen von Blüten- und Organprimordien stark exprimiert; hier zeigte sich die stärkste Expression auf die äußeren Zelllagen (Abb. 3.23; C). At5g67300 wurde im Sproßmeristem und in Blüten exprimiert, wobei die stärkste Expression in späten Stadien der Blütenentwicklung vorhanden war und sich auf Petalen, Stamen, Karpelle und Ovulen beschränkte (Abb. 3.23; D, E).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß theoretisch alle untersuchten Gene mit Ausnahme von At1g60670 und At3g59060 als potentielle Interaktoren mit dem *UFO*-Promotor in Frage kämen, da sich ihre Expressionsmuster zumindest teilweise mit dem von *UFO* überschneiden. Allerdings konnte für keines der Gene ein definiertes Expressionsmuster in einer Teildomäne des *UFO*-Musters gefunden werden.

Insgesamt führten die Hefe-1-Hybrid-Experimente zu keinem klaren Ergebnis. Die Tatsache, daß keines der potentiell mit dem *UFO*-Promotor interagierenden Gene mehrmals gefunden wurde spricht zusammen mit dem weiten Spektrum an putativen Interaktoren gegen die Spezifität des Screens.

4 Diskussion

4.1 EMS-Mutagenese von *UFO::GFP*-Pflanzen

Um Gene zu identifizieren, die die Expression des *UFO*-Gens regulieren, wurde ein Mutagenese-Screen auf der Basis von Modifikationen des *UFO*-Expressionsmusters im Keimlingsstadium durchgeführt. Fünf M_2 -Linien wurden aufgrund des Verlusts der *UFO::GFP*-Expression genauer analysiert. Drei Linien (P17-08, P98-13 und P106-23) zeigten einen Blütenphänotyp, der charakteristisch für *ufo*-Funktionsverlustmutanten ist. Das könnte auf eine Mutation in einem Faktor, der *UFO* transaktiviert, hinweisen. Um zu überprüfen, ob Mutationen im *UFO*-Gen den Blütenphänotyp verursachen, wurden mit allen drei Linien Allelismus-Tests durchgeführt. In der F1-Generation der Einzelkreuzungen traten *ufo*-Funktionsverlustphänotypen auf. Die für den Blütenphänotyp ursächliche Mutation war also in allen drei Fällen allelisch mit *ufo*. Da in *ufo*-Mutanten *UFO* aber in einem annähernd wildtypischen Muster exprimiert wird (Samach et al., 1999), ist es unwahrscheinlich, daß die Ursache für den Verlust der GFP-Expression eine Mutation in *UFO* ist. Die Segregationsraten der mutanten Phänotypen in der F1-Generation der Einzelkreuzungen waren variabel. Zusätzlich trat der Blütenphänotyp auch in der F1-Generation von Kreuzungen mit wildtypischen Pflanzen auf. Auch hier waren die Segregationsraten variabel, was gegen eine dominante Mutation spricht.

Die Ursache für den Verlust der GFP-Expression kann also mit einiger Wahrscheinlichkeit auf eine Inaktivierung des *UFO::GFP*-Transgens zurückgeführt werden. Auch der in den drei Linien auftretende, einem *ufo*-Funktionsverlust ähnliche Phänotyp könnte somit eine epigenetische Ursache haben; die Inaktivierung des Transgens verursachte wahrscheinlich eine Kosuppression des *UFO*-Gens in den entsprechenden Pflanzen (Napoli et al., 1990). In Linie P17-08 trat zusätzlich zum beschriebenen Blütenphänotyp eine Störung des negativen Sproßgravitropismus der Seitentriebe auf. Dieser Phänotyp zeichnet auch *sgr2*-Mutanten aus (Kato et al., 2002). Interessanterweise kartiert *sgr2* in der Nähe von *UFO* auf Chromosom 1. Es könnte also sein, daß die Inaktivierung eines größeren genomischen Bereichs für den in Linie P17-08 auftretenden Phänotyp verantwortlich ist.

In Linie P72-10 konnte keine Korrelation zwischen einem der in der M_2 -Generation beobachteten Phänotypen und dem Verlust der GFP-Expression gefunden werden. Da der

Verlust der GFP-Expression in der M₃-Generation in Pflanzen aller phänotypischen Klassen einschließlich des Wildtyps segregierte und die GFP-Expression im Allgemeinen sehr schwach war, wurde auch diese Linie nicht weiter bearbeitet.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die Verwendung des *UFO::GFP*-Transgens als Indikator von Veränderungen der *UFO*-Expression, problematisch war. In drei der fünf näher untersuchten Linien war der Verlust der GFP-Expression auf eine Inaktivierung des Transgens zurückzuführen. Die dadurch verursachte Kosuppression des *UFO*-Gens war zusätzlich irreführend, da auch eine Mutation in einem *UFO* transaktivierenden Faktor zu einem *UFO*-Funktionsverlust-Phänotyp führen könnte.

Die Identifizierung des neuen *wus-5*-Allels zeigt jedoch den Vorteil der angewendeten Strategie und rechtfertigt ihre Anwendung. In einem Screen nach Blütenphänotypen, die auf einen Verlust der *UFO*-Expression hinweisen könnten, wäre diese Mutation nicht aufgedeckt worden, da *wus-5*-Mutanten keine Blüten entwickeln. Durch die gezielte Suche nach Veränderungen des *UFO*-Expressionsmusters im Keimlingsstadium konnte also hier eine Mutante gefunden werden, die in einem Screen in einem späteren Entwicklungsstadium möglicherweise nicht gefunden worden wäre.

4.2 Regulation der *UFO*-Expression durch *WUS* und *STM*

4.2.1 In *wus*-Mutanten wird *UFO* nicht exprimiert

Mit *WUS* wurde durch die Mutagenese ein genereller Faktor der Musterbildung in Meristemen als möglicher Regulator der *UFO*-Expression identifiziert. Ein Grund für den Verlust der *UFO*-Expression in *wus*-Mutanten könnte sein, daß die fehlende *UFO*-Expression allein auf den frühen Verlust des Sproßmeristems zurückzuführen ist. Dagegen spricht, daß *UFO* auch in den in späteren Entwicklungsstadien von *wus*-Mutanten produzierten Adventivmeristemen und Infloreszenzmeristemen nicht exprimiert wird. Wie erklärt sich aber dann, daß in den wenigen Blüten, die in *wus-1*-Mutanten produziert werden, Petalen und in einigen Fällen auch Stamen vorhanden sind (Laux et al., 1996)?

Es könnte sein, daß *WUS* in erster Linie für *UFO*-Expression im Sproßmeristem notwendig ist und andere, redundante Faktoren auch in *wus*-Mutanten eine Restexpression von *UFO* in Blüten gewährleisten können. Dafür spricht, daß *UFO*-Expression im Sproßmeristem und in Blütenmeristemen von getrennten cis-regulatorischen Elementen kontrolliert

werden, wie die Ergebnisse der *UFO*-Promotor-Deletionsanalyse offenlegen. Ein anderer Erklärungsansatz ergibt sich aus der Beobachtung, daß in *ufo*-Funktionsverlustmutanten früh angelegte Blüten einen stärkeren Phänotyp zeigen als spätere, die zum Teil wildtypische Petalen und Stamen produzieren (Wilkinson und Haughn, 1995; Hill et al., 1998). Es scheint also einen von *UFO* unabhängigen Prozess zu geben, der die Entwicklung von Petalen und Stamen steuern kann. *UFO* kontrolliert gemeinsam mit *LFY* die Aktivierung der Blütenorganidentitätsgene *AP3* und *PI* (Parcy et al., 1998). Die Expression dieser beiden Gene ist in *ufo*-Mutanten stark reduziert (Levin und Meyerowitz, 1995). Da gemeinsame konstitutive Expression von *AP3* und *PI* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors zur Produktion von Petalen und Stamen in *ufo*-Mutanten Blüten führt (Krizek und Meyerowitz, 1996), liegt die Ursache für den Verlust von Petalen und Stamen in *ufo*-Mutanten wahrscheinlich an der reduzierten *AP3*- und *PI*-Expression. Möglicherweise können diese beiden Gene in späteren Entwicklungsphasen auch ohne *UFO* aktiviert werden. Da *wus*-Mutanten erst in sehr späten Entwicklungsphasen wenige Blüten entwickeln, könnte also von *UFO* unabhängige *AP3*- und *PI*-Expression für die Bildung von Stamen und Petalen verantwortlich sein. Dafür spricht, daß es neben der Regulation der *AP3*-Expression durch *LFY* und *UFO* weitere Kontrollmechanismen gibt, die die Aktivierung der *AP3*-Expression steuern (Lamb et al., 2002).

4.2.2 WUS kann *UFO*-Expression aktivieren, benötigt dafür aber meristematische Kofaktoren

Ektopische Expression von *WUS* in *35S::WUS-GR*-Pflanzen resultiert in ektopischer *UFO*-Expression im meristematischen Kontext. Das heißt, daß *UFO*-Expression sich nicht mehr allein auf das Sproßmeristem konzentriert, sondern sich in angrenzendes Gewebe ausdehnt und auch in jungen Blattprimordien zu finden ist. *WUS* ist also zumindest formal ein Aktivator der *UFO*-Expression. Die Tatsache, daß ektopische *WUS*-Expression aber nicht zu ektopischer *UFO*-Expression in der gesamten Pflanze führt, läßt vermuten, daß *WUS* die Expression von *UFO* nicht allein aktivieren kann, sondern dafür Kofaktoren benötigt. Interessanterweise ist *UFO::GUS*-Expression unter Kontrolle des Promotorfragments von -1241 bis -1 in *MHUFOD5A*-Pflanzen auf eine zentrale Domäne beschränkt, die mit der *WUS*-Expressionsdomäne im Sproßmeristem identisch ist. Die positionale Information für

den zentralen Teil der *UFO*-Expressionsdomäne im Sproßmeristem könnte also durch die *WUS*-Expressionsdomäne definiert werden. Wenn das der Fall ist, sollte *UFO*-Expression mit ektopischer *WUS*-Expression in Meristemen korrelieren. Tatsächlich wird *UFO::GUS* in den fasziierten Infloreszenzmeristemen *clv3*-mutanter-Pflanzen in einem Muster exprimiert, das dem ausgedehnten *WUS*-Expressionsmuster in solchen Meristemen ähnlich ist (vgl. Abb. 3.9; C mit Brand et al., 2000). Dieses Resultat konnte durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente mit *UFO*-RNA-Sonden an *clv3*-mutanten-Infloreszenzen allerdings nur zum Teil bestätigt werden; da in diesen *UFO*-RNA hauptsächlich an der Peripherie der fasziierten Meristeme nachgewiesen werden konnte. *UFO*-Expression unterhalb der äußeren Zellschichten, also dort wo in *clv3*-mutanten Infloreszenzmeristemen *WUS* exprimiert wird, war hier nur schwach vorhanden. Das kann durch die größere Stabilität des *GUS*-Proteins bzw. durch den sensitiveren Nachweis der *GUS*-Aktivität als enzymatische Reaktion im Gegensatz zum Nachweis von RNA-Akkumulation erklärt werden. Die Beobachtung, daß die *UFO*-Expressionsdomäne in *clv3*-mutanten Infloreszenzmeristemen mit der ausgedehnten *WUS*-Expressionsdomäne korreliert, läßt vermuten, daß *WUS* die Expression von *UFO* im Sproßmeristem aktiviert und dabei möglicherweise die positionale Information für den zentralen Teil der *UFO*-Expressionsdomäne vermittelt.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß ektopische *WUS*-Expression sowohl in vegetativen als auch in Infloreszenzmeristemen ektopische *UFO*-Expression induzieren kann und *WUS* in Meristemen als Aktivator der *UFO*-Expression wirkt. Für die Aktivierung der *UFO*-Expression durch *WUS* werden meristematische Kofaktoren benötigt.

4.2.3 WUS kann *UFO*-Expression auch in der Wurzel aktivieren

Im Sproßmeristem aktiviert *WUS* die Expression von *UFO*, wahrscheinlich gemeinsam mit Kofaktoren. Ektopische *WUS*-Expression in der Wurzel führt zur Bildung von ektopischem Sproßgewebe (Gallois et al., 2004). Dabei wird die Identität von Zellen der Wurzel hin zu einer sproßmeristematischen Identität verändert. Das ergibt sich aus der Beobachtung, daß *WUS* in Wurzeln und ektopischem Sproßgewebe von *WUSMOS*-Pflanzen auf nicht-zellautonome Weise die Expression von *CLV3*, das als Zielgen von *WUS* gilt, aktivieren kann (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000; Gallois et al., 2004). Führt die Aktivität von

WUS in diesen Zellen auch zur Aktivierung der Kofaktoren, die für die Aktivierung der *UFO*-Expression durch WUS benötigt werden? Um das zu überprüfen, wurde *UFO::GUS*-Expression in den Wurzeln von Dexamethason-induzierten *35S::WUS-GR*-Pflanzen untersucht. Die Wurzeln dieser Pflanzen erschienen phänotypisch normal; es wurde kein ektopisches Sproßgewebe induziert. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zur von Gallois et al. (2004) beschriebenen Beobachtung, daß ektopische *WUS*-Expression in der Wurzel allein zur Bildung von ektopischem Sproßgewebe führt. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die von Gallois et al. benutzte direkte *WUS*-Überexpression nach Cre-Induktion (*WUSMOS*) einen stärkeren Effekt ausübt als das in dieser Arbeit verwendete *WUS-GR*-Fusionsprotein. Möglicherweise stört die mit dem *WUS*-Protein fusionierte *GR*-Domäne Interaktionen mit potentiellen Bindungspartnern.

WUS-Fehlexpression in der Wurzel führt auch im Zusammenwirken mit hohen Auxinkonzentrationen zur Bildung von ektopischem Kallus- und Sproßgewebe und zur Induktion somatischer Embryonen (Zuo et al., 2002; Gallois et al., 2004). Deshalb wurden die Wurzeln von Dexamethason-induzierten *35S::WUS-GR*-Pflanzen unter Zugabe von Auxin untersucht. Diese Pflanzen produzierten ektopisches Kallus- und Sproßgewebe und auch somatische Embryonen. In diesen Geweben wurde *UFO::GUS* stark exprimiert.

Die Beobachtung, daß *WUS* bei hohen Auxinkonzentrationen *UFO::GUS*-Expression in der Wurzel aktivieren kann, läßt mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß für die Aktivierung von *UFO* benötigte Kofaktoren, die normalerweise nur im Sproßmeristem aktiv sind, bei hohen Auxinkonzentrationen auch in der Wurzel aktiv sind. Das könnte bedeuten, daß auxinabhängige Faktoren auch bei der Aktivierung der *UFO*-Expression im Sproßmeristem eine Rolle spielen. Interessanterweise befinden sich im *UFO*-Promotor drei Auxin-Response-Elemente (ARE) mit der Sequenz TGTCTC, von denen sich zwei in direkter Nähe zueinander befinden (Pos. -131 und Pos. -155). Diese Sequenzmotive sind Bindungsmotive für eine Klasse von Transkriptionsfaktoren, die ARFs (Auxin Response Factors; Ulmasov et al., 1997 und 1999). Allerdings sind diese ARE-Elemente zwischen dem *UFO*-Promotor und dem *BoUFO*-Promotor nicht konserviert. Gegen eine Rolle von hohen Auxinkonzentrationen bei der Aktivierung der *UFO*-Expression spricht die Auxin-Verteilung im Sproßmeristem; Auxin-Maxima sind hier an den Spitzen auswachsender Primordien vorhanden und nicht in der *UFO*-Expressionsdomäne.

Wahrscheinlicher ist, daß die Aktivierung der *UFO*-Expression in ektopischem Sproß- und Kallusgewebe eine indirekte Folge der ektopischen *WUS*-Expression ist. In diesem Falle würde *WUS* Sproßmeristemidentität in der Wurzel induzieren und damit ein Programm aktivieren, das zur Etablierung von meristematischem Gewebe und damit indirekt zur Aktivierung der *UFO*-Expression führt. Dagegen spricht, daß *UFO*-Expression nicht ausschließlich in ektopischem Sproß- und Kallusgewebe, sondern teilweise auch in äußerlich noch unverändertem Wurzelgewebe induziert wurde. Allerdings war ektopische *UFO*-Expression in den meisten Fällen nicht durchgängig in der Wurzel und im ektopischen Sproßgewebe vorhanden. Die stärkste Färbung zeigte sich zumeist an der Basis auswachsender Primordien. In somatischen Embryonen war das *UFO::GUS*-Expressionsmuster dem wildtypischen Expressionsmuster vergleichbar, die Expressionsdomäne erschien jedoch leicht ausgedehnt.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die Aktivierung der *UFO*-Expression durch *WUS* wahrscheinlich indirekt ist. Ektopische *WUS*-Expression in der Wurzel hat bei hohen Auxinkonzentrationen die Umprogrammierung von Zellen auf ein sproßmeristematisches Schicksal zur Folge. Dadurch wird die Bildung von ektopischem Sproßgewebe und somatischen Embryonen induziert. Das hat zur Folge, daß auch die für die Expression von *UFO* benötigten Kofaktoren exprimiert werden und *WUS* somit *UFO*-Expression aktivieren kann.

4.2.4 Indirekte Aktivierung der *UFO*-Expression durch *WUS*-Fehlexpression in Blüten

Neben seiner Funktion in der Kontrolle des Stammzellschicksals in Meristemen wirkt *WUS* auch als Faktor bei der Musterbildung in Blütenmeristemen. So aktiviert *WUS* zusammen mit *LFY* die Expression des C-Funktionsgens *AG* (Lohmann et al., 2001). Im Sproßmeristem wirkt *WUS* als Aktivator der *UFO*-Expression. Kann *WUS* in Blütenmeristemen zusammen mit *LFY* auch die Expression von *UFO* aktivieren? Um dies zu untersuchen wurde die Expression von *UFO* und *WUS* in *LFY::WUS*-Pflanzen untersucht.

In Blütenmeristemen früher Entwicklungsstadien (Stadium 1-3) führte ektopische Expression von *WUS* unter Kontrolle des *LFY*-Promotors nicht zu einer generellen

ektopischen Aktivierung der *UFO*-Expression. Allerdings wurde *WUS* in diesen Pflanzen auch an der abaxialen Basis der Petiole ektopisch exprimiert, an dieser Stelle folgte das *UFO*-Expressionsmuster dem von *WUS*. In späteren Stadien der Blütenentwicklung wurden zusätzlich ektopische Meristeme an der Basis der Sepalen produziert, in denen *UFO* stark exprimiert wurde. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß *WUS* die Expression von *UFO* indirekt durch die Initiation eines meristematischen Programms aktiviert.

Ein weiteres Argument gegen eine direkte Aktivierung von *UFO* durch *WUS* ist, daß im *UFO*-Promotor kein *WUS*-Bindungsmotiv vorhanden ist. Allerdings ist bislang in *Arabidopsis* nur ein *WUS*-Bindungsmotiv charakterisiert worden (TTAAT(G/C)(G/C); Lohmann et al. 2001). In einer Studie, in der die regulatorischen Sequenzen des zweiten *AG*-Introns aus 29 unterschiedlichen Spezies verglichen wurden, wurde gezeigt, daß die enthaltenen *WUS*-Bindungsmotive zwischen den verglichenen Spezies teilweise divergieren (Hong et al., 2003). Es könnte also sein, daß *WUS* an andere, bislang nicht identifizierte Sequenzmotive bindet.

4.2.5 STM aktiviert *UFO*-Expression indirekt

Als Kandidat für einen Aktivator der *UFO*-Expression gilt *STM*. Das beruht auf der Beobachtung, dass *UFO*-Expression in *stm*-mutanten Embryonen bereits vor dem Auftreten des *stm*-mutanten Phänotyps und dem Verlust des Sproßmeristems fehlt (Long et al., 1998). Auch in *stm*-mutanten Keimlingen wird *UFO* nicht exprimiert. Funktionelles *STM*-Protein wird also auch im Keimlingsstadium für die Expression von *UFO* benötigt. In Dexamethason-induzierten *35S::STM-GR*-Pflanzen wurde *UFO::GUS* im Sproßmeristem und in ektopischen Meristemen stark exprimiert. Zum Teil war *UFO::GUS*-Expression auch in den Leitbündeln vorhanden; allerdings nie in der gesamten Pflanze. Daraus kann geschlossen werden, daß ektopische Expression von *STM* allein nicht ausreicht, um ektopische *UFO*-Expression zu aktivieren. Eine Erklärung dafür ist, daß *STM* für die Aktivierung der *UFO*-Expression weitere meristematische Kofaktoren benötigt. Da aber auch ein ektopisch exprimiertes, konstitutiv aktives *STM*-VP16-Fusionsprotein *UFO*-Expression nicht in allen Geweben aktivieren kann, muß davon ausgegangen werden, daß *STM* kein direkter Aktivator von *UFO* ist, sondern daß durch

STM-Aktivität die Voraussetzungen geschaffen werden, daß *UFO* exprimiert werden kann. Das könnte zum Beispiel durch eine Aktivierung von positiven Regulatoren der *UFO*-Expression durch STM gewährleistet werden. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß andere meristemspezifische Gene wie *CLV3* und *WUS* in *stm*-mutanten Embryonen im Gegensatz zu *UFO* noch exprimiert werden (Brand et al., 2002; Mayer et al., 1998).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl *WUS* als auch STM das Potential haben, *UFO*-Expression zu aktivieren. Eine direkte Aktivierung durch STM ist nicht wahrscheinlich. Möglicherweise aktiviert *WUS* die Expression von *UFO* gemeinsam mit meristematischen Kofaktoren. Die Aktivität dieser Kofaktoren kann durch ektopische *WUS*-Expression in Wurzeln gewährleistet werden. Für eine Regulation von *UFO* durch Homöodomänenproteine spricht ein AtHB6-Bindungsmotiv, das zwischen dem *UFO*-Promotor und dem *FIMBRIATA*-Promotor konserviert ist (*UFO*: Pos.-3238; Sequenz: CAATTATTAT; *FIM*: Pos. -1738; Sequenz: CAATTAATTA). Das könnte auf eine Bindung des AtHB6-Proteins an den *UFO*-Promotor hinweisen. Möglicherweise repräsentiert das Motiv aber auch eine potentielle Bindestelle für andere Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren. Allerdings zeigt das Deletionsderivat *MHUFOD2*, in dem unter anderem dieses Bindungsmotiv fehlt, in transgenen Pflanzen ein dem wildtypischen *UFO*-Expressionsmuster entsprechendes *GUS*-Expressionsmuster, was die Relevanz dieses Motivs in Frage stellt.

4.3 Konservierte Sequenzbereiche in den Promotoren von *UFO*, *BoUFO* und *FIM*

Ein Sequenzvergleich des *UFO*-Promotors mit einem Promotorfragment aus Blumenkohl (*Brassica oleracea ssp. Botrytis*) zeigte eine allgemein hohe Konservierung des verglichenen Bereichs. Das könnte einerseits daran liegen, daß dieser Sequenzbereich eine wichtige Rolle in der Transkriptionskontrolle von *UFO* bzw. *BoUFO* spielt und deswegen ein Selektionsdruck auf die Konservierung dieses Sequenzbereichs existiert, andererseits könnte dies aber auch aus dem relativ nahen Verwandtschaftsgrad der beiden Spezies resultieren. Colinas et al. (2002) berichten, daß der Grad an Konservierung von nicht-

kodierenden Sequenzen zwischen Arabidopsis und Brassica durchschnittlich nicht mehr als 20% beträgt. Das spricht für eine Relevanz des hier isolierten Sequenzbereichs für die *UFO*-Transkriptionskontrolle. Die Isolierung weiter in 5'-Richtung gelegener Bereiche des *BoUFO*-Promotors könnte hier sicherlich weiteren Aufschluß bieten, da nach der *UFO*-Promotor-Deletionsanalyse die für die Expression im Sproßmeristem und in Blüten relevanten Bereiche weiter in 5'-Richtung liegen.

Beim Vergleich des *UFO*-Promotors mit dem *FIM*-Promotor zeigte sich eine völlig andere Situation: Hier konnte kaum eine Konservierung von 5'-Sequenzen nachgewiesen werden. Außer dem vorher bereits erwähnten AtHB6-Bindungsmotiv konnte nur ein kurzer, hochkonservierter Bereich (*UFO/FIM*-Box) identifiziert werden. Die Tatsache, daß der *UFO*-Promotor und der *FIM*-Promotor über die gesamte Sequenz sehr divergent sind, die *UFO/FIM*-Box aber 80% Sequenzidentität bei einer Länge von 35 bp zeigt, spricht für einen Selektionsdruck auf dieses Fragment. Auch die Tatsache, daß die *UFO/FIM*-Box im *UFO*-Promotor an einer anderen Position zu finden und in einem völlig divergierenden Kontext ist als im *FIM*-Promotor (*UFO*: -881; *FIM*: -204), dabei in sich aber eine solch hohe Konservierung aufweist, spricht für ihre Relevanz. Die Ergebnisse der Deletionsanalyse zeigen jedoch, daß die Abwesenheit der *UFO/FIM*-Box keinen Effekt auf die Expression des *UFO*-Reportergens hat: Beim Deletionsderivat *MHUFODelD5-D6*, in dem der Bereich zwischen -1362 und -788, in dem auch die *UFO/FIM*-Box liegt, deletiert ist, wird *UFO* im normalen Muster exprimiert. Angesichts der in der Deletionsanalyse aufgedeckten Redundanz von Kontrollelementen der *UFO*-Expression ist eine Funktion der *UFO/FIM*-Box in der *UFO*-Transkriptionskontrolle jedoch nicht völlig auszuschließen.

4.4 Die Deletionsanalyse zeigt, daß der *UFO*-Promotor modular aufgebaut ist

Durch die *UFO*-Promotor-Deletionsanalyse konnten drei Sequenzabschnitte identifiziert werden, die für *UFO*-Expression im wildtypischen Muster notwendig sind: Der Sequenzbereich zwischen -2807 und -2307 (*UFOD2-D3*) ist notwendig für Expression in Blüten nach Stadium 3; der Sequenzbereich zwischen -2307 und -1842 (*UFOD3-D4*) ist generell notwendig für *UFO*-Expression in Blüten und im Bereich zwischen -1362 und -1058 (*UFOD5-D5C*) befinden sich regulatorische Elemente, die *UFO*-Expression im

Sproßmeristem kontrollieren. Der *UFO*-Promotor ist also modular aufgebaut. Dabei sind die cis-Elemente im Bereich UFOD2-D3 von der Anwesenheit der UFOD3-D4-Elemente abhängig. In *MHUFODelD3-D4*-Pflanzen, in denen letztere deletiert sind, findet auch nach Stadium 3 keine *UFO*-Expression in Blüten statt; alleiniges Vorhandensein der cis-Elemente im Bereich UFOD2-D3 reicht also nicht aus, um eine Restexpression von *UFO* in Blüten nach Stadium 3 zu gewährleisten. Die cis-Elemente im Bereich UFOD5-D5C erwiesen sich zwar bei 5'-Deletionsderivaten als essentiell, sind aber im Kontext des gesamten Restpromotors redundant, wie *MHUFODelD5-D6*-Pflanzen zeigten.

4.4.1 Kontrolle der *UFO*-Expression in Blütenmeristemen durch cis-Elemente

Während in *MHUFOD2*-Pflanzen GUS im wildtypischen *UFO*-Muster exprimiert wurde, war in *MHUFOD3*-Pflanzen keine Expression nach dem frühen Stadium 3 mehr vorhanden. Im Sequenzbereich zwischen -2807 und -2307 befinden sich also regulatorische Elemente, die für die Expression in Blüten nach Stadium 3 essentiell sind. Diese könnten durch zwei potentielle Myb-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive an Position -2512 und Position -2313 repräsentiert werden.

Die Beobachtung, daß die in *MHUFOD2* vorhandenen 2,8 kb 5'-*UFO*-Promotor-Sequenz ausreichen, um das normale Muster zu gewährleisten, steht im Widerspruch zu den 2003 von Durfee et al. veröffentlichten Daten. Die Autoren berichten, daß in *ufo-12*-Mutanten, in denen eine T-DNA-Insertion an Position -2998 vorliegt, keine *UFO*-Expression ab Stadium 3 mehr zu beobachten ist, und daß *UFO*-Expression generell – auch im Sproßmeristem – schwächer ist als im Wildtyp. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die T-DNA-Insertion einen anderen Einfluß auf Aktivität des *UFO*-Promotors ausübt als die in *MHUFOD2* gegebene vollständige Deletion der Sequenz 5' von -2807. Interessanterweise beschreiben die Autoren eine weitere T-DNA-Insertion als Ursache für den Phänotyp des *ufo-11*-Allels. Diese T-DNA-Insertion liegt im Bereich von -3,8 kb (und damit außerhalb des in dieser Arbeit als *UFO*-Promotor verwendeten Bereichs) und geht mit genomischen Rearrangements in dieser Region einher. Es besteht also die Möglichkeit, daß die beschriebenen T-DNA-Insertionen sich in Bezug auf *UFO*-Expression anders auswirken als 5'-Deletionen. Der in *ufo-12* beobachtete Phänotyp steht im Einklang mit dem Verlust der *UFO*-Expression nach Stadium 3; Petalen fehlen in *ufo-*

12-Mutanten vollständig. Für das Wachstum der Petalen ist *UFO*-Expression in Stadium 4 und 5 notwendig (Laufs et al., 2003).

Der durch eine T-DNA-Insertion an Position –1590 verursachte Phänotyp des in dieser Arbeit identifizierten *ufo-15*-Allels steht ebenfalls nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse. So zeigen *MHUFOD4*-Pflanzen, in denen der Sequenzbereich 5' von –1841 deletiert ist, keine *UFO::GUS*-Expression in Blüten. *ufo-15*-Mutanten produzieren aber einige Petalen und Stamen. Wie ist diese Diskrepanz zwischen Erwartung und Beobachtung zu erklären? Eine Möglichkeit ist, daß in *ufo-15* – anders als in *MHUFOD4* – eine Restaktivität des *UFO*-Promotors in Blüten vorhanden ist. Das könnte daran liegen, daß in *ufo-15* im Gegensatz zu den Deletionsderivaten die 5' der Insertion gelegene *UFO*-Promotorsequenz noch vorhanden ist. Möglicherweise können diese Sequenzen trotz ihrer Dislokation durch die T-DNA-Insertion eine *UFO*-Restaktivität in Blüten gewährleisten. Diese schwache Expression könnte noch ausreichend sein, um die korrekte Spezifizierung einiger Petalen und Stamen zu gewährleisten.

Ein weiterer Grund könnte sein, daß die bei der Insertions-Mutagenese (Alonso et al., 2003) benutzte T-DNA einige stark exprimierte Gene trägt, die Enhancer-Sequenzen beisteuern. Da solche Enhancer auch über Distanzen von mehreren kb wirken können, ist ein Einfluß auf die *UFO*-Expression in den T-DNA-Insertionslinien vorstellbar.

Wie oben bereits beschrieben, sind die im Bereich *UFOD3-D4* gelegenen cis-Elemente essentiell für *UFO*-Expression in Blüten aller Entwicklungsstadien. In den Infloreszenzmeristemen von *MHUFODelD3-D4*-Pflanzen war *UFO::GUS*-Expression vorhanden; in Blüten ist keine Expression nachzuweisen.

Die für die Deletionsderivate *MHUFOD3* und *MHUFODelD3-D4* gefundenen Ergebnisse decken sich mit der Expression des *UFO*-Reportergens in *ap1*-Mutanten. Auch hier wurde *UFO::GUS*-Expression fast ausschließlich im Sproßmeristem gefunden, in einigen Fällen auch in Blütenprimordien des Stadium 2. *API* könnte also zur Aktivierung der *UFO*-Expression in Blüten beitragen. Da *API* einen MADS-Box-Transkriptionsfaktor kodiert, für den gezeigt worden ist, daß er an CARG-Box-Motive im *AP3*-Promotor binden kann (Hill et al., 1998), könnte es sein, daß *API* auch an CARG-Box-Motive im *UFO*-Promotor bindet. Im *UFO*-Promotor gibt es insgesamt sieben CARG-Box-Motive in weiterem Sinne: Zwei dieser Motive entsprechen der klassischen CARG-Box (C(AT)₆GG); die übrigen fünf sind CARGCW₈-Motive (C(AT)₈G). Eines dieser CARGCW₈-Motive befindet sich an

Position –2168, also in dem Sequenzabschnitt, der für die Blütenexpression essentiell ist. Eine gezielte Mutation dieses Bindungsmotivs könnte die Frage beantworten, ob dieses Motiv ein für die *UFO*-Expression essentielles cis-Element darstellt.

Die übrigen CARG-Box-Motive lassen sich nicht in einen mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse passenden Kontext einordnen. Interessant ist jedoch die Tatsache, daß sich an Position –1734 und –1751 zwei CARG-Box-Motive in unmittelbarer räumlicher Nähe befinden. Im *AP3*-Promotor befinden sich drei CARG-Box-Motive, die essentiell für die *AP3*-Regulation sind, in einem ähnlichen Abstand zueinander (Tilly et al., 1998). Es ist denkbar, daß diese gekoppelten CARG-Box-Motive redundante cis-Elemente darstellen.

4.4.2 Kontrolle der *UFO*-Expression im Sproßmeristem durch cis-Elemente

Der Sequenzbereich zwischen –1362 und –1058 konnte durch 5′-Deletionen als ein für die Kontrolle der *UFO*-Expression im Sproßmeristem notwendiger Bereich identifiziert werden. Allerdings zeigte das Deletionsderivat *MHUFODelD5-D6* wie oben beschrieben ein wildtypisches *UFO::GUS*-Expressionsmuster; somit sind die in diesem Bereich gelegenen cis-Elemente redundant. Es also wahrscheinlich, daß *UFO*-Expression im Sproßmeristem von mehreren cis-Elementen kontrolliert wird, die unabhängig voneinander agieren. Interessant ist die Beobachtung, daß sich das *UFO*-Expressionsmuster im Sproßmeristem in zwei Teildomänen aufspalten läßt. Wie das *UFO*-Expressionsmuster im Ganzen wird also auch das *UFO*-Expressionsmuster im Sproßmeristem durch verschiedene Module im *UFO*-Promotor gesteuert.

Die zentrale, durch *MHUFOD5A* aufgedeckte Teildomäne entspricht dabei der *WUS*-Expressionsdomäne. Allerdings sind in diesem Bereich keine potentiellen Bindungsmotive für Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren vorhanden, was gegen eine direkte Bindung von *WUS* spricht. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß andere, von *WUS* aktivierte Transkriptionsfaktoren die zentrale Domäne des *UFO*-Expressionsmusters definieren. In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Hefe-1-Hybrid-Experimenten, in denen der für die zentrale Teildomäne notwendige Sequenzabschnitt als “Köder” verwendet wurde, wurden neben einer großen Anzahl ribosomaler Proteine und Enzyme auch einige Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in Hefe die Expression von Reportergenen unter der Kontrolle der verwendeten Promotorfragmente aktivieren konnten. Keiner der so

identifizierten Transkriptionsfaktoren zeigte ein definiertes Expressionsmuster im Sproßmeristem, wie durch *in situ*-Hybridisierung gezeigt wurde. Gegen eine Rolle der gefundenen Transkriptionsfaktoren spricht auch, daß T-DNA-Insertionen in den für die Transkriptionsfaktoren kodierenden Genen keinen mutanten Phänotyp zur Folge hatten, der auf veränderte *UFO*-Expression hinweisen würde. Hier kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um redundante Regulatoren der *UFO*-Expression handeln könnte. Außerdem läßt sich argumentieren, daß ein Verlust der *UFO*-Expression nur in der zentralen Domäne des Sproßmeristems wahrscheinlich keine phänotypischen Auswirkungen zeigen würde; schließlich zeigen *ufo*-Funktions-verlustmutanten auch keinen Sproßmeristem-Phänotyp.

Insgesamt führten die Hefe-1-Hybrid-Experimente zu keinem klaren Ergebnis. Die Tatsache, daß keines der potentiell mit dem *UFO*-Promotor interagierenden Gene mehrmals gefunden wurde, spricht gegen die Spezifität der Screens. Auch die große Anzahl an nicht-DNA-bindenden Proteinen weist auf eine eher geringe Spezifität der gezeigten Interaktionen hin.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Kontrolle des Expressionsmusters des *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* Gens von *Arabidopsis thaliana*. *UFO* wird im Sproß- und Blütenmeristemen aller Entwicklungsstadien der Pflanze exprimiert. In Blütenmeristemen agiert *UFO* als Kofaktor von *LEAFY (LFY)* bei der Aktivierung der Organidentitätsgene des zweiten und dritten Wirtels. *UFO* stellt also einen generellen Faktor der Musterbildung in Meristemen dar.

Um regulatorische Gene, die die Expression von *UFO* beeinflussen, zu identifizieren, wurden transgene Pflanzen, die *GFP* unter Kontrolle des *UFO*-Promotors exprimieren (*UFO::GFP*) mutagenisiert. Anhand der *GFP*-Expression wurde nach Mutanten gesucht, in denen *UFO* im Keimlingsstadium fehlexprimiert wird. Zusätzlich wurde durch eine Deletionsanalyse des *UFO*-Promotors die Kontrolle der *UFO*-Expression durch cis-regulatorische Sequenzen untersucht.

Bei der Analyse der mutagenisierten *UFO::GFP*-Pflanzen konnte eine Mutante identifiziert werden, in der *UFO* nicht exprimiert wird. Das betroffene Gen konnte isoliert und als neues Allel von *WUSCHEL (WUS)* identifiziert werden. *WUS* kodiert einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, der in der zentralen Zone von Sproß- und Blütenmeristemen exprimiert wird und ein positiver Regulator des Stammzellschicksals ist. Durch *WUS*-Fehlexpressionsexperimente konnten gezeigt werden, daß *WUS* in Sproß- und Blütenmeristemen *UFO*-Expression aktiviert. *WUS* aktiviert *UFO*-Expression aber nicht direkt, sondern benötigt dafür meristematische Kofaktoren. Ektopische *WUS*-Expression in der Wurzel führte bei hohen Auxinkonzentrationen zur Umprogrammierung von Zellen auf ein sproßmeristematisches Schicksal. Das hatte zur Folge, daß auch die für die Expression von *UFO* benötigten Kofaktoren exprimiert werden und *WUS* somit *UFO*-Expression aktivieren kann. Anschließende Fehlexpressionsexperimente mit dem *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* Gen zeigten, daß auch *STM* ein indirekter ein Aktivator der *UFO*-Expression ist.

Die Deletionsanalyse zeigte, daß der *UFO*-Promotor sich aus mehreren, in verschiedenen Promotorregionen gelegenen cis-Elemente zusammensetzt. *UFO*-Expression in Blütenmeristemen und im Sproßmeristemen werden also durch separate regulatorische Sequenzen kontrolliert. Auch die Kontrolle der *UFO*-Expression im Sproßmeristem wird

durch getrennte cis-Elemente gewährleistet, da sich das *UFO*-Expressionsmuster durch 5'-Deletionen des Promotors in eine zentrale und eine periphere Teildomäne trennen läßt. Die zentrale Teildomäne ist mit dem *WUS*-Expressionsmuster identisch; möglicherweise vermittelt *WUS* also die positionale Information für diesen Teil des *UFO*-Expressionsmusters.

6 Literatur

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.

Aida, M., Ishida, T. und Tasaka, M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**, 1563-70.

Alonso J.M., Stepanova, A.M., Leisse T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, K., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C.C. und Ecker, J.R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* *Science* **301**: 653-657.

Ausubel, F., et al. (Hrsg. 1996). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & sons. New York.

Barton, M. K. und Poethig, R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and *SHOOT MERISTEMLESS* mutant. *Development* **119**, 823-831.

Bechtold, N. und Pelletier, G. (1998). *In planta* Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**, 259-66.

Blázquez, M.A., Soowall, L.N., Ilha, L. I. und Weigel, D. (1997). *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 3835-3844.

Blázquez, M.A. und Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 889–892.

Bowman, J. L. (Hrsg.) (1994) *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*; New York. Springer-Verlag

Bowman, J. L., Smyth, D. R. und Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.

Bowman J.L., Alvarez J., Weigel D., Meyerowitz E.M. und Smyth D.R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* **119**, 721-743.

Bowman, J.L., Smyth, D.R. und Meyerowitz, E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**(1), 1-20.

Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. und Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* **289**, 617-619.

Brand, U., Hobe, M., und Simon, R. (2001). Functional domains in plant shoot meristems. *Bioessays* **23**, 134-141.

Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M. und Simon, R. (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 565-75.

Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. und Meyerowitz, E. M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-75.

Clark, S. E., Williams, R. W. und Meyerowitz, E. M. (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-85.

Coen, E. S. und Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-7.

Colinas, J., Birnbaum, K. and Benfey, P.N. (2002). Using Cauliflower to find conserved non-coding Regions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **129**, 451-454.

Cousens, D. J., Greaves, R., Goding, C. R. und O'Hare, P. (1989). The C-terminal 79 amino acids of the herpes simplex virus regulatory protein, Vmw65, efficiently activate transcription in yeast and mammalian cells in chimeric DNA-binding proteins. *EMBO J.* **8**, 2337-2342.

Durfee, T., Roe, J.L., Sessions, R.A., Inouye, C., Serikawa, K., Feldman, K.A., Weigel, D. und Zambryski, P.C. (2003). The F-Box-containing Protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8571-8576

Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q., Gerentes, D., Perez, P. und Smyth, D.R. (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. und Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.* **10**, 101-113.

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

Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.

Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu S.H., Durski, A.M. und Vierstra, R.D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11519-11524.

Gallois, J.L., Woodward C., Reddy G.V. und Sablowski, R. (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 3207-17

Goethe, J.W.v. (1790). Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären (Gotha, C.W. Ettinger)

Goto, K., Kyojuka, J. und Bowman, J.L. (2001). Turning floral organs into leaves, leaves into floral organs. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **11**, 449-45.

Goto, K. und Meyerowitz, E. M. (1993). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev* **8**, 1548-1560.

Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. und Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*- mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-32.

Hibara, K., Takada, S. und Tasaka, M. (2003). *CUC1* gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J.* **36**, 687-696.

Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* **27**, 297-300.

Hill, T.A., Day, C.D., Zondlo S.C., Thackeray A.G. und Irish, V.F. (1998). Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. *Development* **125**, 1711-21.

Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B. und Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein Phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**, 3029–3038.

Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-7

Hong, R.L., Hamaguchi, L., Busch, M.A. und Weigel D. (2003). Regulatory Elements of the Floral Homeotic Gene *AGAMOUS* Identified by Phylogenetic Footprinting and Shadowing. *Plant Cell* **15**, 1296–1309.

Honma, T. und Goto K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525-529.

Huang, H., Mizukami, Y. und Ma, H. (1993). Isolation and characterization of the binding sequence for the product of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Nucl. Acids Res.* **21**, 4769-4776.

Ingram G.C., Goodrich J., Wilkinson M.D., Simon R., Haughn G.W. und Coen E.S. (1995). Parallels between *UNUSUAL FLORAL ORGANS* and *FIMBRIATA*, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell* **7**,1501-1510.

Ingram, G.C., Doyle, S., Carpenter, R., Schultz, E.A., Simon, R. und Coen, E. S. (1997). Dual role for *FIMBRIATA* in regulating floral homeotic genes and cell division in *Antirrhinum*. *EMBO J.* **16**, 6521–6534.

Ishida, T., Aida, M., Takada, S. und Tasaka, M. (2000). Involvement of *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 60-67

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

Jackson, D. P. (1991). *In situ* hybridisation in plants. In: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press.

Jeong, S., Trotochaud, A. E. und Clark, S. E. (1999). The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-34.

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

Kato, T.M., Morita, T., Fukaki, H., Yamauchi, Y., Uehara, M., Niihama, M. und Tasaka, M. (2002). SGR2, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, Are Involved in the Shoot Gravitropism. *Plant Cell* **14**, 33–46.

Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L. und Fischer, R.L. (1996) The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *AP2*. *Plant Cell* **8**, 137-153

Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene size controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.

Krizek, B.A. und Meyerowitz, E. M. (1996). The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**, 11-22.

Lamb, R. S., Hill, T. A., Tan, Q. K. G. und Irish, V.F. (2002). Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* **129**, 2079-2086

Laufs, P., Coen, E. Kronenberger, J., Traas, J. und Doonan, J. (2003). Separable roles of *UFO* during floral development revealed by conditional restoration of gene function. *Development* **130**, 785-796

Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. und Jurgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.

Lee, I., Wolfe, D.S., Nilsson, O. und Weigel, D. (1997). A *LEAFY* co-regulator encoded by *UNUSUAL FLORAL ORGANS*. *Curr. Biol.* **7**, 95–104.

Lenhard, M., Bohnert, A., Juergens, G.und Laux, T. (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805–814.

Levin, J.Z. und Meyerowitz, E.M. (1995). *UFO*: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* **7**, 529–548.

Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S. und Yanofsky, M.F. (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell* **11**, 1007–1018.

Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R. und Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.

Lohmann, J.U. und Weigel D. (2002). Building Beauty: The Genetic Control of Floral Patterning. *Developmental Cell* **2**, 135-142.

Long, J. A. and Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-35.

Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. und Barton, M. K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-9.

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

Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. und Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-15.

Mizukami, Y. und Ma, H. (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene *agamous* in transgenic *arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* **71**, 119-131.

Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R. (1990). Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene intrans. *Plant Cell* **2**, 279-289.

Ng, M., und Yanofsky, M.F. (2001). Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1*. *Plant Cell* **13**, 739–754.

Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M. A., Lee, I. und Weigel, D. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-6.

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

Pelaz S., Tapia-Lopez R., Alvarez-Buylla E.R. und Yanofsky M.F. (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **11**, 182-184.

Poethig, S. (1989) Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genet.* **5**, 273–277

Pouteau, S., Nicholls, D., Tooke, F., Coen, E. und Battey, N. (1998). Transcription pattern of a *FIM* homologue in *Impatiens* during floral development and reversion. *Plant J.* **14**, 235–246

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

Rojo, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V. und Fletcher, J.C. (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969–977.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. und Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**, 463–472.

Sablowski, R.W., Moyano, E., Culianez-Macia, F.A., Schuch, W., Martin, C. und Bevan, M. (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* **13**, 128-37.

Samach, A., Klenz, J.E., Kohalmi, S.E., Risseuw, E., Haughn, G.W. und Crosby, W.L. (1999). The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J.* **20**, 433–445.

Satina, S. (1940). Demonstrations of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.* **27**, 895-905.

Satina, S. und Blakeslee, A.F. (1941). Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development of the carpel. *Amer. J. Bot.* **30**, 453-462.

Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G. und Laux, T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-44.

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

Shiraishi, H., Okada, K. und Shimura, Y. (1993). Nucleotide sequences recognized by the AGAMOUS MADS domain of *Arabidopsis thaliana* in vitro. *Plant J.* **4**, 385-398

Sharma, V.K., Carles, C. und Fletcher, J.C. (2003). Maintenance of stem cell populations in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11823-29.

Simon, R., Carpenter, R., Doyle, S. und Coen, E. (1994). *FIMBRIATA* controls flower development by mediating between meristem and floral organ identity genes. *Cell* **78**,99–107.

Smyth, D.R., Bowman, J.L. und Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.

Soellick, T.R. und Uhrig, J.F. (2001). Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biol.* **2** (12), research 0052.1-0052.7

Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J. und Koes, R. (1996). The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-70.

Steeves, T.A. und Sussex, I.M. (1989). *Patterns in Plant Development*. (New York: Cambridge University Press), 895-905.

Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. und Tasaka, M. (2001). The *CUP SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-35.

Tang, W. und Perry, S.E. (2003). Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15: an in vitro and in vivo study. *J Biol Chem.* **278**. 28154-9..

Taylor, S., Hofer, J. und Murfet, I. 2001 *Stamina pistilloida* , the Pea Ortholog of *Fim* And *UFO* Is Required for Normal Development of Flowers, Inflorescences, and Leaves. *Plant Cell* **13**, 31-46.

Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F. und Gilmartin, P.M. (2002). *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organization, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol* **42**, 819-32.

Theissen, G. und Saedler H. (2001). Floral quartets. *Nature* **409**, 469-471.

Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. und McKnight, S. L. (1988). Functional dissection of VP16, the transactivator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* **2**, 718–729.

Überlacker, B., Klinge, B. und Werr, W. (1996). Ectopic expression of the maize homeobox genes *ZmHox1a* or *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* **8**, 349-62.

Urao T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. und Shinozaki, K. (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-39.

Wagner, D., Sablowski, R.W.M. und Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**, 582–584.

Waites R. und Simon, R. (2000). Signaling cell fate in plant meristems: three clubs on one touse. *Cell* **103**, 835–838.

Wang, X., Feng, S., Nakayama, N., Crosby, W.L., Irish, V., Deng, X.W. und Wei, N. (2003). The COP9 signalosome interacts with SCF^{UFO} and participates in *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell* **15**, 1071-1082

Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F. und Meyerowitz, E.M. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843-859.

Weigel, D. und Nilsson, O. (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**, 495-500.

Wilkinson, M.D. und Haughn, G.W. (1995). *UNUSUAL FLORAL ORGANS* controls meristem identity and floral organ primordia fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**, 1485-1499

Wynne, J. und Treisman, R. (1992). SRF and MCM1 have related but distinct DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3297-3303.

Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. und Xie, D. (2002). The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1919-1935

Yang, M., Hu, Y., Lohdi, M., McCombie, W.R. und Ma, H. (1999). The *Arabidopsis* *SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 11416-11421.

Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A. und Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-9.

Zhang, S., Sandal, N., Polowick, P. L., Stiller, J., Jens Stougaard, J. und Fobert, P.R. (2003). *Proliferating Floral Organs (Pfo)*, a *Lotus japonicus* gene required for specifying floral meristem determinacy and organ identity, encodes an F-box protein. *Plant J* **33**, 607-619.

Zhao, D., Yang, M., Solava, J. und Ma, H. (2001). The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev Genet* **25**, 209-223.

Zhao, D., Yu, Q., Chen, M. und Ma, H. (2001). The *ASK1* gene regulates B function gene expression in cooperation with *UFO* and *LEAFY* in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 2735-2746.

Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., und Chua, N.H. (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **30**, 349-359.

Erklärung

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

Abstract

The Arabidopsis *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* gene is expressed in shoot and floral meristems of all developmental stages. In floral meristems, *UFO* acts as a cofactor of *LEAFY (LFY)* in the activation of B function floral homeotic genes. Thus, *UFO* represents a general meristem patterning factor.

To identify regulatory genes that control *UFO* expression, a dual strategy was performed. A mutagenesis screen aiming for regulators of *UFO* expression was conducted on the base of modification of the *UFO* expression pattern at the seedling stage. These modifications were monitored by expression of a *UFO::GFP* transgene. In addition, cis-regulatory elements were identified by using promoter deletion analysis.

In the mutagenesis screen, a mutant that failed to express the *GFP* transgene under control of *UFO* regulatory sequences was found. The corresponding gene was isolated and shown to be a novel *wuschel (wus)* allele. *WUS* encodes a homeodomain transcription factor that is expressed in the central zone of shoot and floral meristems and has been shown to positively regulate stem cell identity.

By ectopically expressing an inducible version of *WUS* under control of the constitutive *CaMV35S* promoter, I have shown that *WUS* activates *UFO* expression in the shoot meristem. This experiment also provided evidence that this interaction appears to be indirect and that *WUS* requires the presence of additional factors to activate *UFO* expression. Misexpression of *WUS* in roots of plants grown on medium containing high auxin concentrations led to the formation of ectopic shoot tissue and somatic embryos that strongly expressed a *UFO* reporter gene. This observation suggests that *WUS* itself can activate a meristematic program leading to the expression of cofactors required for *UFO* activation.

Additionally, misexpression experiments with the *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* gene provided evidence that *STM* can activate *UFO* expression indirectly.

The promoter deletion analysis revealed that the *UFO* promoter consists of several cis-elements located in distinct promoter regions. *UFO* expression in floral meristems and shoot meristems is controlled by separate cis-regulatory sequences. The expression pattern in the shoot meristem is regulated by separate elements as well. By 5' deletions, the shoot meristem pattern could be split into a central and a peripheral subdomain. The central

subdomain coincides with the *WUS* expression domain, suggesting that *WUS* may also provide positional information for the establishment of the UFO expression pattern.

Lebenslauf

GEBURTSDATUM	28. September 1971
GEBURTSORT	Düsseldorf
SCHULAUSSBILDUNG	1977-1982: Städtische Bavier-Gemeinschaftsgrundschule Erkrath 1982-1991: Gymnasium am Neanderthal Erkrath Mai 1991: Abitur
ZIVILDienst	Oktober 1991 bis Dezember 1992: Caritas-Pflegestation Erkrath/Haan/Hilden, Mobiler sozialer Hilfsdienst
HOCHSCHUL- AUSBILDUNG	1993-1994: Studium (2 Fachsemester) der Germanistik, Geschichte und Medienwissenschaften an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Grundkurs Niederländisch 1994-1996: Studium (Grundstudium) der Biologie an der Johannes- Gutenberg-Universität Mainz 1996-1998: Studium (Hauptstudium) der Biologie an der Universität zu Köln, Hauptfach: Entwicklungsbiologie; Nebenfächer: Genetik und Biochemie 1998-1999: Diplomarbeit (Fach: Entwicklungsbiologie) bei Dr. Rüdiger Simon, Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln; Titel: „Untersuchungen zum Stammzellschicksal in Meristemen von <i>Arabidopsis thaliana</i> “ seit 1999: Anfertigung der vorliegenden Dissertation; Titel: „Kontrolle der Expression des <i>UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)</i> Gens in <i>Arabidopsis thaliana</i> “ am Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Rüdiger Simon