

Musterbildung im Maisembryo:
Klonierung *NAM/CUC*-Orthologer aus *Zea mays* L.

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

vorgelegt von
Roman Zimmermann
aus Köln

Köln 2004

Berichterstatter:

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

03.02.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Embryogenese in <i>Zea mays</i> im Vergleich zu <i>Arabidopsis</i>	1
1.2 Molekulare Marker	5
1.2.1 Adaxiale/abaxiale Organisation im Proembryo	5
1.2.2 <i>Kn1</i> markiert meristematische Identität des SAM	6
1.2.3 <i>ZmSCR</i> markiert zelluläre Identität von Endodermis und ruhendem Zentrum.....	7
1.3 Die <i>NAC</i> Genfamilie	8
1.3.1 Molekulare Eigenschaften.....	8
1.3.2 SAM Initiation und Organseparation in Dikotylen.....	9
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 Material & Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien.....	12
2.1.3 Bakterienstämme.....	12
2.1.4 Vektoren.....	13
2.1.5 Oligonukleotide.....	13
2.2 Methoden	17
2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	17
2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	17
2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA	17
2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Zea mays</i>	17
2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Zea mays</i>	18
2.2.6 Extraktion von mRNA aus Gesamt-RNA	18
2.2.7 Synthese von cDNA aus mRNA mittels reverser Transkriptase	19
2.2.8 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	19
2.2.9 DNA Sequenzierung	21
2.2.10 Sichtung einer cDNA-Phagenbank	21
2.2.11 Transfer von DNA auf Membranfilter	21
2.2.12 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	22
2.2.13 Hybridisierung von Membran-gebundener DNA	22

2.2.14 Nicht-radioaktive RNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....	23
2.2.14.1 Gewebefixierung und Einbettung.....	23
2.2.14.2 Herstellung der Gewebeblöcke	24
2.2.14.3 Herstellung der Mikrotomschnitte	25
2.2.14.4 Präparation der <i>antisense</i> RNA Sonde.....	25
2.2.14.5 Hybridisierungsreaktion.....	27
2.2.14.6 Waschen der Schnitte.....	29
2.2.14.7 Detektion.....	30
2.2.14.8 Abstoppen der Reaktion und Schlussbehandlung der Gewebeschnitte	30
2.2.14.9 Puffer und Stammlösungen.....	31
2.2.15 Detektion von Apoptose mit Hilfe des <i>in situ Cell Death Detection Kits, AP</i>	32
2.2.16 RFLP Kartierung mittels rekombinanter Inzuchtlinien.....	32
2.2.17 Nomarsky Mikroskopie.....	32
2.2.18 Computerunterstützte Analysen.....	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Molekulare Klonierung <i>PhNAM/AtCUC</i> Verwandter aus <i>Zea mays</i>	34
3.1.1 Sichtung einer embryonalen cDNA-Bank	34
3.1.2 Sequenzanalyse in Datenbanken.....	36
3.2 Phylogenetische Klassifizierung aus <i>Zea mays</i> isolierter <i>NAC</i> Sequenzen.....	38
3.2.1 <i>AtCUC3</i> bildet mit <i>ZmCUC3</i> eine diskrete Gruppe.....	41
3.2.2 <i>PhNAM</i> kommt eine zentrale Stellung innerhalb des Stammbaums zu.....	41
3.2.3 Die <i>PhNAM</i> Gruppe zeichnet sich durch Homologien im C-Terminus aus	42
3.2.4 <i>ZmNAC4-6</i> werden weitestgehend unbekanntem Vertretern zugeordnet	43
3.3 Bestimmung von chromosomalen Kartierungspositionen.....	44
3.4 <i>NAC</i> Gene liefern Einblicke in frühe Musterbildungsprozesse	46
3.4.1 <i>ZmNAC4</i> Expression ist hoch Endosperm-spezifisch.....	47
3.4.2 Etablierung des apikalen Sprossmeristems	48
3.4.2.1 <i>ZmCUC3</i> und <i>ZmNAM1/2</i> werden ringförmig um das SAM exprimiert.....	48
3.4.2.2 <i>Kn1</i> und <i>ZmNAM1</i> werden im frühen Transitions-Stadium ko-aktiviert.....	50
3.4.2.3 <i>ZmCUC3</i> Expression markiert die Anlage lateraler Organe.....	52
3.4.2.4 <i>ZmCUC3</i> - und <i>ZmNAM1/2</i> Expression in Infloreszenzen	54
3.4.3 Entstehung der embryonalen Wurzel.....	56
3.4.3.1 <i>ZmSCR</i> wird vor <i>ZmNAC6</i> zentral im Proembryo aktiviert.....	56
3.4.3.2 Die <i>ZmSCR</i> Domäne gibt Lage und Orientierung der <i>ZmNAC6</i> Domäne vor.....	56

3.4.3.3 <i>ZmNAC5/6</i> markieren zelluläre Identität der Koleorrhiza/Wurzelhaube.....	57
3.4.3.4 Wurzel und Koleorrhiza werden über lokale Zellwandauflösung getrennt	58
3.4.4 Vergleichende Analyse der Expressionsmuster von <i>Kn1</i> und <i>ZmSCR</i>	60
3.4.4.1 Die <i>Kn1</i> Domäne entsteht lateral verschoben zu der von <i>ZmSCR</i>	60
3.4.4.2 <i>Kn1</i> Expression grenzt Zellen der embryonalen Achse vom Skutellum ab.....	60
4. Diskussion	63
4.1 Phylogenie aus <i>Zea mays</i> isolierter <i>NAC</i> Sequenzen.....	63
4.1.1 <i>ZmCUC3</i> und <i>ZmNAMI/2</i> repräsentieren konservierte Linien.....	63
4.1.2 <i>ZmNAMI/2</i> werden wahrscheinlich über miRNAs reguliert	65
4.2 Charakterisierung embryonaler <i>NAC</i> Genexpressionsmuster.....	69
4.2.1 Etablierung des apikalen Sprossmeristems	69
4.2.1.1 <i>ZmCUC3</i> - und <i>ZmNAMI/2</i> Muster bestätigen phylogenetische Vorhersagen.....	69
4.2.1.2 Die Initiation des SAM erfolgt unterschiedlich in Mais und <i>Arabidopsis</i>	70
4.2.1.3 <i>ZmNAMI</i> trägt zur Spezifizierung primordialer Zellidentität bei	72
4.2.2 Anlage der embryonalen Wurzel	72
4.2.2.1 Zellen des Wurzelmeristems werden vor denen des SAM angelegt.....	72
4.2.2.1 <i>ZmNAC5/6</i> Expression markiert apikal/basale Polarität des Wurzelmeristems.....	73
4.2.2.2 Koleorrhiza und Wurzelhaube werden über lokale Zellwandauflösung getrennt..	74
4.2.3 Die <i>Kn1</i> Domäne besitzt eine zentrale Stellung innerhalb der Spross-Wurzel Achse	74
4.2.4 Die Spross-Wurzel Achse wird als Subgruppe des Embryos spezifiziert.....	75
4.3 Ausblick	76
5. Zusammenfassung	77
6. Abstract.....	79
7. Literaturverzeichnis	80
Abkürzungsverzeichnis	89

1. Einleitung

Während der Embryogenese wird der Bauplan des Lebens festgelegt. Die endgültige Form des Embryos resultiert aus der koordinierten Steuerung von Musterbildungsprozessen. Als Musterbildung bezeichnet man den Vorgang, durch welchen einzelne Zellen oder Zellgruppen distinkte Entwicklungsprogramme in Abhängigkeit ihrer relativen Lage zueinander erfahren (Jürgens et al., 1991). Höhere Pflanzen wie *Zea mays* oder *Arabidopsis thaliana* nehmen hier eine besondere Stellung ein: im Gegensatz zu tierischen Systemen wird nahezu der gesamte Pflanzenkörper nach der Embryogenese gebildet. Die postembryonale Entwicklung geht dabei auf zwei, an gegenüberliegenden Polen des Embryos angelegte Meristeme zurück. Die apikalen Meristeme erhalten über den gesamten Lebenszyklus der Pflanze ein Reservoir an Stammzellen als ultimative Quelle für die Anlage neuer Organe (Weigel und Jürgens, 2002). Das apikale Wurzelmeristem bildet die Primärwurzel und das laterale Wurzelsystem; oberirdische Organe wie Stamm, Blätter, Seitentriebe und Blüten haben ihren Ursprung im sprossapikalen Meristem (SAM). Einblicke in embryonale Musterbildungsprozesse, wie beispielsweise der Etablierung des SAM, liefern also einen bedeutenden Beitrag zum Grundverständnis pflanzlicher Entwicklung.

1.1 Die Embryogenese in *Zea mays* im Vergleich zu *Arabidopsis*

Monokotyle und Dikotyle, als die beiden Klassen der Angiospermen, zeichnen sich durch wesentliche Unterschiede in der Grundorganisation des Embryos aus. Ein signifikanter Unterschied besteht in der Position, an der das embryonale SAM angelegt wird. Während es in Dikotylen von den beiden Keimblättern (Kotyledonen) am apikalen Pol des Embryos symmetrisch flankiert wird, entwickeln Monokotyle ein singuläres Keimblatt (Skutellum), das das Sprossmeristem überwächst und in eine seitliche Lage drängt (Haccius, 1952; Baude, 1956). Möglicherweise besteht dabei ein kausaler Zusammenhang zwischen der Anlage des SAM an lateraler Position der adaxialen Spross-Wurzel Achse und der Ausbildung des Skutellums an der gegenüberliegenden, abaxialen Seite des Embryos (van Lammeren, 1986). Im Gegensatz zur Dikotylen *Arabidopsis* ist beispielsweise der Kenntnistand über die Zelltyp-Spezifizierung im Maisembryo eher rudimentär. Erkenntnisse über embryonale Entwicklungsprozesse beruhen hier weitestgehend auf histologischen Studien (Randolph, 1936; Abbe und Stein, 1954). Aufeinander folgende Entwicklungs-Stadien der Embryogenesen in *Arabidopsis* und *Zea mays* sind in Abbildung 1A bzw. 1B dargestellt.

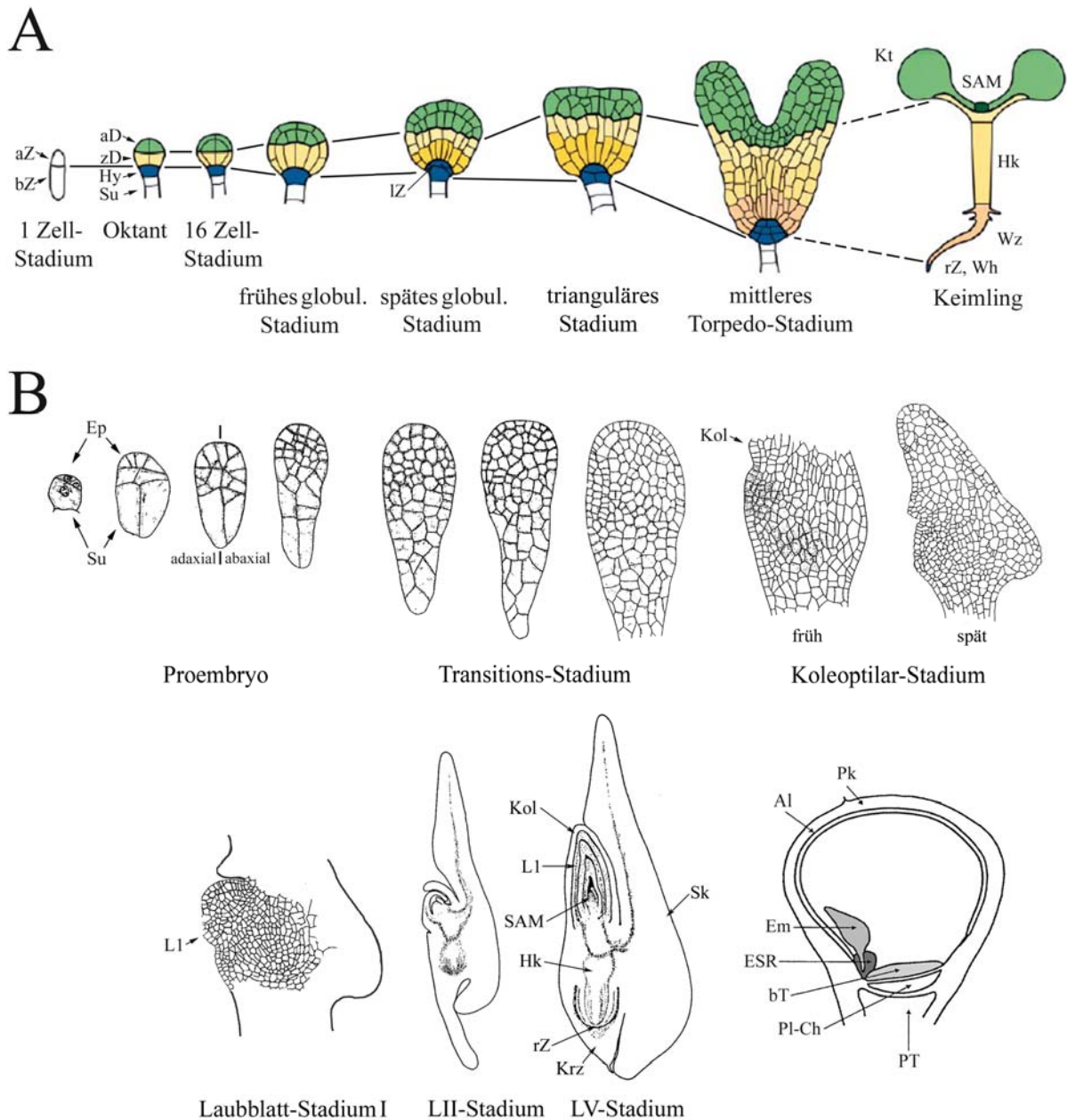


Abb.1: A: Embryogenese in *Arabidopsis thaliana*. Der Farbcode und die Verbindungslinien geben an, aus welchen Zellen des frühen Embryos entsprechende Strukturen des Keimlings hervorgehen (modifiziert nach Laux, 2004).

B: Embryonale Entwicklung in *Zea mays* und Anordnung im Maiskorn (nach Randolph, 1936). Spätere Stadien werden nach der Anzahl angelegter Blattprimordien bezeichnet. Exemplarisch sind Laubblatt-Stadium I, II und V gezeigt.

aZ/bZ: apikale/basale Zelle; aD/zD: apikale/zentrale Domäne; Hy: Hypophyse; Su: Suspensor; IZ: linsenförmige Zelle; Kt: Kotyledon; SAM: sprossapikales Meristem; Hk: Hypokotyl; Wz: Wurzel; rZ: ruhendes Zentrum; Wh: Wurzelhaube; Ep: Embryo *proper*; Kol: Koleoptile; L1: erstes Laubblatt; Krz: Koleorrhiza; Sk: Skutellum; Al: Aleuronschicht; Pk: Perikarp; Em: Embryo; ESR: *embryo surrounding region*; bT: basale Transferschicht; Pl-Ch: Plazento-Chalaza; PT: Phloem Terminal.

Die Embryogenese in *Arabidopsis* wird nachfolgend gemäß Johri et al. (1992) beschrieben. Die Maisembryogenese wird basierend auf den histologischen Studien von Randolph (1936) vorgestellt. Entwicklungs-Stadien werden dabei nach dem von Abbe und Stein (1954) entwickelten Schema eingeteilt.

In beiden Spezies streckt sich die Zygote nach der Befruchtung in Richtung der zukünftigen apikal-basalen Achse. In *Arabidopsis* wird nach 10-12 Stunden und in *Zea mays* nach etwa 40 Stunden die Embryogenese gleichermaßen durch die asymmetrische Teilung der Zygote in eine kleine apikale und eine größere basale Zelle eingeleitet.

Im Gegensatz zu Mais folgt die frühe embryonale Entwicklung in *Arabidopsis* einem regelmäßigen, vorhersagbaren Zellteilungsmuster (Mansfield und Briarty, 1991; Jürgens und Mayer, 1994). Diese Art der Musterbildung nimmt innerhalb des Pflanzenreiches eher eine Ausnahmestellung ein und ist lediglich für Vertreter der *Brassicaceae* charakteristisch (Johri et al., 1992). Die apikale Zelle durchläuft zuerst zwei senkrechte, dann eine waagerechte Furchungsteilung, wodurch ein 8-zelliger Proembryo (Oktant) entsteht, der in 2 Lagen organisiert ist. Aus der oberen Lage gehen im weiteren Verlauf vor allem die Kotyledonen und das SAM, aus der unteren Lage das Hypokotyl und die Wurzel hervor. Aus der basalen Zelle entsteht durch wiederholte horizontale Teilungen ein Faden aus etwa 6-9 Zellen. Die an den Proembryo des Oktant-Stadiums angrenzende Zelle wird zur Hypophyse, die übrigen Zellen bilden den Suspensor. Die Hypophyse kann als die Gründerzelle der basalen Region des Embryos angesehen werden: während des globulären Stadiums teilt sie sich asymmetrisch in eine obere linsenförmige und eine größere trapezoidförmige Zelle. Aus der linsenförmigen Zelle geht das ruhende Zentrum des Wurzelmeristems hervor; aus der trapezoidförmigen entstehen die Initialen der Wurzelhaube. Zwischen Oktant- und Herzstadium werden durch eine Abfolge radialer Zellteilungen innerhalb des Embryo *propers* von außen nach innen konzentrische Zellschichten angelegt, die sich in Protoderm, Grundgewebe, prospektives Perizykel und Vorläuferzellen von Phloem und Xylem aufteilen. Am apikalen Pol entsteht im späten globulären Stadium zentral das SAM, welches im triangulären Stadium von den Keimblattprimordien symmetrisch flankiert wird. Der grundlegende Organisation des Embryos ist mit der Anlage der Kotyledonen und dem damit verbundenen Übergang von einer radiär symmetrischen, globulären zu einer bilateral symmetrischen, annähernd herzförmigen Gestalt weitestgehend abgeschlossen. Im Torpedo-Stadium wird der radiale Aufbau durch die Aufteilung des Grundgewebes in Kortex und Endodermis vervollständigt.

Die Grundgestalt des *Arabidopsis* Embryos wird demnach über ein stereotypes, vorhersagbares Zellteilungsmuster etabliert und kann auf einzelne Zellen des frühen Embryos zurückverfolgt werden.

Dies ist in *Zea mays* histologisch nicht möglich. Nach der asymmetrischen Teilung der Zygote gehen hier über zufällig erscheinende, ungerichtete Zellteilungen (Randolph 1936; Poethig et al., 1986) aus der apikalen Zelle die zytoplasmareicheren Zellen des Embryo *propers* hervor. Diese stellen einen vielzelligen (flächigen) Übergang zu den sich ebenfalls ungerichtet teilenden, stärker vakuolisierten Zellen des Suspensors (Randolph 1936; van Lammeren 1986). Embryo *proper* und Suspensor bilden zusammen den Proembryo, in welchem etwa am 5. Tag nach der Befruchtung (*DAP-days after pollination*) protodermale Zellen histologisch von darunterliegenden Zellschichten unterscheidbar sind (Randolph, 1936).

Zum Übergang in das kurze, etwa 2 Tage dauernde Transitions-Stadium ändert der zuvor keulenförmige, radiär-symmetrische Proembryo seine äußere Gestalt: auf der abaxialen, dem Endosperm zugewandten Seite wird durch Zellstreckung zuerst schwach, im frühen Koleoptilar-Stadium deutlicher erkennbar das Skutellum angelegt. Der Maisembryo weist nun eine klare adaxiale/abaxiale Polarität auf. Als Konsequenz des seitlich angelegten Keimblattes besitzt der monokotyle Embryo lediglich eine einzige Symmetrieebene, die in Mais median, longitudinal entlang der späteren Blattmittelrippe verläuft. Im mittleren bis späten Transitions-Stadium zeichnet sich auf der adaxialen Seite unterhalb der apikalen Spitze des Embryos eine kleine Gruppe kompakter Zellen mit erhöhter mitotischer Aktivität ab, die sich im weiteren Verlauf bis zur Suspensorgrenze des Embryos erstreckt. Aus dieser Zellgruppe gehen die beiden Meristeme hervor: an der adaxialen Seite entsteht das SAM, während sich zentral im Embryo das apikale Wurzelmeristem bildet. Auf diese Weise wird zum Übergang ins Koleoptilar-Stadium (bei etwa 7-8DAP) die Spross-Wurzel Achse des Maisembryos angelegt, die bedingt durch das Auswachsen des Skutellums auf der abaxialen Seite, schräg verschoben zur ehemals apikal-basalen Achse der Zygote liegt. Charakteristisch für das Koleoptilar-Stadium ist das Auswachsen der Koleoptile an der apikalen Flanke des SAM, welche nach und nach den oberen Bereich der Spross-Wurzel Achse umwächst. Neben der fortschreitenden Differenzierung bereits angelegter embryonaler Organe werden im weiteren Verlauf ab etwa 10-12DAP alternierend an adaxialer und abaxialer Seite des SAM in disticher Phyllotaxis bis zu 6 Blattprimordien angelegt. Korrespondierende Entwicklungsstadien werden gemäß der Anlage neuer Blätter benannt. Das SAM in Mais ist im Gegensatz

zu *Arabidopsis* also bereits während der Embryogenese aktiv. Der späte Maisembryo stellt somit eine Miniaturpflanze dar.

Zum Laubblatt-Stadium 3 (14-15DAP) wird lateral der Zellverband zwischen Wurzel und Koleorrhiza aufgelöst. Im Gegensatz zu *Arabidopsis* geht also die embryonale Maiswurzel endogen aus einem zuvor konnektiven Gewebeverband hervor (Yamashita, 1991; Yamashita and Ueno, 1992). Koleoptile und Koleorrhiza stellen zwei ausschliesslich in der Familie der *Poaceae* vorkommende embryonale Organe dar (Tillich, 1977), die das SAM samt angelegter Blätter bzw. die Wurzel während der Embryogenese und der Keimung schützend umgeben. Die Spross-Wurzel Achse wird nahezu vollständig vom Skutellum umwachsen, welches für die späte embryonale Entwicklung und die Keimung Nährstoffe aus dem angrenzenden Endosperm resorbiert.

In Mais und *Arabidopsis* angelegte apikale Meristeme sind hinsichtlich ihres Aufbaus durch signifikante Unterschiede gekennzeichnet. In *Arabidopsis* bilden die äußere L1- und L2-Schicht die Tunika, während aus der L3 Schicht der Korpus hervorgeht (Esau 1969; Steeves and Sussex 1989; Kerstetter und Hake 1997). Hingegen ist unklar, ob das SAM in Mais eine distinkte L2-Schicht bildet (Esau 1969).

Beide Spezies besitzen geschlossene Wurzelmeristeme mit einschichtiger Epidermis und Endodermis. Im Gegensatz zu 4 Zellen in *Arabidopsis*, besitzt das Wurzelmeristem in Mais ein ruhendes Zentrum von etwa 800 bis 1200 Zellen (Jiang et al., 2003). Die primäre Maiswurzel bildet im Gegensatz zu *Arabidopsis* mehrere Kortexschichten (8-15) sowie unabhängige Initialen für Epidermis und Wurzelhaube (Esau, 1969).

1.2 Molekulare Marker

1.2.1 Adaxiale/abaxiale Organisation im Proembryo

Die Anzahl für den Maisembryo verfügbarer molekularer Marker ist vergleichsweise gering - dennoch konnten aufgrund charakteristischer, hoch Zelltyp-spezifischer Expressionsmuster bereits detaillierte Erkenntnisse über embryonale Musterbildungsprozesse gewonnen werden. Das Transkriptionsmuster von *LTP2* (*lipid transfer protein2*, Sossountzov et al., 1991) markiert protodermale Zellidentität des Proembryos. Zellen im Bereich des prospektiven SAM bleiben dabei frei von *LTP2*-Transkript (Bommert und Werr, 2001). Das *LTP2* Expressionsmuster deutet also im Gegensatz zu Ergebnissen histologischer Studien (Randolph, 1936) auf eine asymmetrische Organisation des Proembryos hin. Diese Beobachtung zeigt sich auch anhand der Expressionsmuster von Vertretern der Familie der

ZmOCL-Transkriptionsfaktoren (*Zea mays outer cell layer*, Ingram et al., 1999/2000). *ZmOCL* Gene sind verwandt zu *AtML1* (*Arabidopsis thaliana meristem L1 layer*), welches epidermale Zellidentität markiert (Lu et al., 1996). *ZmOCL4*-Transkript ist präferentiell in der adaxialen L1 des Maisproembryos nachweisbar, während *ZmOCL5* Expression am stärksten auf der abaxialen Seite detektiert wird. Histologisch sichtbare adaxiale/abaxiale Polarität im späten Transitions-Stadium ist anhand der Expressionsmuster von *ZmOCL4/5* also bereits im Protoderm des frühen Embryo *propers* nachweisbar. Zusammenfassend deuten die Expressionsmuster von *LTP2* und *ZmOCL4/5* darauf hin, dass der sich histologisch scheinbar ungeordnet teilende Embryo *proper* bereits früh in distinkte Regionen organisiert ist (Bommert und Werr, 2001).

1.2.2 *Kn1* markiert meristematische Identität des SAM

In *Zea mays* ist der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *KNOTTED-1* (*Kn1*, Vollbrecht et al., 1991) von zentraler Bedeutung für die Entwicklung des SAM: in bestimmten genetischen Hintergründen wird in *KN1* Funktionsverlust-Mutanten beobachtet, dass 50% der Embryonen nach dem Erreichen des Koleoptilarstadiums ihre Entwicklung einstellen. In den verbleibenden 50% entwickelt sich das sprossapikale Meristem aberrant und bildet anstelle des charakteristischen meristematischen Domes ein abgeflachtes Gewebe, das keinerlei Funktion ausübt. Die Koleoptile wird in diesen Mutanten normal ausgeprägt (Vollbrecht et al., 2000). Schwächere *KN1* Funktionsverlust-Allele bilden Blütenstände mit reduzierter Anzahl angelegter *spikelet pair*-, *spikelet*- und Blütenmeristeme (Kerstetter et al., 1997). Die Expression von *Kn1* unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promotors in *Nicotiana tabacum* führt zur Bildung ektopischer Meristeme (Sinha et al., 1993). Diese Beobachtungen zeigen, dass *Kn1* in *Zea mays* essentiell für die Entstehung und Aufrechterhaltung des SAM ist.

Kn1 stellt derzeit den frühesten verfügbaren Marker für die Entwicklung des SAM im Maisembryo dar. Das embryonale Expressionsmuster von *Kn1* (Smith et al., 1995) wird in den Abschnitten 3.4.2 und 3.4.4 im Rahmen vergleichender Markeranalysen vorgestellt werden.

Das Homöobox-Gen *STM* aus *Arabidopsis* (*SHOOT MERISTEMLESS*, Long et al., 1996) ist durch analoge Funktionsverlust- und Überexpressions-Phänotypen (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996; Gallois et al., 2002) charakterisiert und stellt das orthologe Gen zu *Kn1* dar.

Auf Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede im Expressionsmuster von *STM* im Vergleich zu *Kn1* wird im Abschnitt 4.2.1 Bezug genommen werden.

1.2.3 *ZmSCR* markiert zelluläre Identität von Endodermis und ruhendem Zentrum

STM ist essentiell für die Etablierung des SAM; *SCARECROW* (*AtSCR*) hingegen kommt in *Arabidopsis* eine bedeutende Funktion bei der Anlage der Wurzel zu: in *scr* Funktionsverlust-Mutanten wird die asymmetrische Teilung der gemeinsamen Vorläuferzelle von Kortex und Endodermis nicht vollzogen. Die zwischen Perizykel und Endodermis liegende Schicht aberrant entwickelter Wurzeln weist entsprechend endodermale wie kortikale Zellidentität auf (Di Laurenzio et al., 1996). Die frühe embryonale Entwicklung in *scr* Mutanten zeigt im Abgleich zum wildtypischen *AtSCR* Expressionsmuster eine klare Korrelation zwischen aberranter Zellteilung und Expression in Zellen, die zur konzentrischen Anlage der kortikalen Zellschicht der Wurzel beitragen (Wysocka-Diller et al., 2000). *AtSCR* ist also maßgeblich an der frühen Etablierung der radiären Organisation der Wurzel beteiligt.

In einem auf Sequenzhomologie basierenden Ansatz konnte das potentiell funktionale *AtSCR* Orthologe aus Mais isoliert werden (*ZmSCR*, Lim et al., 2000):

ZmSCR kodiert ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor der *GRAS*-Genfamilie und weist eine ähnliche Exon-Intron Struktur auf. *ZmSCR*-Genexpressionsanalysen im Rahmen der Regeneration von Wurzelspitzen deuten ferner auf eine vergleichbare Funktion bei der Wurzelanlage in Mais hin (Lim et al., 2000). Trotz des Unterschieds im Aufbau monokotyle und dikotyle Wurzeln (Abschnitt 1.1) wird *ZmSCR* wie *AtSCR* in einer einschichtigen, scheidelförmigen Domäne in der endodermalen Zellschicht und dem ruhenden Zentrum exprimiert (Lim et al., 2000; Scheres et al. 1995; Di Laurenzio et al. 1996).

Aufgrund des charakteristischen Expressionsmusters stellt *ZmSCR* einen informativen Marker für die Entwicklung des Wurzelmeristems im Maisembryo dar. Der räumliche und zeitliche Vergleich des embryonalen *ZmSCR* Transkriptionsmusters zu dem von *Kn1* und anderer, im Rahmen dieser Arbeit etablierter Marker wird in den Abschnitten 3.4.3 und 3.4.4 vorgestellt werden.

1.3 Die NAC Genfamilie

1.3.1 Molekulare Eigenschaften

Namensgebend für die Familie der *NAC* Gene sind die Anfangsbuchstaben der zuerst identifizierten Vertreter *NO APICAL MERISTEM* aus *Petunia hybrida* (*PhNAM*, Souer et al., 1996), *ATAF1/2* und *CUP-SHAPED COTYLEDON2* aus *Arabidopsis thaliana* (*AtCUC2*, Aida et al., 1997). Das *Arabidopsis* Genom kodiert für 105 und das Reisgenom für 75 Vertreter dieser Familie (Ooka et al., 2003). Außerhalb des Pflanzenreiches können *NAC* Sequenzen nicht nachgewiesen werden. Jedes Gen dieser Familie kodiert für eine konservierte, N-terminale *NAC* Domäne (Aida et al., 1997) sowie eine individuell unterschiedliche C-terminale Domäne. Jede *NAC* Domäne gliedert sich in fünf stark konservierte Teildomänen (A-E, siehe Abbildung 2), die durch Bereiche heterogener Aminosäure-Konstitution voneinander unterschieden werden können (Kikuchi et al., 2000). Allgemein wird vermutet, dass *NAC* Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren. Für diese Annahme sprechen folgende Befunde:

Für die C-terminalen Domänen der *NAC* Proteine *ATAF1/2*, *AtNAC1* (Xie et al. 2000) und *AtCUC1/2* (Taoka et al., 2004) wurde in Hefe 2-Hybrid Systemen gezeigt, dass sie transaktivierend auf den *CaMV* 35S-Promotor wirken. Für die *NAC* Domäne von *AtNAM* konnten DNA-bindende Fähigkeiten nachgewiesen werden (Duval et al., 2002); innerhalb der *NAC* Domäne von *AtNAC1* wurde eine Kernlokalisations-Sequenz identifiziert (Xie et al., 2000). Durch Gelfiltrations-Studien konnte gezeigt werden, dass die *NAC* Domäne von *AtANAC* (Greve et al., 2003) in Lösung Homodimere ausbildet (Olsen et al., 2004). Außerdem konnte die Röntgenstruktur dieser *NAC* Domäne gelöst werden: sie repräsentiert ein neuartiges Transkriptionsfaktor-Motiv, das sich in ein antiparalleles β -Faltblatt umgeben von einigen helikalen Elementen faltet (Ernst et al., 2004).

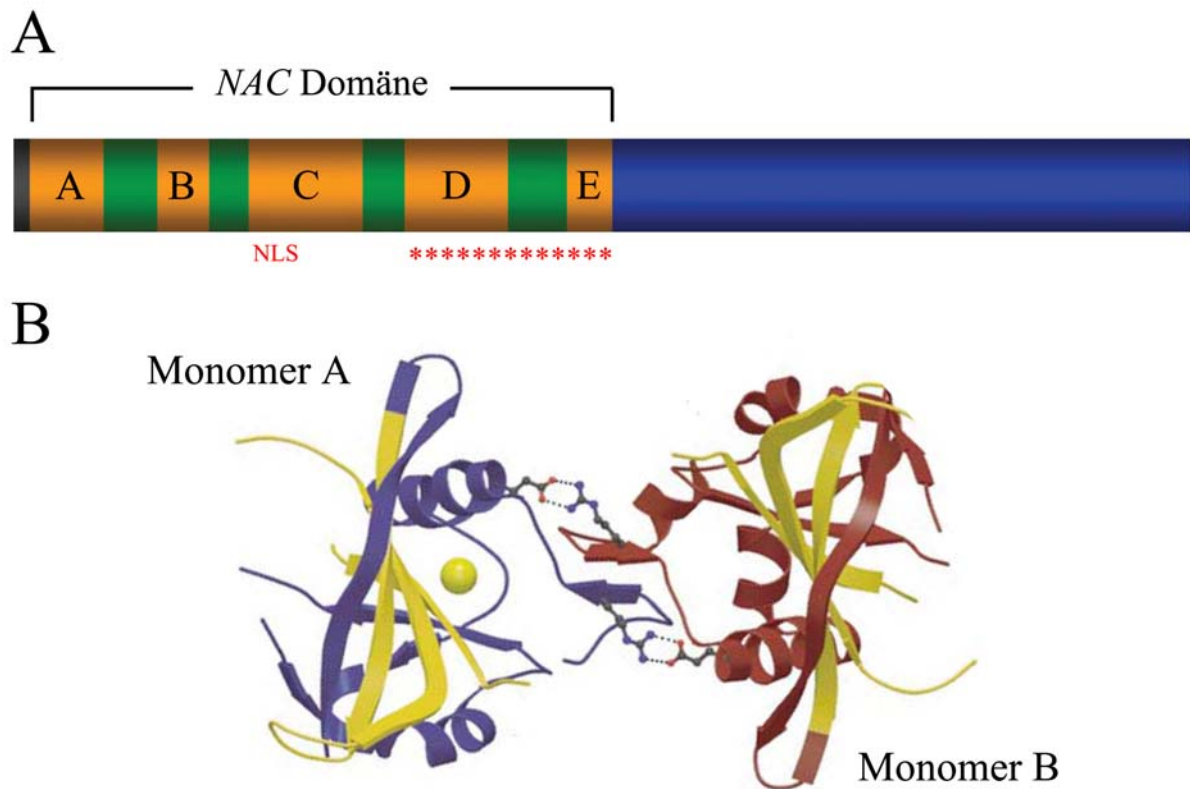


Abb. 2 A: schematisch dargestellt ist die relative Anordnung der unterschiedlichen Domänen innerhalb eines *NAC* Proteins. Jede *NAC* Domäne gliedert sich in die stark konservierten Teildomänen A-E, die durch heterogene Regionen (in grün hervorgehoben) voneinander unterschieden werden können. Die C-terminale Domäne ist in blau gezeigt. Die Position der Kernlokalisations-Sequenz in *AtNAC1* ist durch die Buchstabenfolge „NLS“, die Lage des DNA-bindenden Motivs in *AtANAC* durch rote Sternchen angegeben.

B: als *Cartoon* dargestellt ist die Röntgenstruktur des aus zwei *NAC* Domänen von *AtANAC* (Monomer A und B) gebildeten Dimers. Zwischen konservierten Resten ausgebildete Salzbrücken sind durch gestrichelte Linien wiedergegeben. DNA-bindende Regionen innerhalb der in blau und rot gezeigten Monomere sind in gelb hervorgehoben (aus Ernst et al., 2004).

1.3.2 SAM Initiation und Organseparation in Dikotylen

Als pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren sind *NAC* Gene maßgeblich an diversen Entwicklungsprozessen wie etwa der Blütenentwicklung (*AtNAP*, Sablowski et al., 1998), der Bildung lateraler Wurzeln (*AtNAC1*, Xie et al., 2000), der Blattseneszenz (*SENU5*, John et al., 1997) oder der Pathogen-Abwehr (Ren et al., 2000) beteiligt. Funktionale Studien wurden bisher nur für *NAC* Gene aus Dikotylen veröffentlicht. Dabei konnte bereits für mehrere Spezies gezeigt werden, dass *NAC* Gene auch essentiell für die Etablierung des SAM und die Separation von lateralen Organen sind: *PhNAM* Funktionsverlust-Mutanten legen kein SAM an, zusätzlich sind Kotyledonen und Blütenorgane an ihren Rändern miteinander fusioniert (Souer et al., 1996). Mutationen in *CUPULIFORMIS* aus *Antirrhinum majus* (*AmCUP*, Weir et al., 2004) führen zu ähnlichen Defekten. Der Fusionsphänotyp ist hier generell stärker ausgeprägt und tritt auch in der vegetativen Phase auf.

In *Arabidopsis* führt die Kombination von Mutationen in *AtCUC1/2* oder *AtCUC2/3* (*AtCUC1*, Aida et al., 1999; *AtCUC3*, Vroemen et al., 2003) zu einem Verlust der SAM-Anlage und der charakteristischen tassenförmigen („*cup-shaped*“) Fusion der Kotyledonen. *cuc1cuc3* Doppelmutanten hingegen bilden ein funktionales SAM aus. Allerdings tragen *AtCUC1* und *AtCUC3* nicht unwesentlich zur Anlage des SAM bei: eine einzelne Mutation in *AtCUC2* reicht nicht aus, um den SAM-Verlust zu erzeugen. Die 3 *AtCUC* Gene kodieren also für partiell redundante Genfunktionen: *AtCUC2* trägt hauptsächlich zur Anlage des SAM bei, *AtCUC1* und *AtCUC3* eher zur Entwicklung lateraler Organe. Dabei ist der Einfluss von *AtCUC3* größer als der von *AtCUC1*: homozygote *cuc3*-Einzelmutanten zeigen eine höhere Frequenz fusionierter Kotyledonen als entsprechende *cuc1*-Mutanten (Aida et al., 1999; Vroemen et al., 2003).

In *cuc1cuc2* oder *cuc2cuc3* Embryonen wird *STM* nicht aktiviert. *AtCUC1-3* wirken also über *STM* auf die Anlage des SAM (Aida et al., 1999; Vroemen et al., 2003). Entsprechend werden alle drei *AtCUC* Gene streifenförmig in einem zentralen Bereich des apikalen globulären Embryos transkribiert, in dem erst nachfolgend *STM* exprimiert wird. *AtCUC1-3* Genexpression markiert also die prospektive Anlage des SAM.

AtCUC1/2 Genaktivität wird post-transkriptional über miRNAs reguliert. Für *AtCUC3* hingegen kann keine miRNA oder entsprechende Zielsequenz identifiziert werden (Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2004).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels geeigneter molekularer Marker Musterbildungsprozesse im Maisembryo darzustellen und in ihrer räumlichen und zeitlichen Relation zueinander aufzuklären. Da dabei das Hauptaugenmerk auf der Entstehung des SAM lag, wurde die Identifizierung früher meristemspezifischer Marker angestrebt. Basierend auf der Sequenz der hochkonservierten *NAC* Domäne sollten hierfür, so im Maisgenom vertreten, *PhNAM*- bzw. *AtCUC* Orthologe isoliert und Verwandtschaftsbeziehungen in phylogenetischen Rekonstruktionen verifiziert werden. Aufbauend sollten frühe embryonale Transkriptionsmuster erfasst und in Relation zu den Expressionsmustern von *Kn1* und *ZmSCR* dargestellt werden. Durch die vergleichende Betrachtung zur Embryogenese in *Arabidopsis* sollte ein Beitrag zur Aufklärung allgemeiner Prinzipien der Musterbildung in Angiospermen geleistet werden. In einem parallelen Ansatz sollten isolierte Gene kartiert und, insofern möglich, korrespondierende Mutationen assoziiert, verifiziert und funktional analysiert werden.

- Bakterienstamm für chemische Transformationen:

TOP 10 F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, rpsL (Str^R), endA1, nupG
(Invitrogen)

- Bakterienstämme für die Sichtung der cDNA Phagenbank (Abschnitt 3.1.1):

XL1-Blue MRF' Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]
(Stratagene)

SOLR e14⁻(McrA⁻), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, uvrC, umuC::Tn5 (Kan^r), lac gyrA96, relA1, thi-1, endA1, λ^R [F' proAB, lacI^qZΔM15] Su⁻
(Stratagene)

2.1.4 Vektoren

pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen)
pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen)
pBluescript II KS (+/-) (Stratagene)
pBluescript SK (+/-) (Stratagene)

2.1.5 Oligonukleotide

Sämtliche verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentech (Seraing, Belgien) oder Sigma (Taufkirchen) bestellt.

- degenerierte Primer zur Amplifikation von NAC-Genfragmenten aus Mais:

CUCF 5'-GAR-AAR-GAR-TGG-TAY-TTY-TT-3'

CUCR 5'-TAY-TCR-TGC-ATN-AYC-CAR-TT-3'

Wobbles: N:A+C+G+T R:A+G Y:C+T

- Primer für 3' RACE Reaktionen:

- Primer für die cDNA Synthese:

291 5'-CCA-CGA-GTC-GAC-TCT-AGA-GCT-CGG-ATC-CTT-TTT-TTT-3'

- 3'UTR-Konsensus-*Primer*:

290 5'-CCA-CGA-GTC-GAC-TCT-AG-3'

289 5'-CTC-TAG-AGC-TCG-GAT-CC-3'

- genspezifische *Primer*:

BQ779832F1 5'-TGA-GAG-TGC-AGA-TTG-GCA-AGG-3'

BQ779832F2 5'-CTT-TCC-CCT-CTT-GGA-TTC-TCC-3'

BZ782732F1 5'-GAG-GGT-GTT-CCA-GAA-GCC-AG-3'

BZ782732F2 5'-AGT-CCT-GCT-TCT-CGG-ACT-CC-3'

- *Primer für die Sequenzierung*:

M13fwd 5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3'

M13-20 5'-GGA-AAC-AGC-TAT-GAC-CAT-G-3'

ZmNAC4F1 5'-TGG-GCG-AGA-AAG-AGT-GG-3'

ZmNAC4F2 5'-CTG-GGA-TCA-AGA-AGA-CC-3'

ZmNAC4F3 5'-GAA-AAC-GTG-GAG-GGT-GG-3'

ZmNAC4R1 5'-GCC-ACC-ACC-TAT-ACC-TG -3'

ZmNAC4R2 5'-GGT-CTT-CTT-GAT-CCC-AG-3'

ZmNAC5F1 5'-CTG-TCG-GTG-CCA-CCA-GGC-TTC-3'

ZmNAC5F2 5'-ATT-GGT-CGA-TCC-TAG-ACA-AGC-3'

ZmNAC5F3 5'-GAA-GAG-CTA-TCA-CCA-GAG-3'

ZmNAC5F4 5'-TGG-TGT-GCT-GCT-TCT-TGG-3'

ZmNAC5F5 5'-AGC-TCC-TCT-ACT-ACT-ACC-TGA -3'

ZmNAC5R1 5'-CAT-GAG-CTG-CTG-ATG-GTA-TAC-3'

ZmNAC5R2 5'-ATC-CTC-CTG-GAG-GCG-TTG-CCG-3'

ZmNAC5R3 5'-GCA-CCT-AAC-AAG-CAA-CCC-3'

ZmNAC5R5 5'-ATT-CTA-CTG-GAG-GCG-TTG-CCG-3'

ZmNAC5R6 5'-GTA-CTG-CAG-TGG-AAG-CCT-CTG-3'

ZmNAC6F1 5'-ACC-AGG-CTT-CCG-CTT-CCA-3'

ZmNAC6F2 5'-ACT-ATG-AGC-AGA-GAG-GC-3'

ZmNAC6F3 5'-TCG-ACC-TCA-AGT-TTA-GC-3'

ZmNAC6R1 5'-AAT-AGG-GTT-GGC-ACG-GG-3'

ZmNAC6R2 5'-ATG-TTG-TGG-CCT-CTC-TG-3'

ZmNAC6R3 5'-TTC-CTC-CCT-GTA-AAA-GG-3'

ZmNAC6R5 5'-AAA-CCT-CGG-AAA-TAT-CC-3'

ZmCUC3F1	5'-TAC-CGC-CTC-GAC-GGC-GAC-TTC-3'
ZmCUC3F3	5'-GGG-GTT-TCG-GTT-CCA-CCC-CAC-CG-3'
ZmCUC3F4	5'-ACC-ATC-ACC-ACC-AGG-ACC-3'
ZmCUC3R1	5'-CCT-TGC-CAG-CAT-GGT-TGC-TCG-3'
ZmCUC3R2	5'-GTG-GTC-TGT-AAT-GTG-CGG-TGC-3'
ZmCUC3R4	5'-TTG-AGC-ACC-TCG-CGG-TCC-TTC-3'
ZmNAM1F1	5'-ATG-GAG-CGG-TTC-GGC-CTG-GAC-3'
ZmNAM1R1	5'-GGT-GCC-GGT-AGT-GCT-GCT-AAG-3'
ZmNAM1R2	5'-TGA-TCA-GAT-CAG-ACC-AGA-TCA-3'
ZmNAM1R3	5'-TTC-AGT-CGG-TGG-GTG-GTC-GAT-G-3'
ZmNAM1R4	5'-TAA-TGG-TGG-CAG-TGG-AGA-AGC-3'
ZmNAM2F1	5'-CTA-GCT-GCG-TGC-TGT-CCT-3'
ZmNAM2F2	5'-AGA-GGT-TGG-GCG-TCG-GCG-TCG-3'
ZmNAM2F3	5'-TCT-CGT-CGT-CCT-CGA-CCA-ATG-GG-3'
ZmNAM2F4	5'-GGG-GGA-GCA-GCA-GCA-GCT-TCG-3'
ZmNAM2R2	5'-ACG-ACT-CTC-TGC-CAC-TTC-C-3'
ZmNAM2R3	5'-GAA-GGA-AAT-GGT-AGG-CGT-AGG-3'

- Primer für RT-PCR Expressionsanalysen:

BQ778932F1	5'-TGA-GAG-TGC-AGA-TTG-GCA-AGG-3'
BQ779832R1	5'-CTT-TCC-CCT-CTT-GGA-TTC-TCC-3'
ZmNAC6F2	5'-ACT-ATG-AGC-AGA-GAG-GC-3'
ZmNAC6R1	5'-AAT-AGG-GTT-GGC-ACG-GG-3'
ZmNAM1RTF1	5'-CAT-GTG-TTC-CTC-TCG-TCG-TCC-3'
ZmNAM1RTR1	5'-GAA-GGA-AAT-GGT-AGG-CGT-AGG-3'
ZmNAM2RTF1	5'-CTC-ACC-GTC-ACG-GAC-ACT-TCC-3'
ZmNAM2RTR1	5'-AGC-CAC-ATC-CTG-ATA-CTA-ATC-3'
UbiquitinFwd	5'-TAA GCT GCC GAT GTG CCT GCG-3'
UbiquitinRev	5'-CTG AAA GAC AGA ACA TAA TGA GCA CAG-3'

- Primer für Genkartierungen:

ZmNAC5mapF1	5'-CTG-TCG-GTG-CCA-CCA-GGC-TTC-3'
ZmNAC5mapR1	5'-AGT-GGA-AGC-CTC-TGC-AAG-GAC-3'
ZmNAC5mapR2	5'-ACC-AGG-GTC-TTC-CTC-AAG-CCG-3'
ZmNAC6F4	5'-AGC-TCA-AAC-CTA-TCT-GC-3'

ZmNAC6R4	5'-GGT-TCG-TTC-GTT-GGT-ACC-3'
ZmNAC6mapF1	5'-ATA-GAT-CTT-GAT-GTC-ATA-AGG-3'
ZmNAC6mapR1	5'-GCC-GAC-TGC-CTA-TTT-TGC-ATC-3'
BQ779832F1	5'-TGA-GAG-TGC-AGA-TTG-GCA-AGG-3'
ZmCUC3R3	5'-CAT-GAT-TTC-ATA-ACA-ACG-ACC-3'
ZmCUC3mapF1	5'-CTA-TAG-TAC-ATG-TAG-GAG-TAC-G-3'
ZmCUC3mapR1	5'-TAG-ATT-TCG-AGC-AGA-GAT-AGA-GC-3'
ZmNAM1F1	5'-ATG-GAG-CGG-TTC-GGC-CTG-GAC-3'
ZmNAM1R1	5'-GGT-GCC-GGT-AGT-GCT-GCT-AAG-3'
ZmNAM1mapF1	5'-TCC-CCA-GCT-CCA-CAA-GGG-TAC-3'
ZmNAM1mapR1	5'-AGA-AAG-TGC-TAG-CAT-ATG-GAG-3'
ZmNAM2mapF1	5'-ATC-GCG-GAG-ATC-GAC-CTG-AAC-3'
ZmNAM2mapR1	5'-GGA-GTC-CGA-GAA-GCA-GGA-CT-3'
ZmNAM2mapR2	5'-CAT-CTT-CGC-CTT-GTC-TGC-TCA-3'

- Primer zur Herstellung von Sonden für die *in situ* Hybridisierung:

ZmNAC4F2	5'-CTG-GGA-TCA-AGA-AGA-CC-3'
ZmNAC4R3	5'-TAC-TAA-CAC-CAA-ACG-AG-3'
ZmNAC5F3	5'-GAA-GAG-CTA-TCA-CCA-GAG-3'
ZmNAC5R4	5'-GCA-CCT-AAC-AAG-CAA-CCC-3'
ZmNAC6F2	5'-ACT-ATG-AGC-AGA-GAG-GC-3'
ZmNAC6R4	5'-GGT-TCG-TTC-GTT-GGT-ACC-3'
ZmCUC3F2	5'-CAG-GCG-ACC-AGT-ATA-GCA-AGC-3'
ZmCUC3R2	5'-CAT-GAT-TTC-ATA-ACA-ACG-ACC-3'
ZmNAM1F1	5'-GAG-TCC-TGC-TTC-TCG-GAC-TC-3'
ZmNAM1R1	5'-TAA-AGC-TGC-TAC-TGC-AGT-TAG-3'
ZmNAM2F5	5'-CTC-ACC-GTC-ACG-GAC-ACT-TCC-3'
ZmNAM2R1	5'-AGC-CAC-ATC-CTG-ATA-CTA-ATC-3'
ZmSCRF1	5'-TTC-GTG-GAG-GCC-ATC-CAC-TAC-3'
ZmSCRR1	5'-CCT-GAA-CAA-GAA-CGA-TCT-AGC-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle Standardmethoden wurden nach Ausubel et al. (1996) bzw. nach Anleitung des jeweiligen Herstellers der verwendeten Materialien (Enzyme, Chemikalien, Kits) durchgeführt.

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Elektrokompetente *E.coli* wurden nach Mühlhardt (2000) hergestellt. Die Transformation mit Plasmiden wurde unter Verwendung von 0,1cm Elektroporationsküvetten mit Hilfe eines *GenePulser*TM (Geräteeinstellung: Kapazität 25µF, Spannung 1,8kV, Widerstand 200Ω) der Firma BIORAD[®] (München) durchgeführt. Die Ligation von PCR-Produkten mit pCR[®]II-TOPO[®] oder pCR[®]2.1-TOPO[®]- Vektoren und die darauffolgende chemische Transformation mit TOP10 Zellen erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen).

2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Minipräparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrooke *et al.*, 1989) durchgeführt. Größere DNA-Mengen oder DNA-Proben für die Sequenzierung bzw. *in situ* Hybridisierung wurden mit Plasmid Mini- oder Midi Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller isoliert.

2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus *Zea mays*

Genomische DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Dellaporta (1994) aus Blättern isoliert:

1-2g frisch geerntetes Blattmaterial werden in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und nach Aufnahme in 15ml Extraktionspuffer für 10min. bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5,4ml 5M KAcO für 15min. auf Eis stellen, anschließend bei 4000rpm für 15min. zentrifugieren. Überstand durch einen MiraclothTM-Filter (Calbiochem, Schwalbach) in ein frisches *Falcon* überführen und mit einem Volumen Isopropanol mischen. Erneute Zentrifugation bei 4000rpm für 10min. Das Pellet nacheinander mit 10ml 70% EtOH bzw. 5ml 100% EtOH waschen und jeweils für 5min. bei 4°C und 4000rpm zentrifugieren. Den Überstand dekantieren und das *Falcon* invertiert auf saugfähiges Papier stellen, um das Pellet lufttrocknen zu lassen. Das Pellet in 1ml TE/RNase (20µl/ml) resuspendieren und für 15min. bei 37°C inkubieren. Die gelöste DNA wird mit 800µl Phenol extrahiert, die wässrige

Phase mit einem Volumen Chloroform/IAA (24:1) reextrahiert und mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3M NaAcO gefällt und für 10min. auf Eis inkubiert. DNA für 10min. bei 4°C und 14.000rpm zentrifugieren. Das Pellet mit 600µl 70% EtOH waschen, trocknen und in 200µl TE-Puffer resuspendieren.

Extraktionspuffer: 50mM Tris/HCl, pH8,0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1%SDS, 14mM β-Mercaptoethanol

2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Zea mays*

Gesamt RNA aus unterschiedlichen Geweben wurde nach einem modifizierten Protokoll von Palmiter (1974) isoliert. Bis zu 5g frischen oder zuvor bei -70°C gelagerten Pflanzenmaterials wird in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert, zügig in 15ml Lysispuffer überführt und bei 42°C im Wasserbad für 10min. geschüttelt. Der Ansatz wird mit einem Volumen Phenol extrahiert, die wässrige Phase mit einem Volumen Chloroform/IAA (24:1) reextrahiert (Zentrifugationschritte jeweils bei 4°C und 4000rpm für 10min.) und dann nach Zugabe von einem Volumen 4M LiCl über Nacht bei 4°C gefällt. Die RNA durch Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm für 30min. präzipitieren, das Pellet in 10ml 70%EtOH waschen und für die nachfolgende mRNA Extraktion in 1ml Puffer A (siehe Abschn. 2.2.6) resuspendieren. Die Qualität und Konzentration der präparierten Gesamt-RNA kann nach elektrophoretischer Auftrennung eines 1µl Aliquots in einem 1%igen Agarosegel bestimmt werden.

Lysispuffer: 100mM Tris/HCl, pH8,5, 100mM NaCl, 20mM EDTA, 2%SDS

2.2.6 Extraktion von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Extraktion von mRNA erfolgte durch Kopplung an OLIGO(dt)-Cellulose (Sigma, Taufkirchen) und anschließender Aufreinigung über eine NAP5-Säule (BIORAD®).

Pro 1mg Gesamt-RNA werden 100mg OLIGO(dt)-Cellulose abgewogen, zweimal mit je 5ml 0,1M NaOH aktiviert und anschließend mit DEPC-H₂O gewaschen, bis der pH-Wert der Lösung unter 8,5 liegt. Aktivierte Cellulose in 5ml Puffer A aufnehmen, zu der in Puffer A gelösten Gesamt-RNA geben und den Ansatz für 30-60min. auf einem Schüttler bei RT inkubieren. NAP5-Säule mit 5ml Puffer A äquilibrieren, den Ansatz über die Säule geben und zweimal mit 5ml Puffer B waschen. Die mRNA durch Zugabe von 3ml Puffer C von der Säule eluieren, dabei Fraktionen von 300µl auffangen. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung die RNA-haltigsten Proben vereinigen und einer DNase Behandlung (RNase-

frei, Roche) für 10min. bei 37°C unterziehen, um restliche in der Lösung befindliche genomische DNA zu spalten. Den Ansatz ethanolisch fällen, waschen und nach erneuter photometrischer Bestimmung auf eine Endkonzentration von 500ng/µl einstellen und bei -70°C lagern.

Puffer A: 10mM Tris/HCl, pH7,4, 400mM NaCl, 0,1%SDS

Puffer B: 10mM Tris/HCl, pH7,4, 100mM NaCl, 0,1%SDS

Puffer C: 10mM Tris/HCl, pH7,4

2.2.7 Synthese von cDNA aus mRNA mittels reverser Transkriptase

Für die cDNA Synthese wurden gemäß Herstellerangaben 500ng mRNA zu analysierenden Gewebes als Substrat für die SuperScriptII™ reverse Transkriptase (Invitrogen) eingesetzt. Die Synthese erfolgte unter Verwendung eines zur 3'-Konsensussequenz der mRNA komplementären *Primers* (*Primer 291*, Abschnitt 2.1.5). Nach RNaseH Spaltung (Roche) wurde der Ansatz jeweils auf eine Endkonzentration von 50ng/µl eingestellt und als Substrat für die PCR eingesetzt.

2.2.8 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

In eine Standardreaktion werden 100pg bis 10ng DNA als Matrize eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 10µl mit 0,2-0,4U *Taq*-Polymerase (Invitrogen) unter den vom Hersteller des Enzyms angegebenen Bedingungen. Für die Durchführung der PCR wurde ein Eppendorf *Mastercycler personal* verwendet. Um die optimale Hybridisierungstemperatur neu entworfener *Primer* zu ermitteln, wurde eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt. Hierfür wurde auf einem Eppendorf *Mastercycler gradient* folgendes Standard PCR Profil verwendet:

0	initiale Denaturierung:	3min. bei 94°C
1	Denaturierung:	30sek. bei 94°C
2	Annealing:	45sek. bei 55°C+/-10°C
3	Elongation:	1min./kb Länge PCR-Fragment bei 72°C
4	Wiederholung der Schritte 1-3:	35mal
5	finale Elongation:	10min. bei 72°C
6	Pause:	16°C

Der Einsatz degenerierter Oligonukleotide bedingte die Verwendung folgenden PCR Profils:

0	initiale Denaturierung:	2min. bei 95°C
1	Denaturierung:	45sek.. bei 95°C
2	Annealing:	45sek.. bei 48°C (Mülhardt, 2000)
3	Elongation:	1min./kb Länge PCR-Fragment bei 72°C
4	Wiederholung der Schritte 1-3:	35mal
5	finale Elongation:	10min. bei 72°C
6	Pause:	16°C

3'RACE Reaktionen sowie die zur Bestimmung der Kartierungsposition von *ZmNAM2* durchgeführten PCRs wurden mit Hilfe der *Pfx*-Polymerase (Invitrogen) gemäß vom Hersteller angegebener Bedingungen und unter Verwendung folgenden PCR Profils durchgeführt:

0	initiale Denaturierung:	3min. bei 94°C
1	Denaturierung:	20sek. bei 94°C
2	Annealing:	45sek. bei zuvor exp. ermittelter Temperatur
3	Elongation:	1min./kb Länge PCR-Fragment bei 68°C
4	Wiederholung der Schritte 1-3:	35mal
5	Pause:	16°C

PCR Analysen zur Bestimmung der Kartierungsposition von *ZmNAMI* sowie die für *ZmNAC5*, *ZmCUC3* und *ZmNAM2* durchgeführten RT-PCR Expressionsanalysen wurden unter Verwendung der *Takara* Polymerase (*TaKaRa Shuzo Co, Ltd., Japan*) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurde folgendes PCR Profil verwendet:

0	initiale Denaturierung:	1min. bei 94°C
1	Denaturierung:	10sek. bei 98°C
2	Annealing:	45sek. bei zuvor exp. ermittelter Temperatur
3	Elongation:	1min./kb Länge PCR-Fragment bei 68°C
4	Wiederholung der Schritte 1-3:	35mal
5	Pause:	16°C

2.2.9 DNA Sequenzierung

DNA Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung des *Big Dye*[®] *Terminator* Reaktionsmix Version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) angesetzt. Ein Standardreaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 200ng Plasmid-DNA
- 6µl 1µM Sequenzierprimer
- 2µl *Termin.ator Ready Mix*
- ad 10µl mit ddH₂O

Die Sequenzreaktion wurde gemäß folgenden Reaktionsprofils durchgeführt:

0	Denaturierung:	30sek. bei 96°C
1	Annealing:	15sek. bei 50°C
2	Elongation:	4min. bei 60°C
3	Wiederholung der Schritte 1-3:	25mal
5	Pause:	16°C

Danach wurden die Proben mit 10µl ddH₂O versetzt und dem Sequenzierlabor übergeben. Sequenzen wurden mit einem Kapillar-Sequenzierer *ABI 3100* von Applied Biosystems analysiert und mit der dazugehörigen *Software* ausgewertet.

2.2.10 Sichtung einer cDNA-Phagenbank

Für die Sichtung der Phagenbank wurden ca. 50.000 Plaques pro 15cm Petrischale in Topagar eingegossen, auf Porablot Membranen transferiert und mit der entsprechenden, durch Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP radioativ markierten Sonde (Abschnitt 2.2.12) hybridisiert. Positive Plaques wurden ausgestochen, in nachfolgenden Sichtungen vereinzelt und anschließend einer *in vivo* Excision gemäß Herstellerangaben (Stratagene) unterzogen.

2.2.11 Transfer von DNA auf Membranfilter

DNA-Transferschritte im Rahmen der cDNA Bank-Sichtung wurden unter Verwendung von Porablot Nitrocellulose-Membranen (Macherey-Nagel, Düren) und gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Stratagene). Die nach der *in vivo* Excision und Plasmid-Präparation gelelektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsansätze (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden gemäß der von Sambrooke *et al.*, 1989 beschriebenen *standard capillary transfer procedure* auf

*Nylon N⁺ Membran*TM (Amersham) transferiert. Anschließend wurde die DNA auf dem noch feuchten Filter mit einem *UV-Crosslinker* (Stratagene) auf der Membran fixiert.

Die zur vollständigen Etablierung der kodierenden Region von *ZmCUC3* fehlenden Sequenzen wurden mittels *3'RACE* und anschließender Kolonie-Filterhybridisierung identifiziert. Bakterienkolonien entsprechender Klonierungsansätze wurden auf Porablot Nitrocellulose-Rundfilter transferiert und für 5min. in 10%SDS lysiert. Nach Überführen für jeweils 5min. in Denaturierungs- bzw. Neutralisierungslösung, wurden die Filter kurz in 10xSSC gewaschen und nach kurzem Trocknen zum Fixieren der DNA für 2h bei 80°C gebacken.

Denaturierungslösung: 0,5M NaOH, 1,5M NaCl

Neutralisierungslösung: 0,5M Tris/HCl pH7,5, 1,5M NaCl

2.2.12 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden durch Einbau von radioaktivem [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP erfolgte mit Hilfe des *Ladderman*TM *Labeling Kits* (*TaKaRa Shuzo Co, Ltd., Japan*). Die markierten DNA-Fragmente werden über *Micro Spin Columns S-200 HR*TM (Amersham) von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden getrennt, für 5min. bei 95°C denaturiert und anschließend nach 10 minütiger Inkubation auf Eis zum Hybridisierungsansatz gegeben.

2.2.13 Hybridisierung von Membran-gebundener DNA

Die Prähybridisierung erfolgt in Prähybridisierungspuffer in einem geeigneten Gefäß liegend im Wasserbad für mindestens 4h. Kolonie-Filterhybridisierungen wurden unter stringenten Bedingungen (68°C) für s 3h durchgeführt, Hybridisierungen für die Phagenbank Sichtungen für wenigstens 12h bei 60°C. Der zuvor verwendete Prähybridisierungspuffer wurde hierfür gegen Hybridisierungspuffer gewechselt. Anschließend wurden Filter nach folgenden Schemata gewaschen:

Kolonie-Filterhybridisierung:

- einmalig für 20min. in 2xSSC/0,1%SDS bei 68°C
- einmalig für 15min. in 0,1xSSC/0,1%SDS bei 68°C

cDNA Bank Sichtung:

- einmalig für 20min. in 2xSSC/0,1%SDS bei 60°C
- zweimalig für 10min. in 0,5xSSC/0,1%SDS bei 60°C

Die Filter werden in Saran-Folie eingeschlagen und nach Auflegen eines X-Omat AR Röntgen-Films (Kodak) bei -70°C für die Autoradiographie exponiert.

Prähybridisierungspuffer: 6x SSPE, 4x Denhardt's, 0,4% SDS, 4% Dextransulfat,
100 $\mu\text{g/ml}$ CT-DNA

Hybridisierungspuffer: 6x SSPE, 1x Denhardt's, 4% SDS, 4% Dextransulfat,
100 $\mu\text{g/ml}$ CT-DNA

2.2.14 Nicht-radioaktive RNA *in situ* Hybridisierung

Die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung wurde leicht modifiziert nach Coen et al. (1990) und nach Jackson (1991) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet folgende Schritte: Fixierung des frischen Gewebes, Einbettung in Paraffin, Herstellung der Mikrotomschnitte, Herstellung der Sonde, Hybridisierungsreaktion, Waschen der Schnitte sowie Detektion der Transkripte mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde in Kombination mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist.

2.2.14.1 Gewebefixierung und Einbettung

Herstellung des Fixativs:

- 100ml PBS-Puffer werden mit NaOH auf pH11,0 eingestellt und in der Mikrowelle auf etwa 70°C erhitzt
- 4g Paraformaldehyd zugeben und kräftig schütteln bis das Paraformaldehyd vollständig gelöst ist, danach auf Eis stellen.
- pH 7,0 mit konzentrierter H_2SO_4 einstellen

Fixierung des Gewebes

Für die Präparation von Embryonen werden die Maiskörner seitlich getrimmt, um eine bessere Penetration des Gewebes mit Fixativ und Paraffin zu gewährleisten. Vegetative Meristeme werden durch Abschneiden der Sprosse ober- und unterhalb des Skutellarknotens präpariert. Primärwurzeln werden max. 1cm oberhalb der Wurzelspitze kapitiert; für die Präparation von Infloreszenzen werden diese von den umgebenden Hüllblättern freigelegt. Bis zu 12 Maiskörner oder Infloreszenzen bzw. 20 Sprosstücke oder Wurzelspitzen werden in ein 20ml Glasgefäß mit Fixativ eingelegt, mit etwa $5\mu\text{l}$ Tween20 versetzt und für 3x 10min. in einem Vakuum-Exsikkator infiltrierte und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Die

Proben werden nun dehydriert, gefärbt und in Paraffin (Paraplast Plus[®], Sigma, Taufkirchen) überführt:

- Austauschen des Fixativs durch eiskalten 50% EtOH, 90min. auf Eis stellen
- Überführen in eiskalten 70% EtOH, 90 min. auf Eis
- in 85% EtOH für 90min. bei 4°C
- in 95% EtOH mit 0,1% EosinY für 90min. bei 4°C
- in 100% EtOH mit 0,1% EosinY über Nacht bei 4°C
- in frischem 100% EtOH mit 0,1% EosinY für 90min. bei 4°C
- in 100% EtOH für 60min. bei RT
- in 50% EtOH/50% Rotihistol für 60min. bei RT
- in 100% Rotihistol für 60min. bei RT
- in 100% Rotihistol für 60min. bei RT
- in 100% Rotihistol für 60min. bei RT
- Entnehmen des Rotihistols und Auffüllen des Glasgefäßes mit 50% (v/v) frischem Rotihistol und 50% (v/v) Paraplast Plus[®], Inkubation bei 50°C über Nacht
- Austauschen des Rotihistol/Paraffingemisches durch frisch geschmolzenes Paraplast Plus[®], Inkubation bei 60°C für 8h
- Austauschen gegen frisches Paraplast Plus[®], Inkubation über Nacht bei 60°C
- in den nächsten 2 Tagen jeweils morgens und abends durch frisches Paraplast Plus[®] ersetzen

2.2.14.2 Herstellung der Gewebeblöcke

Die Proben werden in Wägschalen gegossen, die hierzu auf einen 60°C warmen Heizblock gestellt und mit etwas geschmolzenem Paraplast Plus[®] gefüllt werden. Darauf wird das Glasgefäß mit den Proben entleert und diese mit einer zuvor erhitzten Pinzette orientiert. Zur Aushärtung wird die Wägschale in ein kühles Wasserbad gelegt. Die eingebetteten Proben können bei 4°C gelagert werden.

2.2.14.3 Herstellung der Mikrotomschnitte

Die in den Wägschalen eingebetteten Gewebeproben werden zunächst zu kleinen Blöcken von ca. 1,5cm Seitenlänge zurechtgeschnitten, das Paraffin auf der Rückseite der Gewebelöcke mit einem in einer Bunsenbrennerflamme erhitzten Spatel geschmolzen und die Blöcke jeweils auf einem Holzblöckchen fixiert. Nach Abkühlen werden die Gewebelöcke auf ein rechteckiges Format zugeschnitten, wobei seitlich des Gewebes eine 1–2 mm breite Paraffinschicht erhalten bleibt. Die Gewebelöcke werden mit der längeren Seite parallel zum Messer im Mikrotom eingespannt. Es werden Schnittbänder mit einer Schnittbreite von 7µm hergestellt, die mit Hilfe eines feinen Pinsels auf beschichtete Objektträger (Superfrost-Plus™, Roth) überführt werden. Die Schnittbänder werden mit sterilem ddH₂O überschichtet und auf eine 42°C warme Heizplatte gelegt, bis sich die Schnittbänder vollends gestreckt haben. Verbleibendes ddH₂O kann mit einer Pasteur-Pipette abgezogen bzw. mit saugfähigem Papier vorsichtig aufgenommen werden. Die Schnitte bleiben über Nacht auf der 42°C warmen Heizplatte liegen und können dann bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert werden.

2.2.14.4 Präparation der *antisense* RNA Sonde

Entsprechende DNA-Fragmente wurden über PCR amplifiziert und in den pCR®II TOPO®-Vektor kloniert. Das vermehrte und aufgereinigte Plasmid wurde durch geeignete Restriktionsendonukleasen linearisiert, über gelelektrophoretische Trennung und anschließende Agarose Gelextraktion nach Angaben des Herstellers (Nucleospin® Extract, Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt und auf eine Konzentration von 0,5µg/µl eingestellt.

In-vitro Transkription:

Die Reaktion wird bei RT angesetzt und für 60 - 120min. bei 37°C inkubiert. Die Wahl der RNA-Polymerase (T3, T7 oder SP6) hängt dabei von der Orientierung des zu transkribierenden Fragments im Vektor ab.

Reaktionsansatz:

- 8,5 µl H₂O
- 2,5µl 10x Transkriptionspuffer
- 1µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Roche)
- 2,5µl 5mM ATP
- 2,5µl 5mM CTP
- 2,5µl 5mM GTP
- 2,5µl 1mM DIG-UTP
- 2µl linearisierte Matrize (= 1 µg)
- 1µl RNA-Polymerase (20 U/ml, Roche)

- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 75µl TMS Puffer, 2µl tRNA (100mg/ml) sowie 1µl DNase (RNase-frei) und Inkubation für 10min. bei 37°C
- zur Fällung der RNA werden 100µl 3,8M NH₄Ac und 600µl EtOH zugegeben und die Reaktion für 1h bei -20°C inkubiert.
- Zentrifugation für 10min. bei 14 000rpm
- Waschen des Pellets mit eiskaltem 70% EtOH/0,15M NaCl
- Zentrifugation für 5min. bei 14 000rpm
- Resuspension des Pellets in 50µl DEPC-H₂O

Hydrolyse:

Die optimale Länge einer RNA-Sonde für die *in-situ* Hybridisierung auf Pflanzengewebe beträgt 150bp. Die *in vitro* synthetisierten RNA-Sonden werden unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert, wodurch man ein Gemisch von Fragmenten der entsprechenden Länge erhält. Die Hydrolysedauer errechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$t = \frac{L_i - L_f}{K \times L_i \times L_f}$$

t = Zeit (min.), K = Ratenkonstante (0,11 kb/min.), L_i = initiale Länge (kb), L_f = endgültige Länge (kb)

- 50µl RNA-Probe mit 50µl 200mM Carbonat-Puffer pH10,2 versetzen
- Inkubation bei 60°C im Wasserbad für die kalkulierte Zeit
- auf Eis stellen
- +10µl 10% Hac
- +12µl 3M NaAc, vorsichtig mischen, Gasbläschen treten auf
- +312 µl 100% EtOH
- 60min. bei -20°C und Zentrifugation für 10min. bei 14 000rpm
- Waschen des Pellets mit eiskaltem 70% EtOH/0,15M NaCl
- Zentrifugation für 10min. bei 14 000rpm
- Resuspension des Pellets in 50µl DEPC-H₂O
- Lagerung bei -20°C

Kontrolle der Sonde mit dem Anti-DIG-Antikörper:

- Auftragen von 1µl Probe auf ein kleines Stück Nitrozellulosemembran
- Fixierung durch *UV cross linking* der RNA mit der Membran
- 1min. waschen in Puffer 1
- Inkubation für 30min. in Puffer 2
- 1min. waschen in Puffer 1
- Inkubation für 30min. in Puffer 1 versetzt mit 1µl Anti-DIG Antikörper (Roche)
- 2x für jeweils 15 min. waschen in Puffer 1
- 1min. waschen in Puffer 5
- Entwicklung der Membran in 5ml Puffer 5 mit 5µl NBT / 5µl X-P (Roche) für 10min.
- Abstoppen der Reaktion durch Waschen des Filters in Wasser
- An der Stelle des Probenauftrags wird ein hell- bis dunkelblauer Punkt sichtbar

2.2.14.5 Hybridisierungsreaktion

Reinigung der Deckgläser

Die Deckgläser (24 x 60 mm) werden für 15min. in Aceton gewaschen, anschließend getrocknet, in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei 180°C für mindestens 2h gebacken.

Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die Objektträger mit den Schnitten werden in einen Träger gestellt und nacheinander für die angegebene Zeit in folgenden Lösungen inkubiert:

- 100% Rotihistol	10min.
- 100% Rotihistol	10min.
- 100% EtOH	1min.
- 100% EtOH	1min.
- 95% EtOH	1min.
- 85% EtOH	1min.
- 50% EtOH	1min.
- 30% EtOH	1min.
- ddH ₂ O	1min.
- 0,2M HCl	10min.
- ddH ₂ O	5min.
- PBS	2min.
- Pronase (0,125 mg/ml Pronase-Puffer)	10min.
- Glycin (0,2% in PBS)	2min.
- PBS	2min.
- Formaldehyd (4% in PBS)	10min.
- PBS	2min.
- PBS	2min.
- Acetanhydrid (1ml in 100ml 0,1M Triethanolamin. pH8,0)	10min.
- PBS	2min.

Die Gewebeschnitte werden nun in einer aufsteigenden Ethanolreihe bis zum zweiten 100% EtOH-Schritt dehydriert, dann nochmals in 100% EtOH gewaschen. Während der Vorbereitung des Hybridisierungspuffers können sie in einer Box mit wenig 100% EtOH im Kühlschrank gelagert werden.

Hybridisierung

In der Regel werden 2µl der hydrolysierten DIG markierten RNA-Sonde pro Objektträger eingesetzt. Die Menge kann jedoch je nach der zu erwartenden Intensität des Signals variiert werden. Es werden 80µl Hybridisierungsgemisch pro Objektträger eingesetzt.

Probengemisch:

- 2µl hydrolysierte RNA-Sonde
- ad 8µl H₂O
- + 8µl deionisiertes Formamid
- mischen, Inkubation im Wasserbad bei 80°C für 2min.
- sofort auf Eis stellen

Hybridisierungspuffer (für 24 Objektträger):

- 200µl 10x Salzlösung
- + 800µl deionisiertes Formamid
- + 400µl 50% Dextransulfat
- + 20µl tRNA (100mg/ml)
- + 40µl 50x Denhardt's
- + 140µl H₂O

16µl Probengemisch mit 64µl Hybridisierungspuffer versetzen, auf den Gewebeschnitt auftragen und mit einem Deckglas versiegeln. Die Hybridisierungsreaktion findet in einer mit 2xSSC/50% Formamidlösung getränkten Papiertüchern ausgelegten Box über Nacht bei 50°C statt.

2.2.14.6 Waschen der Schnitte

- Waschen in Waschpuffer und Inkubation bei 50°C für 15min., nicht von selbst abgelöste Deckgläser müssen vorsichtig von den Objektträgern abgehoben werden
- Waschen in Waschpuffer und Inkubation bei 50°C zweimal für 60min.
- Waschen in NTE bei 37°C zweimal für je 5min.
- Inkubation in NTE + 20 µg/ml RNase A bei 37°C für 30min.
- Waschen in NTE bei RT zweimal für je 5min.
- Waschen in Waschpuffer bei 50°C für 60min.
- Waschen in PBS bei RT für 5min.

2.2.14.7 Detektion

Die hybridisierte RNA Sonde wird mit einem Anti-DIG-Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachgewiesen. Die folgenden Reaktionen finden in kleinen Schalen auf einem Schüttler statt. Die Schalen sollten nach jedem Schritt gewechselt und gespült werden. Alle Inkubationen finden bei RT durchgeführt. Der Puffer sollte die Objektträger während des Schüttelns gleichmäßig bedecken.

- Puffer 1 5min.
- Puffer 2 60min.
- Puffer 3 60min.
- Puffer 4 60min.
- Puffer 1 mit 0,3% Triton X100 4 mal 20min.
- Puffer 1 5min.
- Puffer 5 5min.
- Puffer 6 (im Dunkeln) bis zu 3Tage

Puffer 6 beinhaltet die Substrate für die alkalische-Phosphatase Reaktion. Die Inkubation findet in durchsichtigen Plastikschaalen statt, so dass die Farbreaktion leicht unter dem Binokular verfolgt werden kann.

2.2.14.8 Abstoppen der Reaktion und Schlussbehandlung der Gewebeschnitte

- kurz in H₂O waschen
- Waschen in ddH₂O für 5min.
- Waschen in 70% EtOH für 5min.
- Waschen in 95% EtOH für 5min.

Nachdem restliches Ethanol abgedampft ist, können die Gewebeschnitte mit 4-5 Tropfen Entellan (Merck, Eurolab) beschichtet und mit einem Deckglas versiegelt werden.

2.2.14.9 Puffer und Stammlösungen

<u>10x PBS:</u>	1,3M NaCl, 0,07M Na ₂ HPO ₄ , 0,03M NaH ₂ PO ₄
<u>2x Carbonat-Puffer:</u>	80mM NaHCO ₃ , 120mM Na ₂ CO ₃ , pH10,2
<u>TMS Puffer:</u>	10mM Tris-HCl, pH7,5, 10mM MgCl ₂ , 50mM NaCl
<u>10x Pronase-Puffer:</u>	0,5M Tris-Cl, pH7,5, 0,05M EDTA
<u>Pronase:</u>	Herstellung einer Stammlösung mit 40 mg/ml in ddH ₂ O. Vorverdau des Enzyms zur Aktivierung durch Inkubation für 4h bei 37°C
<u>Triethanolamin.:</u>	Herstellung einer 2M Lösung in ddH ₂ O, mit HCl auf pH8,0 einstellen
<u>10x Salz:</u>	3M NaCl, 0,1M Tris-HCl, pH6,8, 0,1M NaPO ₄ -Puffer, 50mM EDTA
<u>Formamid:</u>	Deionisierung durch Verwendung eines Kationen-Anionenaustauschers
<u>Waschpuffer:</u>	2x SSC, 50% Formamid
<u>10x NTE:</u>	5M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH7,5, 10mM EDTA
<u>RNase A:</u>	Stammlösung mit 10mg/ml in ddH ₂ O
<u>10x Puffer 1:</u>	1M Tris-HCl, pH7,5, 1,5M NaCl
<u>Puffer 2:</u>	1x Puffer 1, 0,5% Blocking reagent (Roche)
<u>Puffer 3:</u>	1x Puffer 1, 1% BSA, 0,3% Triton X-100
<u>Puffer 4:</u>	Puffer 3 mit Anti-DIG Antikörper-AP (Roche, 1:3000)
<u>Puffer 5:</u>	100mM Tris-HCl, pH9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl ₂
<u>Puffer 6:</u>	Puffer 5 mit 7,5% Polyvinylalkohol; Lösen des Polyvinylalkohols durch Aufkochen auf einem Heizrührer. Nach Abkühlen 1,5 µl NBT und 1,5 µl BCIP pro ml zugeben.
<u>NBT:</u>	100 mg/ml Nitrobluetetrazolium Salz in 70% Dimethylformamid (Roche)
<u>BCIP:</u>	50mg/ml 5-Bromo-4chloro-3-indolyphosphat in Dimethylformamid (Roche)

2.2.15 Detektion von Apoptose mit Hilfe des *in situ Cell Death Detection Kits, AP*

Mit Hilfe des *in situ Cell Death Detection Kits, AP* (Roche) gelingt der immunohistochemische Nachweis apoptotischer Zellen. Im Zuge des programmierten Zelltods (Apoptose) wird nukleäre DNA unter Entstehung freier 3'OH-Gruppen abgebaut. In der *TUNEL* Reaktion wird, katalysiert durch eine terminale Deoxynucleotidyltransferase, gespaltene nukleäre DNA am 3'Ende mit Digoxigenin-markiertem dUTP markiert und kann so in einer durch einen an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-DIG Antikörper katalysierten Farbreaktion detektiert werden. Das Protokoll zum Nachweis von Apoptose umfasst 6 Arbeitsschritte: Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials, Herstellung der Mikrotomschnitte, Vorbehandlung der Gewebeschnitte, *TUNEL*-Reaktion, Detektion sowie Durchführung und Abstoppen der Farbreaktion. Für die Versuchsdurchführung wurden Embryonen des Laubblatt-Stadiums 1-5 (siehe Abschnitt 3.4.3.4) nach Punkt 2.2.14.1-2.2.14.3 des Protokolls für die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung fixiert und eingebettet und für die Herstellung von Mikrotomschnitten eingesetzt. Die Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die *TUNEL*-Reaktion wurde einschließlich des Pronase-Verdaus gemäß Abschnitt 2.2.14.5 durchgeführt, der Pronase-Schritt wurde dabei auf 20 min. verlängert. Proben wurden danach zweimal für 5min. in PBS gewaschen. Die *TUNEL*-Reaktion, die Detektion und die Farbreaktion wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Abstoppen der Farbreaktion und die Schlussbehandlung der Gewebeschnitte wurde nach Abschnitt 2.2.14.8 vollzogen.

2.2.16 RFLP Kartierung mittels rekombinanter Inzuchtlinien

Die Kartierung basiert auf existierenden RFLPs zwischen parental Allelen innerhalb einer rekombinanten Inzuchtlinie (Burr & Burr, 1991). Diese werden genutzt, um die Rekombinationsfrequenz eines Locus und darauf aufbauend seine Lokalisation im Genom relativ zu bereits kartierten Loci zu ermitteln.

2.2.17 Nomarsky Mikroskopie

Alle mikroskopischen Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem *Axioskop* Mikroskop mit Nomarsky-Optik und angeschlossener *Axiocam* der Firma *Zeiss* angefertigt. Die Digitalisierung der Aufnahmen geschah mit Hilfe der zugehörigen Software *Axio Vision* Version 3.06. Die weitere Bearbeitung sowie der Entwurf schematischer Abbildungen erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe®Photoshop®* Version 7.0.

2.2.18 Computerunterstützte Analysen

Die Analysen von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden unter Benutzung des GCG-Programmpakets Version 7.0 (University of Wisconsin Genetics Computer Group) durchgeführt. Für die Analyse von DNA- bzw. Proteinsequenzen wurde das Programm Bioedit Version 5.0.9 (Hall, 1999) sowie die im www zur Verfügung stehenden Programme *BOXSHADE* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) und *CLUSTALX* (<ftp.embl-heidelberg.de>) verwendet. Sequenzvergleiche sind innerhalb der Datenbanken von DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), PlantGDB (<http://www.plantgdb.org>) und Syngenta (www.tmri.org) durchgeführt worden. Phylogenetische Rekonstruktionen wurden mit dem Programm MEGA2.1 (Kumar et al., 2001) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare Klonierung *PhNAM/AtCUC* Verwandter aus *Zea mays*

Für die Isolierung *PhNAM*- bzw. *AtCUC* verwandter Gene aus *Zea mays* wurden zwei unterschiedliche, auf Sequenzhomologie basierende Ansätze verfolgt.

3.1.1 Sichtung einer embryonalen cDNA-Bank

Alternativ zu Sequenzvergleichen in Datenbanken (Abschnitt 3.1.2) wurde eine unidirektional klonierte „full-length“ cDNA Phagenbank gesichtet, die aus mRNA von Embryonen des Laubblatt-Stadiums 1 hergestellt wurde. Zu diesem Zeitpunkt hat das Sprossmeristem Aktivität im Maisembryo erlangt. Diese cDNA Bank wurde freundlicherweise von Dr. Peter Rogowsky (Lyon) zur Verfügung gestellt. Um eine geeignete Sonde für die Hybridisierung der Bank zu erhalten, wurden basierend auf der Sequenz der konservierten *NAC* Domäne von *AtCUC2* und *PhNAM* geeignete degenerierte *Primer* (CUCF/CUCR, Abschnitt 2.1.5) entworfen und in PCR Reaktionen mit genomischer DNA bzw. cDNA des Laubblatt-Stadiums 1 als Substrat eingesetzt. Die Sequenzen von *AmCUP*, *AtCUC1* und *AtCUC3* waren zu dieser Zeit noch nicht in Datenbanken veröffentlicht und konnten daher nicht für den Entwurf der *Primer* herangezogen werden. Amplifizierte Fragmente der erwarteten Länge von etwa 230 Basenpaaren wurden nach elektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel extrahiert, in den pCR[®]II-TOPO[®] Vektor kloniert und nach Vermehrung und Aufreinigung aus *E. coli* sequenziert. Die abgeleitete Aminosäureabfolge von 60 Sequenzen wurde mit Hilfe des Befehls „pileup“ des GCG Programmpakets vergleichend zu *AtCUC2* und *PhNAM* analysiert. Hierdurch konnten insgesamt 8 unterschiedliche Fragmente identifiziert werden, deren Proteinsequenzen zu dem von den degenerierten *Primern* in *AtCUC2* und *PhNAM* begrenzten Bereich korrespondieren (siehe Abb. 3). Mit Hilfe des Programms *CLUSTALX* wurden unter Verwendung von Standardparametern in einer ersten phylogenetischen Analyse die Verwandtschaftsbeziehungen der 8 Sequenzen zum korrespondierenden Bereich in *AtCUC2* bzw. *PhNAM* ermittelt. Die 3 Sequenzen, die die höchste Homologie aufzeigten, wurden mit *ZmNAC1-3* bezeichnet. Korrespondierende PCR-Fragmente wurden mit *EcoRI* aus dem TOPO[®]Vektor gespalten und nach Agarose-Extraktion in äquimolaren Konzentrationen für die Synthese der radioaktiv markierten Sonde eingesetzt.

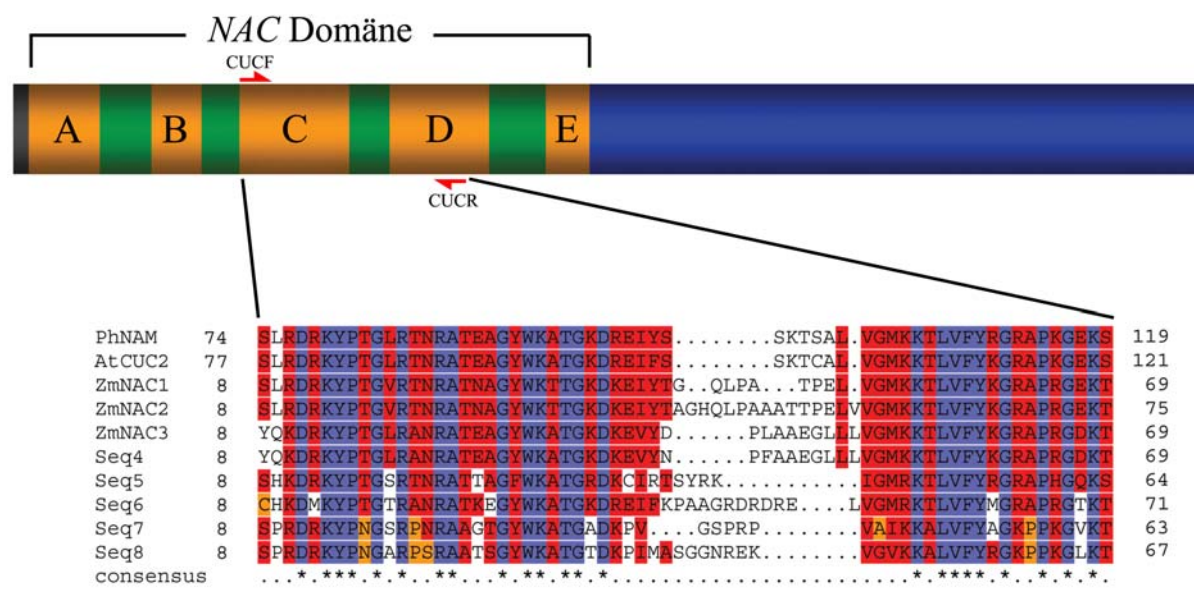


Abb.3: Amplifikation von NAC-Genfragmenten aus Mais mittels degenerierter Primer.

Schematisch dargestellt ist der von den Primern CUCF/CUCR umspannte Bereich innerhalb der Subdomänen C und D der NAC Domänen von *AtCUC2* und *PhNAM*. Außerdem ist der über *CLUSTALX* hergestellte Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller 8 amplifizierten Fragmente zum korrespondierenden Bereich in *AtCUC2* und *PhNAM* wiedergegeben. Identische Aminosäurereste sind blau hinterlegt, stark bzw. schwächer konservierte Reste rot oder orangefarben.

Nach Bestimmung des Phagentiters wurde die Bank mit einer Dichte von 50.000 pfu (*plaque forming unit*) ausplattiert. Insgesamt wurden 600.000 Phagenplaques unter moderat-stringenten Bedingungen gesichtet (Abschnitt 2.2.10). In der ersten Sichtung konnten 7 positive Plaques identifiziert und auf Replika-Filtern verifiziert werden. Diese wurden ausgestochen und in weiteren Sichtungen vereinzelt. 3 positive Plaques der jeweils letzten Vereinzlung wurden für eine *in vivo* Excision eingesetzt. Nach Plasmid-Minipräparation wurden isolierte cDNAs von flankierenden Seiten des Vektors aus ansequenziert und die Sequenzen mit Hilfe des Befehls „*pileup*“ analysiert. Dabei zeigte sich, dass die 7 ausgestochenen Phagenplaques 3 unterschiedliche NAC Klone repräsentierten, von denen die ersten beiden jeweils dreimal isoliert worden waren. Die vollständige Sequenz aller drei Klone wurde über „*primer walking*“ etabliert. Keine der isolierten cDNA Sequenzen korrespondiert zu *ZmNAC1-3*. Dieses Ergebnis ist unerwartet und lässt folgende Vermutungen zu:

1. Im Gegensatz zu *ZmNAC2/3* wurde *ZmNAC1* aus genomischer DNA isoliert. Möglicherweise wird dieses Gen nicht in Embryonen des Laubblatt-Stadiums 1 transkribiert und ist daher nicht durch die gesichtete cDNA Bank repräsentiert.

2. Teilweise zeigten für die Sichtung der Phagenbank hergestellte Replika-Filter eine geringere Sensitivität während der Hybridisierung als korrespondierende Original-Filter. Evtl. wurden schwache Signale für *ZmNAC2/3* zwar auf Autoradiogrammen der Original-Filter identifiziert, konnten jedoch nicht auf denen der Replika-Filter verifiziert werden, so dass entsprechende Phagenplaques nicht ausgestochen wurden.

Isolierte Phagenbank-Klone wurden mit *ZmNAC4* (Zugangsnr. AJ833963), *ZmNAC5* (Zugangsnr. AJ833964) bzw. *ZmNAC6* (Zugangsnr. AJ833965) bezeichnet. Die cDNAs von *ZmNAC4-6* haben eine Länge von 1628, 1698 und 1651 Basenpaaren und kodieren für Proteine einer Länge von 356, 369 und 381 Aminosäuren. Das offene Leseraster von *ZmNAC4* beginnt an Position 276, die von *ZmNAC5* und *ZmNAC6* an den Positionen 246 bzw. 368. Eine ausführliche phylogenetische Charakterisierung aller etablierten Mais *NAC* Proteinsequenzen folgt in Abschnitt 3.2.

3.1.2 Sequenzanalyse in Datenbanken

Basierend auf den Aminosäuresequenzen der *NAC* Domänen von *PhNAM* und *AtCUC1-3* wurden unter Verwendung des Programmes „tblastn“ die Gendatenbanken von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) und PlantGDB (<http://www.plantgdb.org>) nach homologen Maissequenzen durchmustert. Die cDNA-Sequenz von *AtCUC3* wurde hierfür freundlicherweise vor Veröffentlichung von Dr. Casper Vroemen (Wageningen) zur Verfügung gestellt.

In der Datenbank von PlantGDB konnten 2 Maissequenzen identifiziert werden, die sich durch signifikant hohe Homologiewerte auszeichneten:

die abgeleitete Aminosäuresequenz von EST *BQ778932* besitzt eine Sequenzidentität von mehr als 81% zu dem sich vom Aminoterminus bis kurz vor Subdomäne D erstreckenden Bereich der *NAC* Domäne von *CUC3* aus *Arabidopsis*.

Die aus den beiden genomischen Sequenzen *BZ536377* und *BZ782732* assemblierte Sequenz *BZ77/32* kodiert für die *NAC* Domäne einschliesslich der ersten 69 Aminosäuren der C-terminalen Domäne eines Maisproteins, das eine Identität von 80,1% zur *NAC* Domäne von *PhNAM* aufweist. Mit *Primern* spezifisch für die Sequenzen *BQ778932* bzw. *BZ536377* (Abschnitt 2.1.5) konnten über RT-PCR korrespondierende Transkripte in cDNA von Embryonen des Koleoptilar-Stadiums nachgewiesen werden. Im darauffolgenden Schritt wurde jeweils ein 3'RACE an cDNA von Embryonen des Koleoptilar-Stadiums durchgeführt,

um die vollständigen kodierenden Regionen der durch *BQ778932* bzw. *BZ77/32* repräsentierten cDNAs zu etablieren (siehe Abbildung 4):

unter Verwendung der *Primer BQ778932F1/F2* wurde ein Fragment mit einer Länge von 1315 Basenpaaren amplifiziert. Dieses Amplikon repräsentiert das offene Leseraster von 978 Basenpaaren (325 Aminosäuren), die letzten 83 Basenpaare der 5'-untranslatierten- sowie die 254 Basenpaare lange 3'-untranslatierte Region einer cDNA, die mit *ZmCUC3* bezeichnet wurde (Zugangsnr. *AJ833968*).

Unter Verwendung der auf Sequenz *BZ782732* basierenden *Primer* wurden in einem 3'RACE Ansatz 2 Fragmente (*3'RACEseq1/2*) einer Länge von 774 und 652 Basenpaaren amplifiziert. Die Sequenz *3'RACEseq1* zeigt einen Überlapp von 149 Basenpaaren zur Sequenz von *BZ77/32*. Die hieraus zusammengesetzte Sequenz kodiert für ein Protein von 368 Aminosäuren (1107 Basenpaaren) und einer 3'-untranslatierten Region von 228 Basenpaaren. Diese Sequenz wurde mit *ZmNAM2* (Zugangsnr. *AJ833967*) bezeichnet.

Die Sequenz des zweiten Amplikons (*3'RACEseq2*) konnte in späteren Datenbankanalysen als zu 100% identisch zu einem Teil der genomischen Sequenz von *ZmGSStuc 04-27-04.6311* ermittelt werden, die für ein NAC Protein einer Länge von 357 Aminosäuren kodiert. Die Länge der kodierenden und 3'-untranslatierten Regionen der entsprechenden cDNA umfassen 1074 und 174 Basenpaare. Diese Sequenz wurde mit *ZmNAMI* (Zugangsnr. *AJ833966*) bezeichnet. Die genomischen Sequenzen von *ZmNAMI/2* weisen ähnliche Exon-Intron Strukturen auf: das erste Intron in *ZmNAMI* hat eine Länge von 88 Basenpaaren (99Bp), das zweite von 640 Basenpaaren (606Bp). Abgeleitete Proteinsequenzen zeichnen sich ferner durch starke Homologie zueinander aus (siehe Abschnitt.3.2.2 und 3.2.3).

Zusammenfassend wurden durch die Sichtung der embryonalen cDNA Bank sowie basierend auf Sequenzvergleichen in Datenbanken die Sequenzen der kodierenden Region sowie untranslatierter Bereiche von 6 unterschiedlichen NAC Genen aus *Zea mays* isoliert.

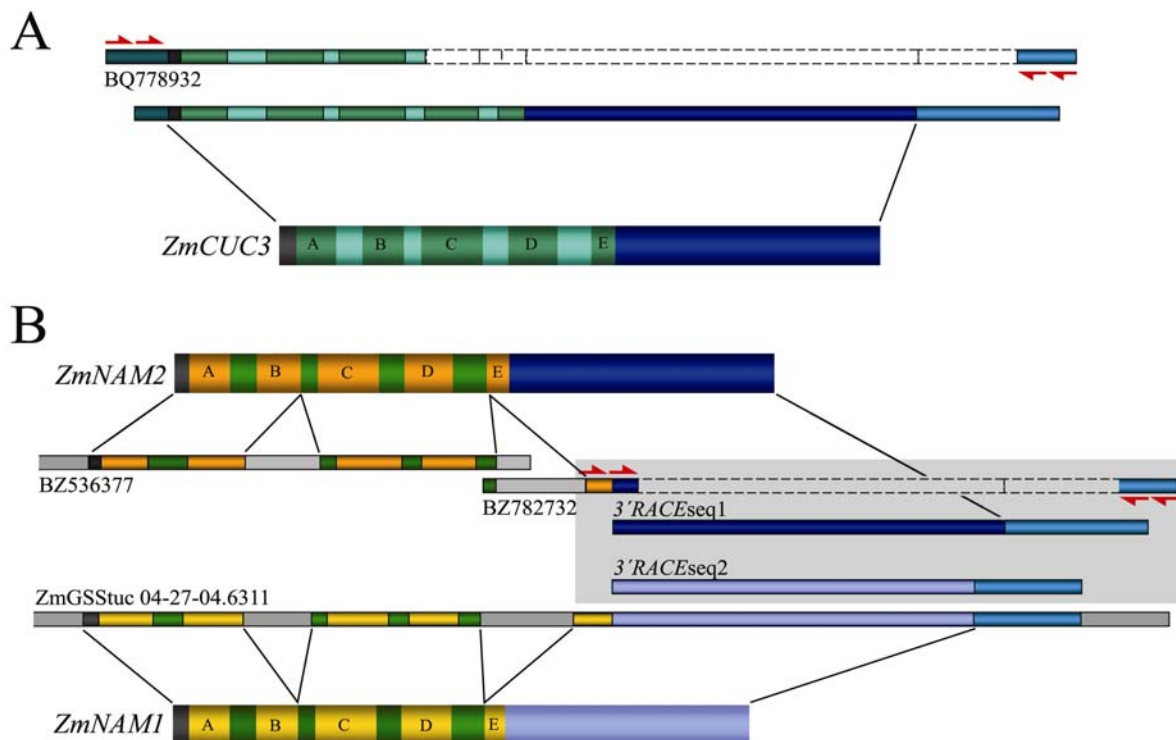


Abb.4: Etablierung der kodierenden Regionen von *ZmCUC3* und *ZmNAM1/2*.

A: durch 3'RACE mit Primern spezifisch für EST BQ778932 wurde ein cDNA Fragment amplifiziert, das für ein Protein mit hoher Homologie zu *AtCUC3* kodiert. **B:** mit Primern spezifisch für die genomische Sequenz BZ782832 wurden in einer weiteren 3'RACE Reaktion 2 Fragmente (3'RACEseq1/2) amplifiziert, die jeweils für den C-terminalen Teil von *ZmNAM1* bzw. *ZmNAM2* kodieren. *ZmNAM1/2* sind hoch verwandt zu *PhNAM*.

3.2 Phylogenetische Klassifizierung aus *Zea mays* isolierter NAC Sequenzen

Um die Verwandtschaftsbeziehungen etablierter Mais-Sequenzen relativ zu NAC Genen anderer Spezies zu ermitteln, wurden detaillierte phylogenetische Analysen durchgeführt: die Sequenzen der NAC Domänen von *AtCUC1-3*, *AmCUP*, *PhNAM* und die der Mais Kandidaten wurden jeweils mit Hilfe des Programmes „tblastn“ unter Verwendung von Standardparametern mit in der PlantGDB Datenbank (www.plantGDB.org) veröffentlichten Sequenzen abgeglichen. Diese Datenbank stellt die derzeit umfassendste Kollektion pflanzenspezifischer Sequenzen inklusive des *Arabidopsis*- und Reisgenoms (A.G.I, 2000; Goff et al., 2002). In jeder Sichtung bildete sich in individuell unterschiedlicher Reihenfolge die gleiche repräsentative Gruppe von 20 individuellen Treffern heraus. Um eine ausreichende Anzahl unterschiedlicher Sequenzen für nachfolgende Analysen zu berücksichtigen, wurden von jeder Sichtung jeweils die ersten 30, für eine individuelle NAC Domäne kodierenden Treffer ausgewählt und zu einem normalisierten Set von Sequenzen zusammengestellt. Basierend auf diesem Datenset wurde mit Hilfe des Programmes *CLUSTALX* ein Sequenzvergleich durchgeführt, der als Grundlage für die Errechnung

phylogenetischer Rekonstruktionen durch das Programm *MEGA2.1* (Kumar et al., 2001) verwendet wurde. Der in Abbildung 5 dargestellte Teil eines unter Verwendung des „*neighbour-joining*“ Algorithmus errechneten Dendrogramms, gibt die relative Zuordnung der in rot hervorgehobenen Maiskandidaten relativ zu bekannten *NAC* Proteinen als auch bisher nicht charakterisierten Vertretern anderer Spezies (gekennzeichnet durch die jeweilige Datenbank-Zugangsnummer) wieder. Gezeigte Verwandtschaftsbeziehungen können im Wesentlichen durch Anwenden der „*maximum parsimony*“ Methode bestätigt werden. Die *bootstrap* Werte, welche ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der phylogenetischen Zuordnung geben, wurden dabei in beiden Fällen mit 1000 Wiederholungen bestimmt. Die sechs Mais Kandidaten können diskreten Gruppen innerhalb des Stammbaumes zugeordnet werden. Mit Ausnahme von *ZmNAC4* enthält dabei jede dieser Gruppen einen nahen Verwandten aus *Oryza sativa* bzw. *Arabidopsis thaliana*. Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Unterfamilien werden somit durch Daten der vollständigen Genome einer monokotylen und einer dikotylen Spezies substantiiert.

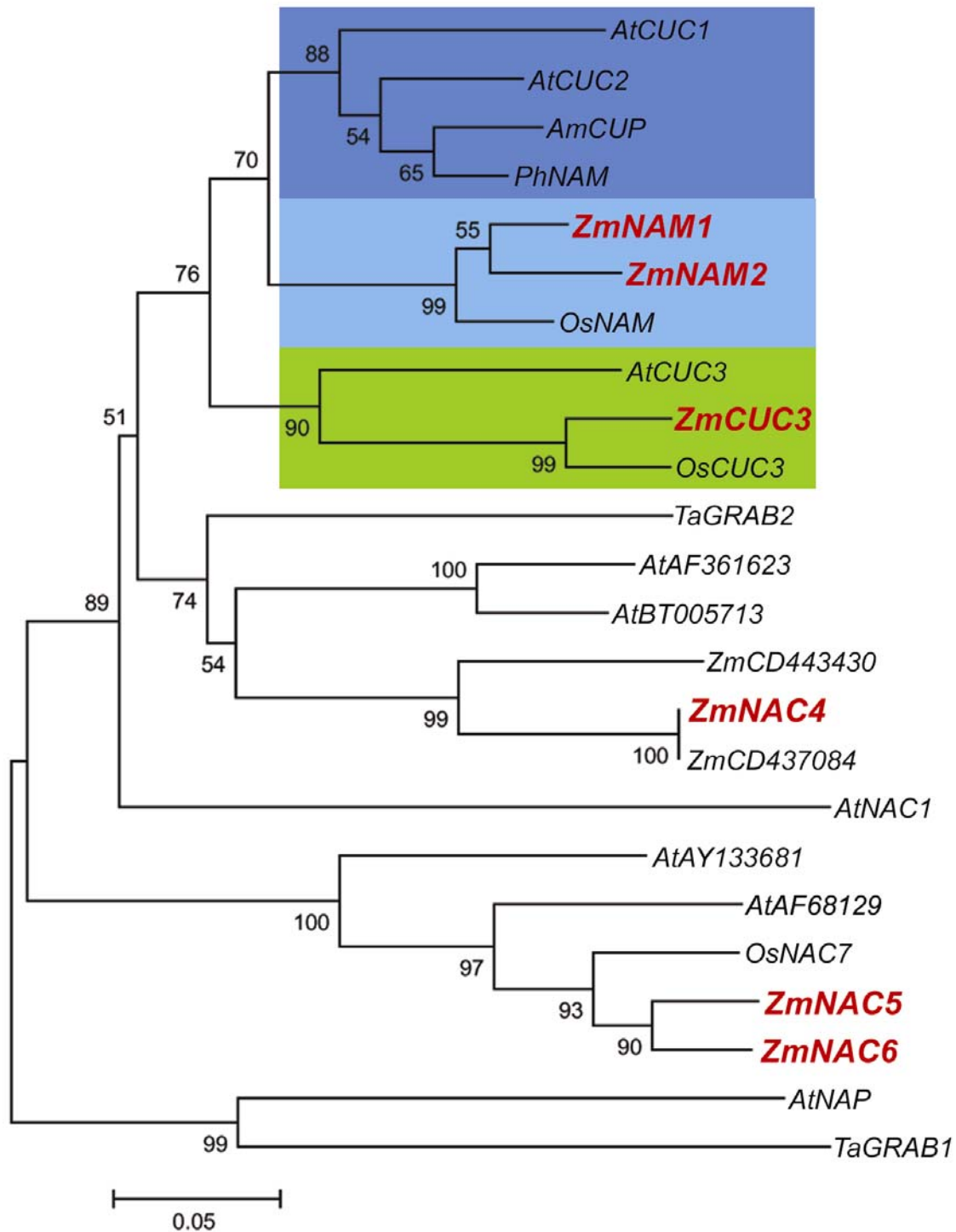


Abb.5: Verwandtschaftsbeziehungen aus *Zea mays* isolierter NAC Sequenzen relativ zu Vertretern anderer Spezies. Phylogenetische Rekonstruktionen wurden basierend auf der konservierten Sequenz der NAC Domäne und unter Verwendung der „neighbour-joining“ Methode ermittelt. Vor jeder Verzweigung sind entsprechende *bootstrap* Werte angegeben. Vertreter aus *Zea mays* sind in rot hervorgehoben, bisher nicht charakterisierte Mitglieder werden mit entsprechender Datenbank-Zugangsnummer bezeichnet. *ZmCUC3*, *OsCUC3* und *AtCUC3* bilden die *AtCUC3*-Gruppe (grün hinterlegt); *ZmNAM1/2* und *OsNAM* stellen den monokotylen Zweig (hellblau hinterlegt) und *PhNAM*, *AmCUP* und *AtCUC1/2* den dikotylen Zweig (dunkelblau hinterlegt) der *PhNAM*-Gruppe. *ZmNAC4* sowie *ZmNAC5/6* gruppieren mit bisher nicht näher charakterisierten Mitgliedern.

3.2.1 *AtCUC3* bildet mit *ZmCUC3* eine diskrete Gruppe

Im Vergleich zu *PhNAM* (siehe Abschnitt 3.2.2) konnte mit *ZmCUC3* nur ein einzelnes Maishomologes zu *AtCUC3* identifiziert werden. *AtCUC3* und *ZmCUC3* bilden zusammen mit *OsCUC3* aus Reis eine eigene Gruppe (die *AtCUC3* Gruppe, in Abb. 5 grün hinterlegt), die sich klar von den anderen beiden *AtCUC* Genen in der *PhNAM* Gruppe (hell- bzw. dunkelblau hinterlegt) absetzt. Diese Zuordnung spiegelt die Sequenzunterschiede zwischen *AtCUC3* und *AtCUC1/2* wieder: die *NAC* Domäne von *AtCUC3* ist zu 68,7% bzw. 72,9% identisch zu der von *AtCUC1* bzw. *AtCUC2* aber zu 77% identisch zu der von *ZmCUC3*. Die *NAC* Domänen von *ZmCUC3* und *OsCUC3* sind zu 94,6% identisch, über die gesamte Proteinlänge ergibt sich eine Identität von 73,5%.

3.2.2 *PhNAM* kommt eine zentrale Stellung innerhalb des Stammbaums zu

Die *PhNAM* Gruppe spaltet sich in die Untergruppe der monokotylen *ZmNAM1/2* und *OsNAM* aus Reis (hellblau hinterlegt) sowie die dikotyle Untergruppe um *PhNAM*, *CUP* aus *Antirrhinum* und *AtCUC1/2* (dunkelblau hinterlegt) auf. *PhNAM* kommt dabei eine zentrale Stellung für beide Untergruppen zu: *PhNAM* ist das nächst-verwandte Protein zu jedem Mitglied der dikotylen Untergruppe und gleichermaßen das Protein aus dikotylen Spezies, zu dem *ZmNAM1/2* und *OsNAM* am verwandtesten sind. In Zahlen ausgedrückt stellen sich die Verwandtschaftsbeziehungen folgendermaßen dar: die *NAC* Domänen von *AtCUC1*, *AtCUC2* und *AmCUP* sind zu 86,7%, 89,9% und 93,4% identisch zu *PhNAM*. Die Sequenzidentität zwischen den *NAC* Domänen von *AtCUC1* und *AtCUC2* ist mit 83,7% geringer. Der Grad der Konservierung zwischen den *NAC* Domänen von *PhNAM* und *ZmNAM1* bzw. *ZmNAM2* beträgt 82,1% bzw. 80,1%. Innerhalb der monokotylen Gruppe ist die *NAC* Domäne von *ZmNAM1* zu 92,8% identisch zu der von *ZmNAM2* und zu 92,9% identisch zu der von *OsNAM*. *ZmNAM1* ist über die gesamte Proteinsequenz sowohl zu *ZmNAM2* als auch zu *OsNAM* zu mehr als 78% identisch. Abbildung 6A auf Seite 43 zeigt einen über *CLUSTALX* erstellten Sequenzvergleich, der den Grad der Konservierung zwischen den *NAC* Domänen aller Mitglieder der *AtCUC3* und *PhNAM* Untergruppen widerspiegelt. Die Vertreter der *AtCUC3*-Gruppe können hauptsächlich durch ihre charakteristische Aminosäure-Konstitution in den heterogenen Bereichen zwischen Subdomänen A und B bzw. D und E von den Repräsentanten der *PhNAM* Gruppe unterschieden werden.

3.2.3 Die *PhNAM* Gruppe zeichnet sich durch Homologien im C-Terminus aus

Vertreter der *PhNAM* Gruppe zeichnen sich neben der hohen Sequenzverwandtschaft innerhalb der aminoterminalen *NAC* Domäne durch Homologien innerhalb der C-terminalen Domäne aus (Abbildung 6B). Homologe Bereiche können dabei in vier unterschiedliche Motive (I-IV) gegliedert werden. Motive I und II sind nicht nur in *PhNAM*-verwandten Proteinen, sondern auch in zu *AtNAC1* homologen Proteinen aus Reis und *Arabidopsis* zu finden (Ooka et al., 2003). *AtNAC1* kommt eine tragende Rolle bei der Auxin-vermittelten Bildung lateraler Wurzeln zu (Xie et al., 2000). Resultate jüngst veröffentlichter Studien zeigen, dass die Regulation der *AtCUC1*- und *AtCUC2* Funktion im Wildtyp maßgeblich durch miRNA-vermittelte, post-transkriptionelle Kontrolle gewährleistet wird (Mallory et al., 2004; Laufs et al., 2004). Die Ziel-Sequenz der korrespondierenden *AtmiR164a/b* innerhalb der mRNAs von *AtCUC1* und *AtCUC2* wird auf Aminosäure-Ebene von Motiv II repräsentiert. Dieser Befund wird in Abgleich zu den anderen Mitgliedern der *PhNAM* Gruppe unter Abschnitt 4.1.2 diskutiert werden.

Mitglieder der *PhNAM* Gruppe unterscheiden sich von *AtNAC1*-verwandten *NAC* Proteinen aus *Arabidopsis* und Reis durch den Besitz von Motiven III und/oder IV. *AtCUC1* weist innerhalb der dikotylen *PhNAM* Untergruppe die geringste Homologie zur *NAC* Domäne von *PhNAM* auf. In Analogie hierzu sind Motiv I und III nur partiell in *AtCUC1* konserviert während Motiv IV fehlt. Motiv IV ist ebenfalls nicht in dem nah zu *PhNAM* verwandten *CUP* aus *Antirrhinum* zu finden. Dieser Befund wird ebenfalls in Abschnitt 4.1.2 aufgegriffen werden.

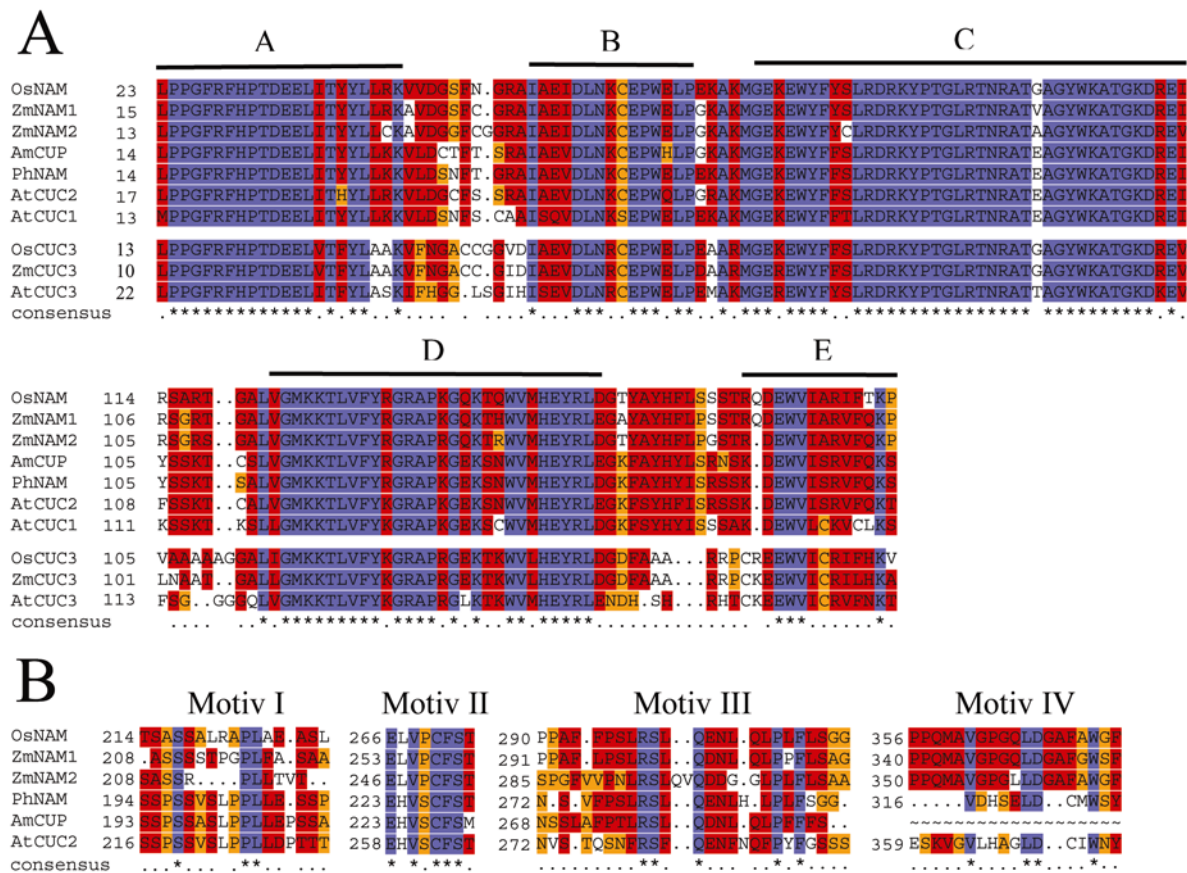


Abb.6: A: dargestellt ist ein über das Programm *CLUSTALX* erstellter Sequenzvergleich der *NAC* Domänen aller Mitglieder der *PhNAM/AtCUC3* Unterfamilie. Beide Gruppen können hauptsächlich durch die charakteristische Aminosäure-Zusammensetzung innerhalb der heterogenen Bereiche zwischen Subdomänen A/B bzw. D/E voneinander unterschieden werden.

B: Vertreter der *PhNAM* Gruppe sind zusätzlich durch Homolgien innerhalb der C-terminalen Domäne gekennzeichnet. Korrespondierende Bereiche in *AtCUC1* sind schwächer konserviert und deswegen nicht gezeigt. Für *AtCUC1* und *AtCUC2* konnte demonstriert werden, dass Motiv II die zu *AtmiR164a/b* korrespondierende miRNA Zielsequenz repräsentiert.

3.2.4 *ZmNAC4-6* werden weitestgehend unbekanntem Vertretern zugeordnet

Die Phagenbank-Sequenzen *ZmNAC4-6* werden diskreten Gruppen außerhalb der *AtCUC3/PhNAM* Unterfamilie zugeordnet. Der Gruppe um *ZmNAC4* und den beiden hochverwandten Endosperm ESTs *ZmCD437084* und *ZmCD443430* werden in einem benachbarten Ast zwei nah verwandte *Arabidopsis* Sequenzen zugewiesen. Die Zuordnung eines entsprechenden Reisverwandten zu dieser Gruppe ist nicht möglich.

ZmNAC5/6 sind wie *ZmNAM1/2* hoch verwandt, was sich in einer die gesamte Proteinnlänge umfassenden Identität von 86% widerspiegelt. Darüber hinaus sind beide Proteine nah verwandt zu *OsNAC7* aus Reis (*ZmNAC5*: 81,9% und *ZmNAC6*: 78,2% Gesamt-Identität), für welches mittels RT-PCR Expression in Embryonen nachgewiesen werden konnte (Kikuchi et al., 2000). Im Gegensatz hierzu wurden bisher für keine der zu *ZmNAC4-6* verwandten *Arabidopsis*-Sequenzen funktionale Daten veröffentlicht.

3.3 Bestimmung von chromosomalen Kartierungspositionen

Unter Verwendung des *IBM B73xMo17 mapping kits* (IBM, Missouri) wurde die Identifizierung von Kartierungspositionen isolierter *NAC* Sequenzen im Maisgenom angestrebt. Durch den Vergleich ermittelter Kartierungsdaten mit denen von bekannten Mutanten sollten potentiell korrespondierende Mutationen identifiziert werden. Für den Fall, dass die jeweilig betrachtete Mutation im Locus des untersuchten Gens liegt, sollte der entsprechende Phänotyp Rückschlüsse auf die Genfunktion geben.

Die Inzuchtlinien B73 und Mo17 wurden auf Polymorphismen innerhalb der Loci von *ZmNAC5*, *ZmNAC6*, *ZmCUC3* sowie *ZmNAM1* und *ZmNAM2* hin untersucht. Die Kartierung von *ZmNAC4* wurde nicht angestrebt, da dieses Gen hauptsächlich im Endosperm exprimiert wird und sein Beitrag zur embryonalen Musterbildung unklar ist (siehe Abschnitt 3.4.1). Die kodierende Region jedes zu kartierenden Gens wurde aus genomischer DNA der genetischen Hintergründe der Parentalgeneration unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.5 angegebenen *Primer* amplifiziert und nach Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor sequenziert. Durch Vergleich der Sequenzen konnten die in Tabelle 1 zusammengefassten Sequenzunterschiede innerhalb der Introns untersuchter *NAC* Gene identifiziert werden. Im nächsten Schritt wurden die aus der Kreuzung B73xMo17 hervorgegangenen 94 rekombinanten Linien der Filialgeneration in getrennten Ansätzen auf identifizierte Polymorphismen hin untersucht, indem mittels PCR ein geeigneter Bereich flankierend zum jeweiligen Marker amplifiziert und alle Fragmente auf einem 2% igen Agarosegel aufgetrennt wurden. Polymorphismen für *ZmNAC5* und *ZmCUC3* wurden durch vorherige Spaltung der PCR Produkte mit den Restriktionsendonukleasen *MseI* bzw. *XbaI* detektiert (*CAPS*-Marker). Die Kartierung der anderen *NAC* Gene erfolgte über *AFLP*-Marker. Nach Auswertung der Bandenmuster wurden die erhaltenen Segregationsdaten via Internet mit der IBM Datenbank (<http://www.maizemap.org/CIMDE/cimde.html>) abgeglichen und so die Position der *NAC* Gene relativ zu bereits kartierten Loci bestimmt (Tabelle 1).






	<i>ZmNAC5</i>	<i>ZmNAC6</i>	<i>ZmCUC3</i>	<i>ZmNAM1</i>	<i>ZmNAM2</i>
identifizierter Polymorphismus	durch Insertion eines Adenins hinter Pos. 119 des ersten Introns entsteht eine <i>MseI</i> Schnittstelle im B73 Hintergrund	Mo17 Hintergrund ist charakterisiert durch eine 100Bp Deletion im zweiten Intron	durch einen G→T Austausch an Pos. 107 des zweiten Introns entsteht eine <i>XbaI</i> Schnittst. im Mo17 Hintergrund	B73 Hintergrund ist charakterisiert durch eine 17Bp Deletion im ersten Intron	B73 Hintergrund ist charakterisiert durch eine 20Bp Deletion im ersten Intron
kartiert auf Chromosom	6	9	1	6	3
Koordinaten	6.04 	9.03 	1.06 	6.00-6.01 	3.05 
benachbarte Marker	<i>umc1857</i> / <i>umc2006</i>	<i>umc1258</i> / <i>umc1271</i>	<i>asg58</i> / <i>ntf1</i>	<i>umc85a</i> / <i>bnlg1867</i>	<i>umc102</i> / <i>umc1102</i>

Tabelle 1: mit Ausnahme von *ZmNAC4* sind für alle Gene der jeweilig identifizierte Polymorphismus sowie darauf basierend ermittelte Kartierungskoordinaten samt benachbarter Marker angegeben.

ZmNAM1/ZmNAM2 und *ZmNAC5/ZmNAC6* zeichnen sich neben hoher Homologie auch durch ähnliche Expressionsmuster aus (Abschnitte 3.4.2 bzw. 3.4.3). Ermittelte Kartierungspositionen bestätigen, dass es sich hierbei um Paraloge handelt, da große Bereiche von Chromosom 6 auf Chromosom 3 oder 9 dupliziert vorliegen. *ZmNAC6*, *ZmNAM1* und *ZmNAM2* kartieren in centromeren Bereichen, welche generell eine geringere RFLP-Markerdichte als weiter distal gelegene chromosomale Regionen aufweisen. Die Tatsache, dass korrespondierenden Kartierungspositionen keine identischen, eng benachbarten Marker zugeordnet werden können, erklärt sich durch die geringe Markersaturierung in flankierenden Regionen der Kartierungspositionen von *ZmNAC6*, *ZmNAM1* und *ZmNAM2*.

Untersuchungen innerhalb der Maisgenom-Datenbank (www.maizeGDB.org) ergaben, dass keines der kartierten *NAC* Gene mit einer der jeweils benachbart liegenden Mutationen assoziiert werden kann. Eine Ausnahme hierzu stellt jedoch *ZmCUC3* dar:

Neben *ZmCUC3* kartiert auch die EMS-induzierte, rezessive Mutation *adherent leaf* (*ad*-N613B*) auf Abschnitt 6 von Chromosom 1 zwischen den Markern *asg58* und *ntf1*. In homozygoten *ad*-N613B*-Keimlingen ist jeweils paarweise ein Blatt entlang seines Randes mit der Mittelrippe des zuvor angelegten Blattes zu einem konnektiven Gewebeverband fusioniert. Dieser Defekt prägt sich auf die ersten, bereits embryonal angelegten Blätter aus. In Abgleich mit den für *ZmCUC3* etablierten Expressionsmustern (Abschnitt.3.4.2) legte der beobachtete Phänotyp die Vermutung nahe, er könnte in einem Verlust der *ZmCUC3*

Genfunktion begründet sein. Um zu überprüfen, ob *ad*-N613B* Keimlinge eine Punktmutation im *ZmCUC3* Gen tragen, wurden 40 Körner der entsprechenden Linie im Gewächshaus angezogen. Von 38 gekeimten Pflanzen zeigten 9 den beschriebenen Phänotyp. Aus Blattmaterial dieser Keimlinge wurde gemäß Abschnitt 2.2.4 genomische DNA extrahiert und als Substrat in PCRs mit den Primern *ZmCUC3mapF1/R1* eingesetzt, um die kodierende Region von *ZmCUC3* aus dem mutanten Hintergrund zu amplifizieren. Nach Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor wurden alle 9 PCR-Fragmente sequenziert und über „*pileup*“ mit der Sequenz der kodierenden Region des B73-Hintergrunds verglichen. In keinem Fall konnte eine Punktmutation identifiziert werden, die einen Aminosäureaustausch oder das Einfügen eines Stopcodons im *ad*-N613B* Hintergrund bedingt. In einem parallelen Ansatz wurde aus Sprossen mutanter und wildtypischer Keimlinge vergleichbaren Entwicklungs-Stadiums Gesamt-RNA extrahiert und in äquimolaren Konzentrationen in eine cDNA Synthese (Abschnitt 2.2.7) eingesetzt. In nachfolgenden RT-PCR Expressionsanalysen stellte sich heraus, dass auch die Rate der *ZmCUC3* Genexpression im mutanten Hintergrund unverändert zum Wildtyp ist. Aufgrund des stark retardierten Wachstums konnten mutante Pflanzen nicht propagiert werden. Das *ZmCUC3* Expressionsmuster konnte daher nicht in Bezug auf den sich embryonal manifestierenden Entwicklungsdefekt untersucht werden. Möglich wäre, dass die zeitliche und/oder räumliche Steuerung der *ZmCUC3* Expression im *ad*-N613B* Hintergrund leicht unterschiedlich erfolgt.

3.4 NAC Gene liefern Einblicke in frühe Musterbildungsprozesse

Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der isolierten *NAC* Gene wurde über *in situ* Hybridisierungen erfasst. Um dabei Kreuzhybridisierungen mit Transkripten anderer *NAC* Gene zu vermeiden, wurden entsprechende Sonden komplementär zu Sequenzen außerhalb der für die *NAC* Domäne kodierenden Region entworfen. Für den Nachweis des *Kn1* Transkriptionsmusters wurde auf eine Sonde zurückgegriffen, die komplementär zur gesamten 1,6kb langen Sequenz der *Kn1* mRNA ist. Die für den Nachweis von *ZmSCR*-Transkript verwendete Sonde detektiert die 512 terminalen Basen der entsprechenden 3'-untranslatierten Region. Eine geeignete Sonde für ergänzende Analysen des *ZmWOX5b* Expressionsmusters (siehe Abschnitt 3.4.4) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Judith Nardmann zur Verfügung gestellt. Substrate für die *in vitro* Transkription wurden über Klonierung entsprechender Amplikons in den pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor und nachfolgende Linearisierung flankierend zum *Insert* hergestellt. Die Spezifität neu entworfener Sonden wurde jeweils durch Hybridisierung mit einer in Sinnrichtung der mRNA transkribierten

Sonde im gleichen experimentellen Ansatz kontrolliert. Ergebnisse von *in situ* Hybridisierungen an longitudinalen Schnitten von Maiskörnern unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigten, dass die isolierten *NAC* Gene während unterschiedlicher Entwicklungsprogramme exprimiert werden. Die verschiedenen Transkriptionsmuster werden daher in separaten Abschnitten vorgestellt werden. Dabei ist zur besseren Übersicht in Darstellungen von longitudinalen Schnitten durch Maisembryonen die adaxiale Seite des SAM stets nach links orientiert.

3.4.1 *ZmNAC4* Expression ist hoch Endosperm-spezifisch

ZmNAC4 Transkript ist erstmals um 6DAP detektierbar (Abb. 7A). Expression lokalisiert in medianen, longitudinalen Schnitten oberhalb des frühen Proembryos und geht einher mit ersten Zellularisierungsprozessen innerhalb des zuvor syncytialen Endosperms (Olsen et al., 2004). Hohe Expressionsraten werden um 10DAP erreicht und fortan bis zum Beginn der Samenruhe aufrecht erhalten. *ZmNAC4* wird Endosperm-spezifisch exprimiert: Transkripte werden weder in der Aleuronschicht noch im maternalen Perikarp detektiert (Bild B). Aus den Zellen der Aleuronschicht gehen durch perikline Teilungen die Zellen der Subaleuronschicht hervor, die nachfolgend in Endosperm-Zellen redifferenzieren. *ZmNAC4* Expression unterscheidet zwischen Zellen der Subaleuronschicht und denen des darunterliegenden Endosperms. *ZmNAC4* stellt somit einen frühen und selektiven Marker für die Differenzierung von Zellen des Endosperms dar.

Transkriptionelle Aktivität kann ebenfalls schwach um 12DAP in wenigen Zellen des embryonalen provaskulären Gewebes nachgewiesen werden (Abb. 7C). Da embryonale Expression nur transient ist, bleibt der Beitrag von *ZmNAC4* zur embryonalen Musterbildung unklar. Es kann darüber hinaus nicht ausgeschlossen werden, dass detektierte Signale evtl. auf einer Kreuzhybridisierung der verwendeten Sonde mit redundanten Transkripten (siehe Abschnitt 3.2.4) beruht.

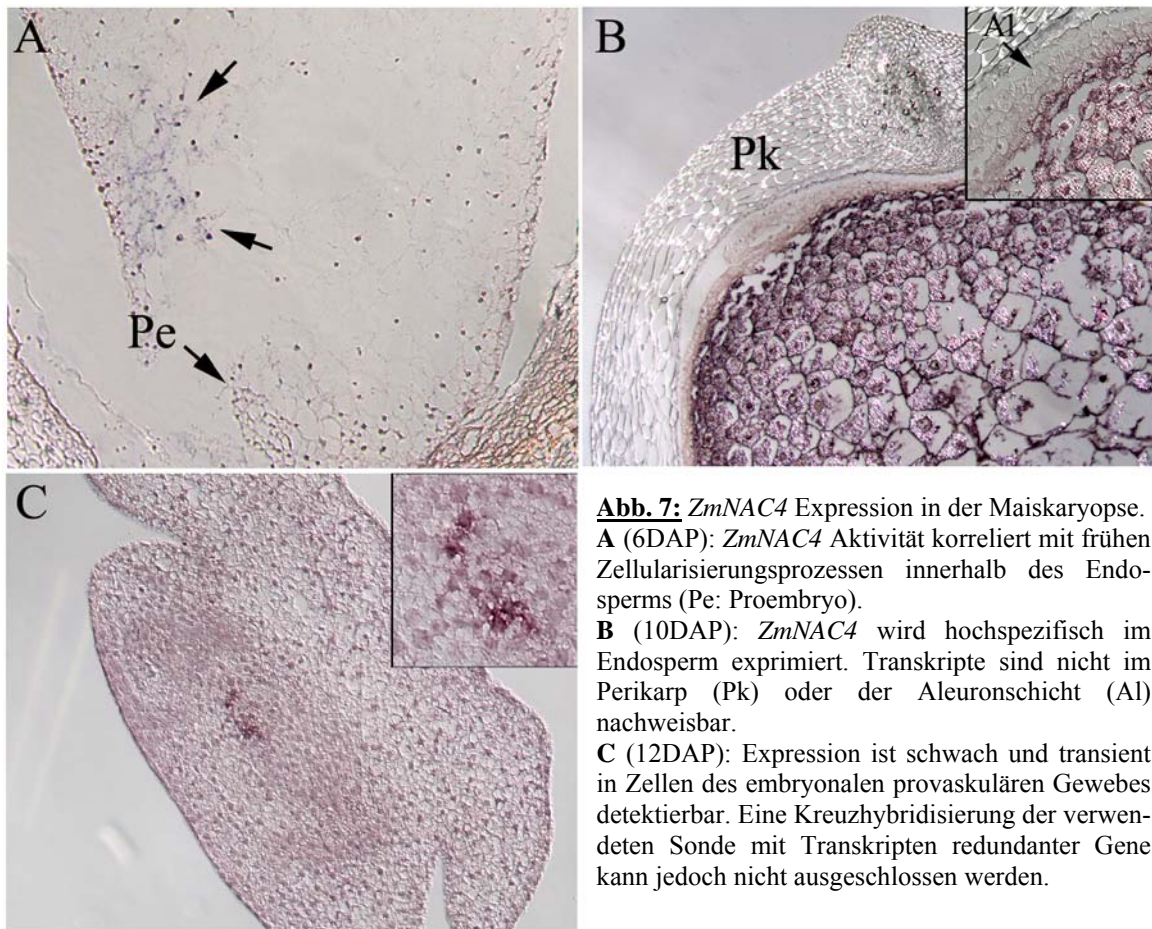


Abb. 7: *ZmNAC4* Expression in der Maiskaryopse. **A** (6DAP): *ZmNAC4* Aktivität korreliert mit frühen Zellularisierungsprozessen innerhalb des Endosperms (Pe: Proembryo). **B** (10DAP): *ZmNAC4* wird hochspezifisch im Endosperm exprimiert. Transkripte sind nicht im Perikarp (Pk) oder der Aleuronschicht (Al) nachweisbar. **C** (12DAP): Expression ist schwach und transient in Zellen des embryonalen provaskulären Gewebes detektierbar. Eine Kreuzhybridisierung der verwendeten Sonde mit Transkripten redundanter Gene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.4.2 Etablierung des apikalen Sprossmeristems

3.4.2.1 *ZmCUC3* und *ZmNAM1/2* werden ringförmig um das SAM exprimiert

ZmCUC3, *ZmNAM1* und *ZmNAM2* sind hoch verwandt zu *AtCUC3* bzw. *PhNAM*.

Daher wurde überprüft, ob die phylogenetischen Vorhersagen für diese Gene durch vergleichbare Genexpressionsmuster substantiiert werden können. Abbildung 8 auf Seite 50 zeigt eine Gegenüberstellung der Transkriptionsmuster von *ZmNAM1* und *ZmCUC3* in medianen, longitudinalen Schnitten durch Embryonen des frühen Transitions- bis Koleoptilar-Stadiums. *ZmNAM1*-Aktivität ist zum ersten Mal schwach im frühen Transitions-Stadium in einem mittigen Bereich der adaxialen Hälfte des Embryo *propers* nachweisbar. Pfeile in Bild A deuten auf *ZmNAM1*-exprimierende Zellen in der äußersten Zellschicht. Im mittleren Transitions-Stadium zeigt die *ZmNAM1* Expressionsdomäne eine klare Präferenz für die äußerste adaxiale Zellschicht (L1) des sich entwickelnden Sprossmeristems. Schwache Genaktivität ist auch in den 2-3 darunterliegenden Zellschichten detektierbar (Bild B). Im späten Transitions-Stadium kann das inzwischen elaborierte SAM aufgrund seiner kompakten Zellen histologisch vom umgebenden embryonalen Gewebe unterschieden werden. Zu diesem Entwicklungs-Stadium ist die *ZmNAM1* Expressionsdomäne in tiefer gelegenen

Zellschichten deutlicher ausgeprägt, insbesondere an der apikalen Flanke zur Grenze der nachfolgend angelegten Koleoptile (Bild C). Eine klare Veränderung im Expressionsmuster zeigt sich im Koleoptilar-Stadium: *ZmNAM1*-Aktivität ist nun im Zentrum des SAM nicht mehr nachweisbar, bleibt aber an dessen Peripherie als ringförmige Expressionsdomäne erhalten. Die Koleoptile entsteht außerhalb dieses Rings (Bild D, vergleiche mit einem transversalen Schnitt in Bild E), welcher eine klare Grenze zwischen dem SAM und umliegendem embryonalen Gewebe markiert. Schwache *ZmNAM2* Expression wird ebenfalls in einer ringförmigen Domäne um das SAM detektiert (nicht gezeigt). In anderen embryonalen Stadien konnte *ZmNAM2* Expression auf zellulärer Ebene nicht nachgewiesen werden. Die zeitliche Steuerung der *ZmNAM2* Expression könnte daher leicht unterschiedlich erfolgen. Im weiteren Verlauf der Embryogenese und somit noch bevor Aktivität des SAM durch die Anlage des ersten Blattprimordiums histologisch sichtbar wird, kann auch *ZmNAM1* Expression nicht mehr auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu *ZmNAM1* wird *ZmCUC3*-Aktivität erst im mittleren Transitions-Stadium aber ebenfalls präferentiell in der L1 des adaxialen Embryo *propers* detektiert. Die *ZmCUC3* Expressionsdomäne ist im Vergleich zu der von *ZmNAM1* kleiner und auf einen weiter basal gelegenen Bereich der adaxialen L1 begrenzt. (vergleiche Bilder B und G). Im späten Transitions-Stadium wird *ZmCUC3* in der L1 als auch in tiefer gelegenen Zellschichten an der unteren Flanke des SAM exprimiert (Bild H). Im Koleoptilarstadium wird *ZmCUC3* Expression ebenfalls ringförmig um das SAM detektiert. Im Gegensatz zu *ZmNAM1/2* ist die *ZmCUC3* Domäne dabei stärker an der basalen Grenze zwischen Meristem und prospektivem erstem Blattprimordium ausgeprägt.

Zusammenfassend können die embryonalen Expressionsmuster von *ZmCUC3* und *ZmNAM1/2* wie die Ihrer Homologen aus *Arabidopsis* und *Petunia* in enge Korrelation mit der Etablierung des apikalen Sprossmeristems während der Embryogenese gestellt werden können.

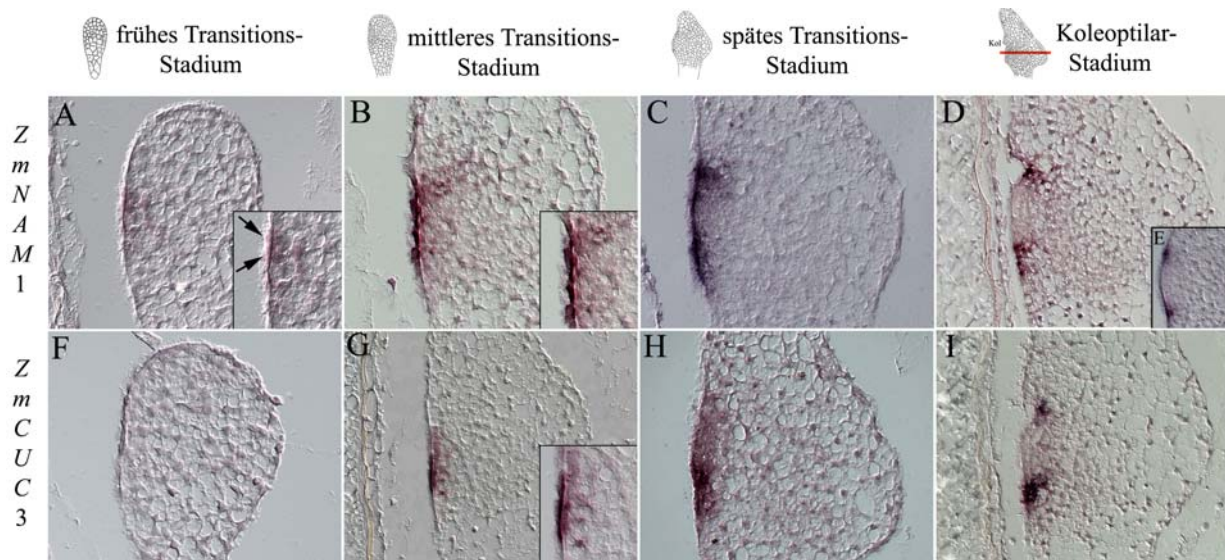


Abb. 8: Vergleich der embryonalen Expressionsmuster von *ZmCUC3* und *ZmNAMI*.

Frühe *ZmNAMI* Expression ist in den 3-4 äußersten Zellschichten des adaxialen Embryo *propers* nachweisbar (A, durch Pfeile markiert). Während der weiteren Entwicklung zeigt sich nach zuerst präferentieller Expression in der L1 (B) zunehmende Aktivität in tieferen Zellschichten, insbesondere an der apikalen Flanke des SAM (C). *ZmNAMI* Expression wird mit Übergang zum Koleoptilar-Stadium im Zentrum herunterreguliert, bleibt aber an der Peripherie des SAM als ringförmige Domäne erhalten (D, vgl. mit transversalem Schnitt in E—die korrespondierende Schnittebene ist oberhalb von Bild D gezeigt). *ZmCUC3* wird erst im mittleren Transitions-Stadium aktiviert (G, vgl. auch F mit A). Im späten Transitions-Stadium zeigt sich im Gegensatz zu *ZmNAMI* eine klare Präferenz zur basalen Flanke des SAM (H). Im Koleoptilar-Stadium wird *ZmCUC3* ebenfalls ringförmig um das SAM exprimiert, im Ggs. zu *ZmNAMI* ist die *ZmCUC3* Domäne jedoch durch stärkere Expression an der basalen Grenze zwischen SAM und nachfolgend angelegtem Blattprimordium gekennzeichnet (I).

3.4.2.2 *Kn1* und *ZmNAMI* werden im frühen Transitions-Stadium ko-aktiviert

Frühe *ZmNAMI* Expression prägt sich hauptsächlich auf die adaxiale L1-Schicht des sich entwickelnden SAM aus. Dieser Befund deutet auf eine enge räumliche Beziehung zum Expressionsmuster von *Kn1* (Smith et al., 1995). Im nächsten Schritt wurden daher die Transkriptionsdomänen von *ZmNAMI* und *Kn1* auf benachbarten longitudinalen Schnitten durch Embryonen des frühen Transitions- bis Koleoptilar-Stadiums vergleichend analysiert, um ihre räumliche und zeitliche Korrelation zueinander herauszustellen.

Die Expressionsdomänen von *ZmNAMI* und *Kn1* zeigen im frühen Transitions-Stadium signifikanten Überlapp (Abb. 9, Bilder A/B). Dabei erscheint die *ZmNAMI*-Domäne kleiner als die von *Kn1* und ist leicht in Richtung adaxialer L1-Schicht und prospektiver Koleoptile versetzt. Im Unterschied zu Ergebnissen bisheriger Veröffentlichungen (Smith et al., 1995; Kim et al., 2003) kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass die frühe *Kn1* Expressionsdomäne ebenfalls Zellen der adaxialen L1 einschließt (siehe Bildausschnitt in B für einen etwas weiter entwickelten Embryo). Während des mittleren- und späten Transitions-Stadiums wird *Kn1* dann nicht mehr oder nur schwach in der äußersten Zellschicht und den

darunterliegenden, *ZmNAM1* exprimierenden Zellen transkribiert (vergleiche Bild C mit D). Im Koleoptilar-Stadium wird die apikale und basale Begrenzung der *Kn1*-Domäne auf der adaxialen Seite durch *ZmNAM1* exprimierende Zellen flankiert (Bild E/F).

Zusammenfassend werden *ZmNAM1* und *Kn1* im Transitions-Stadium in partiell überlappenden Domänen ko-aktiviert. Nachfolgend richten sich Expressionsmuster komplementär zueinander aus: während *ZmNAM1* mRNA präferentiell in der L1 detektierbar ist, wird *Kn1* in darunterliegenden Zellschichten transkribiert. Im Koleoptilar-Stadium ist *ZmNAM1* Expression dann nicht mehr im Zentrum des Meristems, sondern als ringförmige Domäne an dessen Peripherie nachweisbar. Die *ZmNAM1* Expressionsdomäne markiert dabei die obere und untere Flanke der *Kn1* Domäne auf der adaxialen Seite.

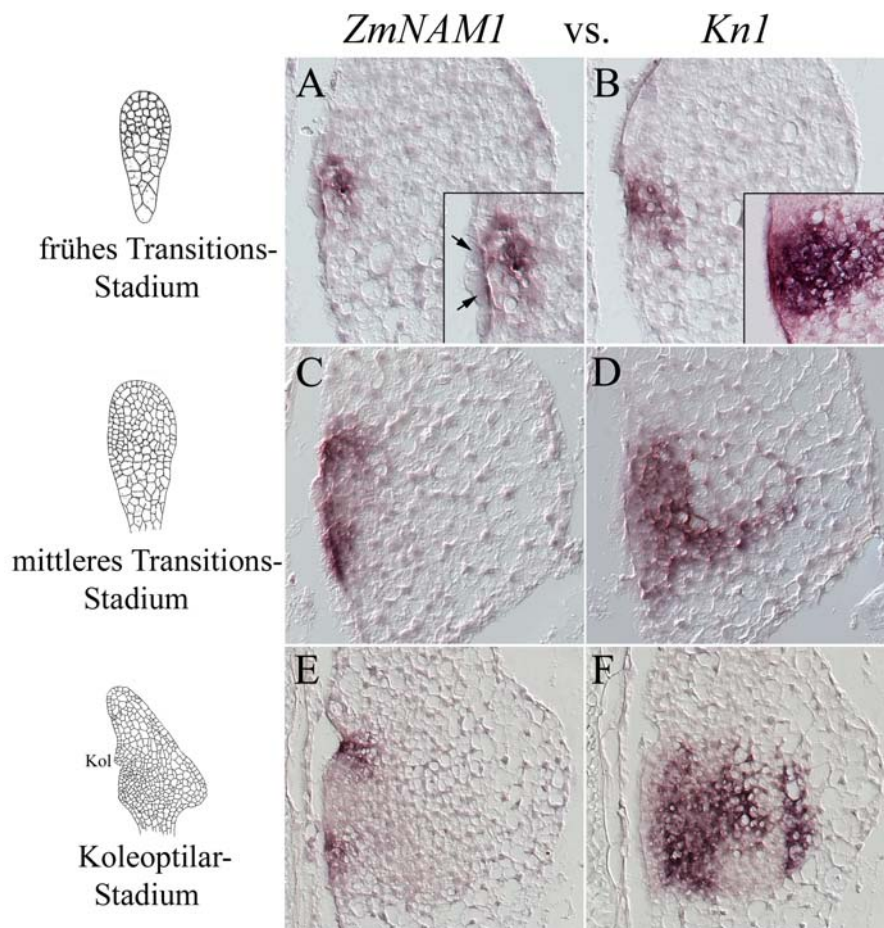


Abb. 9: Vergleichende Gegenüberstellung der Expressionsmuster von *ZmNAM1* und *Kn1* auf benachbarten longitudinalen Schnitten durch Embryonen früher Entwicklungsstadien.

A/B: beide Gene werden im frühen Transitions-Stadium in partiell überlappenden Domänen aktiviert. Pfeile in **A** markieren *ZmNAM1* Expression in der L1 (vgl. zu Bild A in Abb. 8). Wie der Bildausschnitt in **B** für einen etwas weiter entwickelten Embryo belegt, wird *Kn1* während früher Stadien ebenfalls in der adaxialen L1 des Embryo *propers* exprimiert. **C/D:** *ZmNAM1*- und *Kn1* Expressionsmuster sind im mittleren Transitions-Stadium komplementär zueinander ausgerichtet: *Kn1* ist nicht mehr oder nur noch schwach in der L1 und darunterliegenden, *ZmNAM1* exprimierenden Zellen nachweisbar. **E/F:** im Koleoptilar-Stadium markiert *ZmNAM1* Expression an den Flanken des SAM die apikale und basale Begrenzung des adaxialen Teils der *Kn1* Domäne.

3.4.2.3 *ZmCUC3* Expression markiert die Anlage lateraler Organe

Im Gegensatz zu *ZmNAMI/2* bleibt *ZmCUC3* Expression auf charakteristische Weise mit der Anlage neuer lateraler Organe während der weiteren Maisentwicklung assoziiert. Bild A in Abbildung 10 zeigt, dass *ZmCUC3* Transkript in medianen, longitudinalen Schnitten durch einen Embryo des späten Laubblatt-Stadiums 1 in vier diskreten Bereichen detektierbar ist, welche die Grenzregionen zwischen der Koleoptile und erstem Blatt bzw. erstem Blatt und SAM darstellen. Die Koleoptile und das erste Blatt umschliessen das SAM vollständig. Deswegen stellen die in Bild A mit 1 und 2 bezeichneten, sich auf der adaxialen und abaxialen Seite der Spross-Wurzel Achse gegenüberliegenden punktförmigen Bereiche korrespondierende Teildomänen der gleichen ringförmigen Expressionsdomäne zwischen Koleoptile und erstem Blatt dar. Entsprechend repräsentieren die Teildomänen 3 und 4 eine weitere, ringförmig zwischen Blatt 1 und SAM verlaufende Expressionsdomäne. Teildomäne 4 ist dabei breiter ausgeprägt als Teildomäne 3. Zu diesem Entwicklungsstadium ist die embryonale Achse noch stark gestaucht. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass der adaxiale Bereich von Teildomäne 4 bereits die Grenze zwischen SAM und dem nächst-angelegten Blatt (L2) markiert.

Die Bilder C-E zeigen das auf konsekutiven, transversalen Schnitten durch einen Embryo vergleichbaren Entwicklungsstadiums detektierte *ZmCUC3* Muster. Entsprechende Schnittebenen sind schematisch in Bild B wiedergegeben. Die Spross-Wurzel Achse verläuft schräg zur apikal-basalen Achse des Embryos; daher stellt sich das transversale *ZmCUC3* Expressionsmuster zwischen Koleoptile und abaxialer Seite des ersten Blattes als 2 sich gegenüberliegende punktförmige Teildomänen dar (als 1* und 2* bezeichnet), die in Richtung abaxialer Seite des SAM wandern. Diese Teildomänen markieren den Übergang zwischen konnektivem und bereits getrenntem Gewebe. Die 2 inneren Teildomänen (3* und 4*) schliessen sich, wie in Bild E gezeigt, zu einer halbkreisförmige Domäne, welche die Grenze zwischen abaxialer Seite des SAM und adaxialer Seite des ersten angelegten Laubblattes markiert.

Ein vergleichbares Muster wird auf transversalen Schnitten durch ein vegetatives Meristem detektiert: *ZmCUC3* Transkript ist hier in der Grenzregion zwischen SAM und der Basis des Primordiums P1 nachweisbar. Die Ebene des in Bild F gezeigten Schnittes verläuft leicht schräg zur Ebene von P1. Aus diesem Grunde erscheint die *ZmCUC3* Domäne auf der linken Seite in kontinuierlichem Gewebeverband (durch Pfeile angedeutet) und liegt somit leicht oberhalb des auf der rechten Seite angeschnittenen Bereichs, in welchem P1 vom Meristem getrennt wird. Der sichelförmige Verlauf der *ZmCUC3* Expressionsdomäne verdeutlicht, dass

etwa ein Drittel des SAM für die Anlage des Blattprimordiums P1 rekrutiert wird. Ein ähnliches Expressionsmuster kann in vergleichbaren Schnittebenen für *ZmNAM1* nachgewiesen werden (nicht gezeigt). *ZmNAM2* Expression ist hingegen weder über *in situ* Hybridisierung noch über RT-PCR in vegetativen Meristemen nachweisbar. Ähnlich wie im Embryo wird *ZmCUC3* auch in vegetativen Meristemen nicht nur zwischen SAM und anliegendem Blattprimordium P1, sondern auch in den Bereichen exprimiert, in denen das zuvor angelegte Primordium P2 von der Sprossachse getrennt wird (Bild G). *ZmNAM1* Expression ist ebenfalls in tieferen Regionen der Sprossachse detektierbar. Im Gegensatz zu *ZmCUC3* ist *ZmNAM1* jedoch oberhalb der jeweiligen Blattbasis in der adaxialen Epidermis von P2 (Bild H), P3 und P4 aktiv.

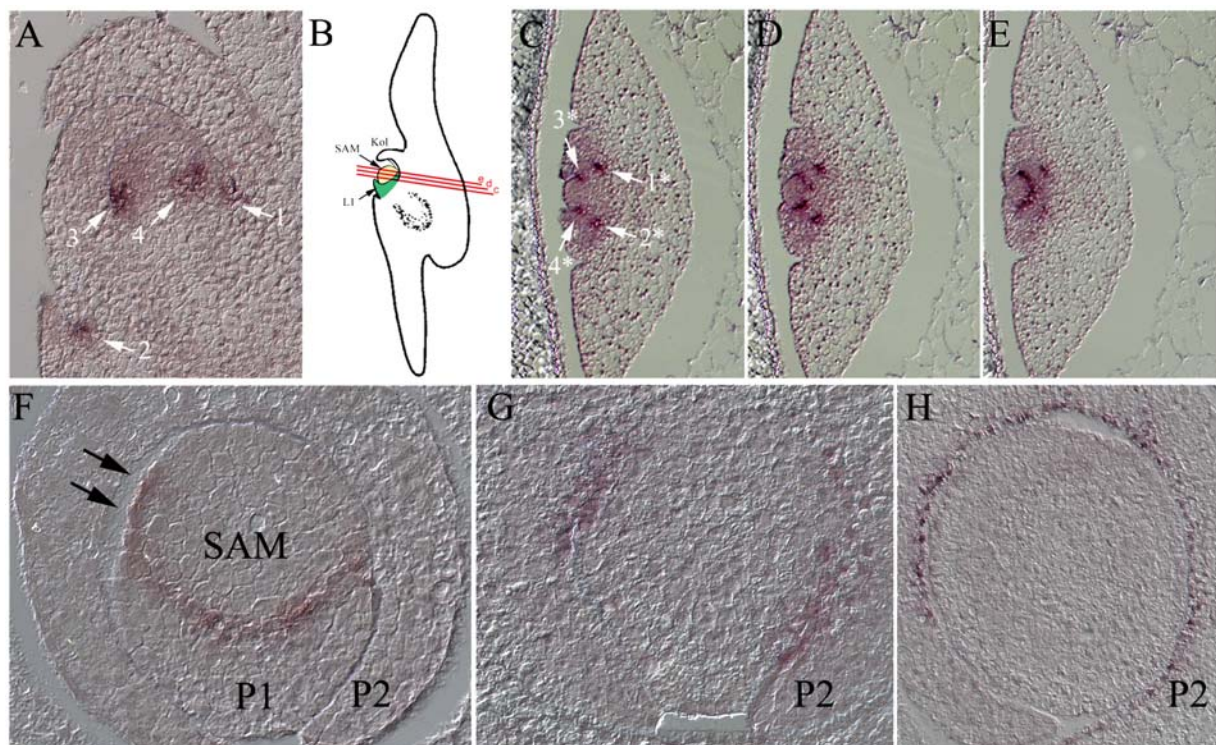


Abb. 10: *ZmCUC3* Expression während später embryonaler Entwicklung und vergleichend zu *ZmNAM1* während der vegetativen Phase. **A-E:** *ZmCUC3* wird zwischen SAM und Blättern sowie zwischen Blättern und Koleoptile exprimiert. Bild **F** zeigt *ZmCUC3* Expression auf einem transversalen Schnitt durch den basalen Bereich zwischen vegetativem SAM und P1. Pfeile in Bild F markieren *ZmCUC3* Expression in Zellen des SAM oberhalb des Übergangs zu P1. Ein vergleichbares Expressionsmuster wird für *ZmNAM1* detektiert (nicht gezeigt). **G:** *ZmCUC3* Transkript ist ebenfalls in Regionen detektierbar, in denen das zuvor angelegte Blatt P2 vom Stamm getrennt wird. *ZmNAM1* wird in weiter oberhalb gelegenen Bereichen der adaxialen Epidermis von P2 und zuvor angelegten Blättern (P3,P4) exprimiert (**H**).

3.4.2.4 *ZmCUC3*- und *ZmNAM1/2* Expression in Infloreszenzen

ZmCUC3 und *ZmNAM1/2* werden ebenfalls in weiblichen und männlichen Infloreszenzen exprimiert. Beide Blütenstände sind durch eine große Anzahl von Meristemen und Blütenorgane unterschiedlichster Entwicklungsstadien charakterisiert, so dass hier ein umfassender Überblick über die Dynamik der *ZmCUC3*- und *ZmNAM1/2* Expressionsmuster gewonnen werden kann. Eine Übersicht über die verschiedenen Stadien der Infloreszenz- und Blütenentwicklung gibt Abbildung 11. Bezüglich detaillierter Ausführungen sei auf die Studien von Cheng et al., 1983 verwiesen.

ZmCUC3 Transkript ist in Infloreszenzen flankierend zu *spikelet pair*, *spikelet* und floralen Meristemen sowie ringförmig zwischen auswachsenden Blütenorganen nachweisbar. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass *ZmCUC3* schwach ubiquitär im Infloreszenz-Meristem exprimiert wird (nicht gezeigt).

ZmNAM1 und *ZmNAM2* werden in überlappenden Domänen transkribiert; dabei ist *ZmNAM2* Aktivität generell schwächer detektierbar. Analog zur Situation im Embryo, weist das reproduktive Expressionsmuster von *ZmNAM1* (*ZmNAM2*) signifikante Unterschiede zu dem von *ZmCUC3* auf. *ZmNAM1/2* sind im Gegensatz zu *ZmCUC3* präferentiell innerhalb neu angelegter *spikelet pair*, *spikelet* und floraler Meristeme aktiv, wobei sich Expression nach und nach in Richtung äußerster Zellschicht fokussiert. In weiter entwickelten Meristemen wird *ZmNAM1/2*-Transkript in einer ringförmige Domäne exprimiert, die eine Grenze zu umliegendem Gewebe markiert. Im Gegensatz zu *ZmCUC3* werden beide Gene nicht oder nur sehr schwach zwischen auswachsenden Blütenorganen exprimiert. Ein Vergleich der Expressionsdomänen von *ZmCUC3* und *ZmNAM1* auf benachbarten longitudinalen Schnitten ist exemplarisch für eine weibliche Blüte des Stadiums B bzw. des Stadiums E in Abbildung 11 gezeigt (Einteilung der Blütenstadien nach Cheng et al., 1983).

Zusammenfassend kann aus der einheitlichen Betrachtung der Expressionsmuster von *ZmCUC3* und *ZmNAM1/2* geschlussfolgert werden, dass alle drei Gene in enger Korrelation zur Entstehung des SAM bzw. der Anlage lateraler Organe exprimiert werden. Dabei weist das Expressionsmuster von *ZmNAM1* (*ZmNAM2*) signifikante Unterschiede zum dem von *ZmCUC3* auf. Auf einen Vergleich der Mais-Muster zu denen ihrer nächst-verwandten dikotylen Spezies wird in Abschnitt 4.2.1 der Diskussion eingegangen werden.

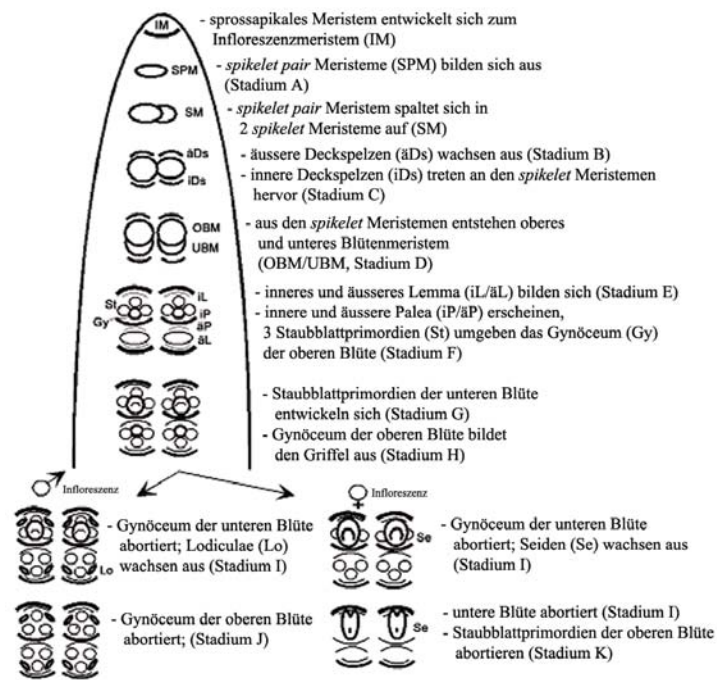


Abb. 11: schematische Übersicht über die einzelnen Stadien der männlichen und weiblichen Infloreszenz- und Blütenentwicklung (nach Cheng et al., 1983).

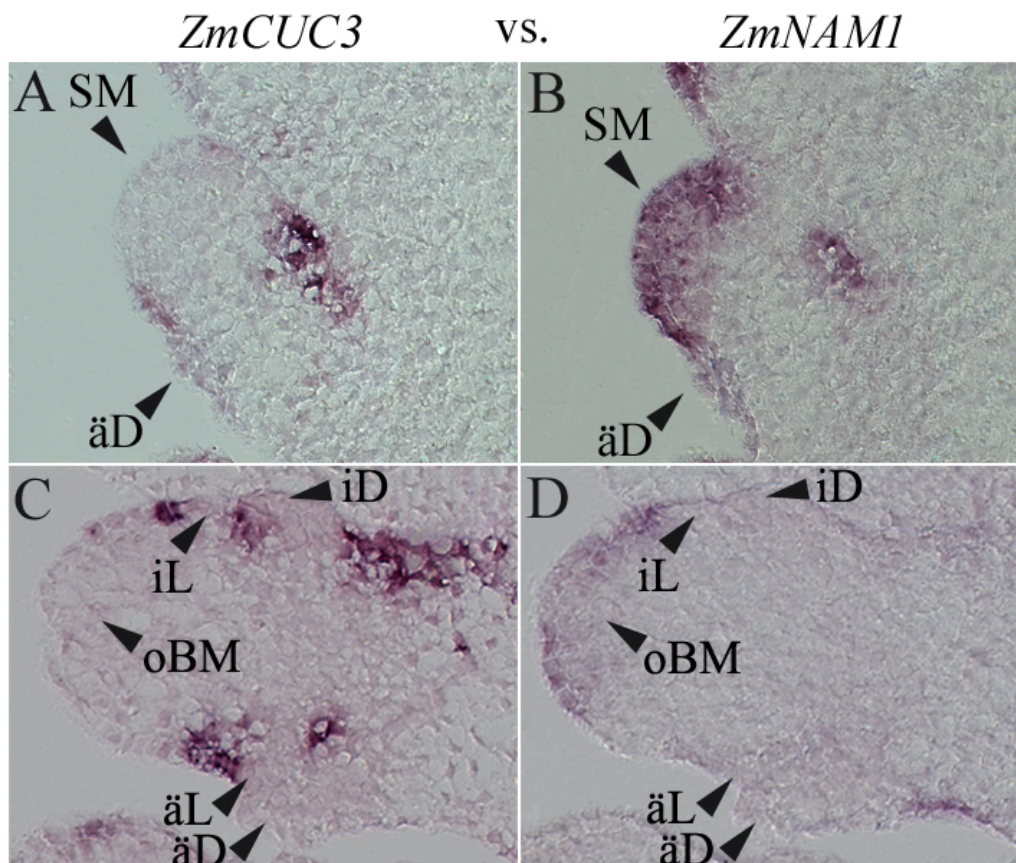


Abb. 12: A-D: vergleichende Gegenüberstellung der *ZmCUC3*- und *ZmNAMI* Expressionsmuster auf benachbarten Schnitten durch eine weibliche Blüte des Stadiums B (A/B) bzw. des Stadiums E (C/D, nach Cheng et al., 1983). Während *ZmCUC3* Expression die Grenze zwischen lateralen Organen markiert, ist *ZmNAMI* Transkript präferentiell innerhalb des spikelet- bzw. oberen Blütenmeristems nachweisbar. Abkürzungen: iDs/äDs: innere/äußere Deckspelze; iL/äL: inneres/äußeres Lemma; oBM: oberes Blütenmeristem; SM: spikelet Meristem.

3.4.3 Entstehung der embryonalen Wurzel

Für *ZmNAC5* und *ZmNAC6* durchgeführte *in situ* Hybridisierungen zeigten, dass beide Gene auf vergleichbare Weise im Rahmen der frühen embryonalen Wurzelentwicklung exprimiert werden. Um die räumliche und zeitliche Relation beider Expressionsmuster relativ zur Anlage des Wurzelmeristems zu erfassen, wurden vergleichende *in situ* Expressionsanalysen durchgeführt. Hierfür wurde auf benachbarten Schnitten durch Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien das *ZmNAC6* Expressionsmuster dem von *ZmSCR* (siehe Einleitung, Abschnitt 1.2.3) gegenübergestellt.

3.4.3.1 *ZmSCR* wird vor *ZmNAC6* zentral im Proembryo aktiviert

Der Vergleich der Bilder A und B in Abbildung 13 verdeutlicht, dass *ZmSCR* im Gegensatz zu *ZmNAC6* bereits im frühen Proembryo aktiviert wird. Die frühe *ZmSCR* Expressionsdomäne ist zentral im Embryo *proper* ausgerichtet lässt bereits die für spätere Stadien charakteristische Scheitelform erkennen. Überlappend zu *ZmSCR* wird *ZmWOX5b* exprimiert (nicht gezeigt). *ZmWOX5b* ist hochverwandt zu *AtWOX5* aus *Arabidopsis* (*WUSCHEL*-related *Homeobox*, Haecker et al., 2004) bzw. *QHB* aus Reis (*quiescent-center-specific homeobox gene*, Kamiya et al., 2003). Frühe *ZmWOX5b* Expression ist spezifisch für das ruhende Zentrum (RZ) des Wurzelmeristems. Zelluläre Identität des ruhenden Zentrums kann also im Proembryo sowohl über *ZmSCR*- als auch *ZmWOX5b* Aktivität nachgewiesen werden.

3.4.3.2 Die *ZmSCR* Domäne gibt Lage und Orientierung der *ZmNAC6* Domäne vor

ZmNAC6 Expression ist zum ersten Mal im mittleren Transitions-Stadium detektierbar. *ZmNAC5* wird im späten Transitions-Stadium aktiviert (nicht gezeigt).

Die scheitelförmige *ZmSCR* Expressionsdomäne gibt Lage und Orientierung der *ZmNAC6* Domäne innerhalb des Embryos vor: diese ist tassenförmig ausgeprägt und liegt direkt unterhalb der von *ZmSCR* am zentralen Übergang zum Suspensor (Abb. 13 C/D). Die enge Korrelation beider Expressionsdomänen zueinander verdeutlicht auch der in den Bildern E und F gezeigte Vergleich für einen Embryo des Koleoptilar-Stadiums: wie die *ZmSCR*-Domäne ist die von *ZmNAC6* leicht sichelförmig ausgeprägt.

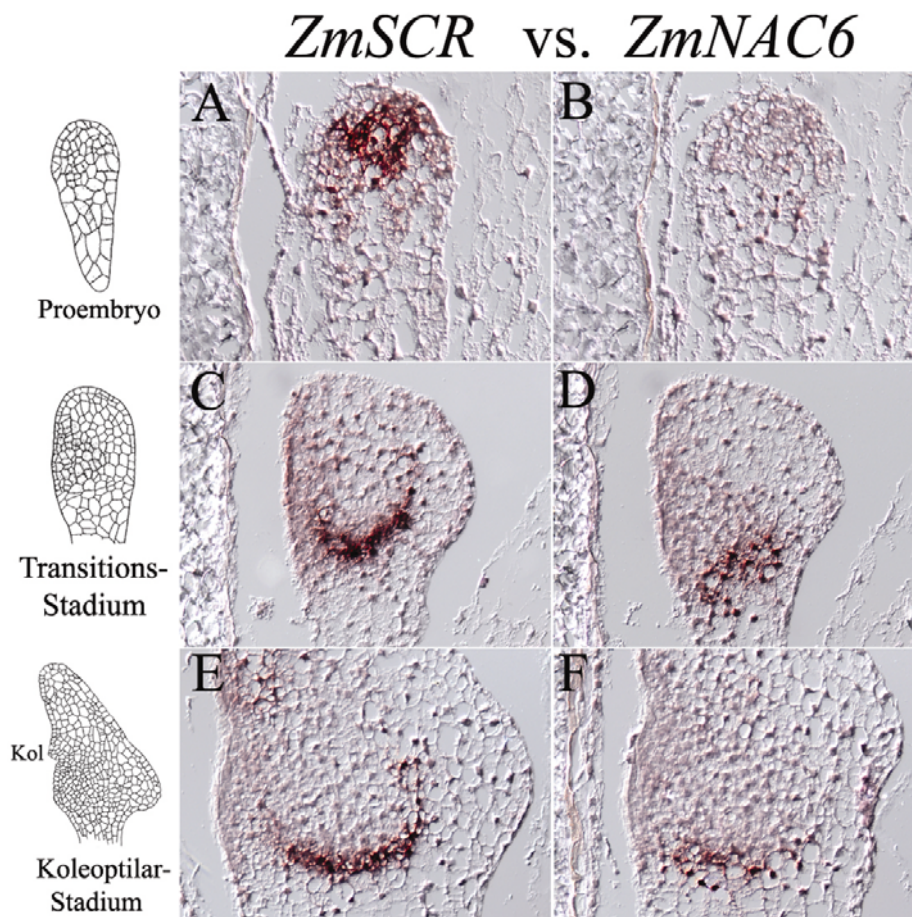


Abb. 13: vergleichende Gegenüberstellung der frühen embryonalen Expressionsmuster von *ZmSCR* und *ZmNAC6*. **A/B:** *ZmSCR* Expression ist bereits zentral im Proembryo nachweisbar. **C/D:** *ZmNAC6* Expression ist zum ersten Mal im frühen Transitions-Stadium detektierbar. Die *ZmNAC6* Domäne liegt unmittelbar unterhalb der von *ZmSCR* am zentralen Übergang zum Suspensor. Die Ausrichtung der *ZmSCR* Domäne gibt dabei Lage und Orientierung der von *ZmNAC6* vor (siehe auch Bilder E/F).

3.4.3.3 *ZmNAC5/6* markieren zelluläre Identität der Koleorrhiza/Wurzelhaube

Das *ZmNAC5/6* Expressionsmuster späterer embryonaler Stadien verdeutlicht, dass frühe *ZmNAC5/6* Genaktivität zelluläre Identität der Koleorrhiza markiert:

ZmNAC5/6 wird in Embryonen des Laubblatt-Stadiums 1 in einer zum Suspensor hin kegelförmig zulaufende Domäne exprimiert, die im oberen Bereich eine diskrete Grenze zwischen Schichten unterschiedlicher zellulärer Identität markiert (Bild A, Abbildung 14). Entlang dieser Grenze wird im Laubblatt-Stadium 3 lateral der Zellverband zwischen Wurzel und Koleorrhiza aufgelöst. Am zentralen Übergang zwischen beiden Organen bleibt der Gewebeverband erhalten. *ZmNAC5/6* Expression ist dabei hochspezifisch für Zellen der Koleorrhiza (Bild B). In Embryonen des Laubblatt-Stadiums 5 markiert *ZmNAC5/6* Expression jeweils eine mehrere Zellschichten umfassende, kegelförmig zulaufende Domäne zentral unterhalb des Wurzelmeristems (Bild C). Bild D zeigt, dass *ZmNAC5* nach der Keimung in der Kalyptra der Primärwurzel exprimiert wird. Die *ZmNAC5*

Expressionsdomäne liegt dabei angrenzend an das ruhende Zentrum des Wurzelmeristems und markiert die 4-5 obersten Zellschichten inklusive der als Kalyptragen bezeichneten meristematischen Schicht der Wurzelhaube. *ZmNAC6* Transkript hingegen ist weder über *in situ* Hybridisierungen, noch über RT-PCR in der Primärwurzel nachweisbar, wird aber im Gegensatz zu *ZmNAC5* nicht nur in der Koleorrhiza, sondern zum Laubblatt-Stadium 4 auch transient in der embryonalen Vaskulatur exprimiert (nicht gezeigt).

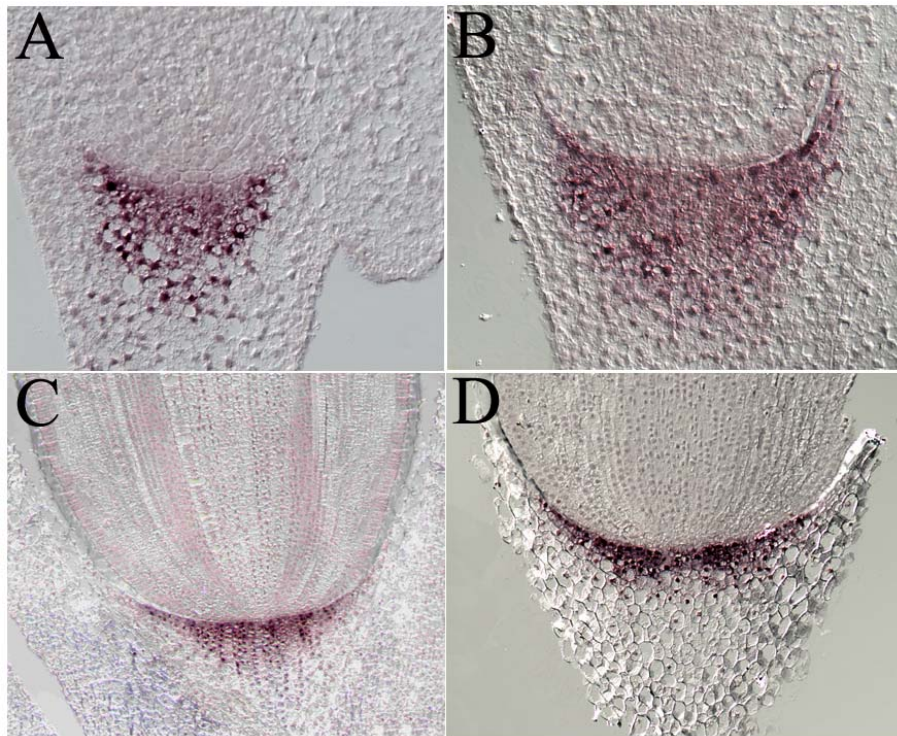


Abb. 14: *ZmNAC5/6* Expressionsmuster zu verschiedenen Laubblatt-Stadien und in der Primärwurzel. **A:** *ZmNAC6* Expression markiert zum Laubblatt-Stadium 1 eine kegelförmige Domäne oberhalb des Suspensors. Entlang der markierten Zellgrenze werden nachfolgend die Zellschichten der prospektiven Wurzel und Koleorrhiza voneinander getrennt (**B**). **C:** Die *ZmNAC5/6* Expressionsdomäne liegt in Embryonen des Laubblatt-Stadiums 5 in dem zentralen Bereich der Koleorrhiza unterhalb des Wurzelmeristems. **D:** *ZmNAC5* wird in der Kalyptra der vegetativen Primärwurzel exprimiert.

3.4.3.4 Wurzel und Koleorrhiza werden über lokale Zellwandauflösung getrennt

Nachfolgend wurde untersucht, auf welche Weise Zellschichten der Wurzel von denen der Koleorrhiza während der Embryogenese getrennt werden. Der Gewebespaß zwischen beiden Organen könnte dabei theoretisch entweder über programmierten Zelltod (Apoptose) oder über eine gezielte, lokale Auflösung der Zellwand gebildet werden. Um den gegebenen Sachverhalt auf eine der beiden Hypothesen hin zu überprüfen, wurde auf longitudinalen Gewebeschnitten durch Embryonen des Laubblatt-Stadiums 1-5 der Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe des „*in situ cell death detection kits*“ durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 15 exemplarisch für Embryonen des Laubblatt-Stadiums 2

und 4 dargestellt. Die Pfeile in beiden Bildern deuten dabei auf apoptotische Zellen. Apoptosis wird verstärkt im Bereich des adaxialen Skutellums an der Grenze zu Koleoptile (A) bzw. Koleorrhiza detektiert (B). Weiterhin lokalisieren apoptotische Zellen auf der abaxialen Seite des Skutellums (A) und im basalen Bereich der Koleorrhiza (B). Es konnte weder vor (Bild A), noch während (Bild B) oder nach Entstehung des Gewebespalts in unmittelbar benachbarten Bereichen zwischen Primärwurzel und Koleorrhiza Apoptosis nachgewiesen werden. Basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten Analysen ergibt sich demnach Evidenz für die Beteiligung apoptotischer Prozesse an der Ausbildung des Spaltes zwischen Wurzel und Koleorrhiza.

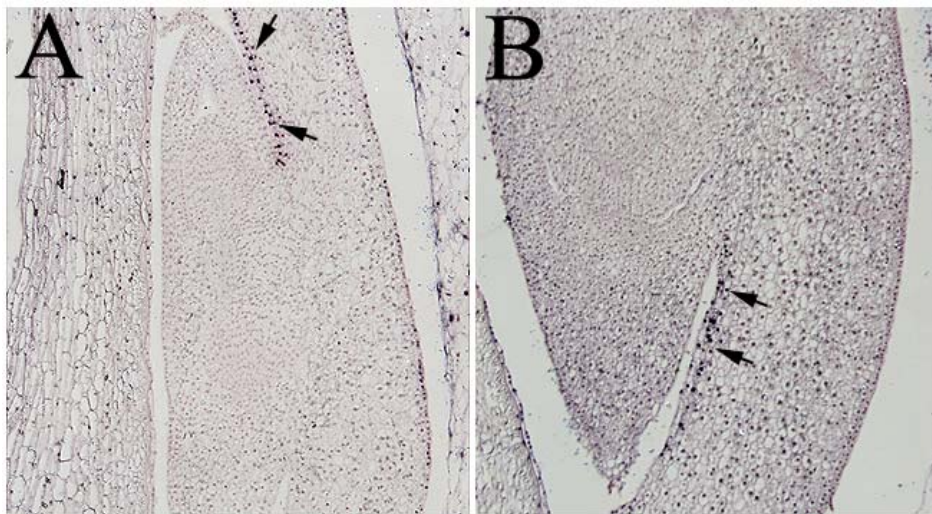


Abb. 15: Nachweis von Apoptose in Embryonen unterschiedlicher Laubblatt-Stadien.

A: In Embryonen des Laubblatt-Stadiums 2 wird Apoptosis sowohl auf der adaxialen Seite der Koleoptile (durch Pfeile markiert) sowie schwächer auf der abaxialen Seite des Skutellums detektiert. Der Gewebespalt zwischen embryonaler Wurzel und Koleorrhiza hat sich noch nicht ausgebildet. **B:** Pfeile in Abbildung B markieren Apoptosis im basalen, adaxialen Bereich des Skutellums angrenzend zur Koleorrhiza. Schwache Signale sind ebenfalls mit dem basalen Bereich der Koleorrhiza aber zu keiner Zeit mit dem zwischen Wurzel und Koleorrhiza ausgebildeten Gewebespalt assoziiert.

3.4.4 Vergleichende Analyse der Expressionsmuster von *Kn1* und *ZmSCR*

Um die räumliche und zeitliche Relation der frühen embryonalen Entwicklung von Spross- und Wurzelmeristem zueinander zu erfassen, wurden in einem weiteren Ansatz die Expressionsmuster von *ZmSCR* und *Kn1* miteinander verglichen. Zusammen mit den durch die Analyse der Expressionsmuster von *ZmNAMI/2*, *ZmCUC3* bzw. *ZmNAC5/6* gewonnenen Erkenntnissen wurde so eine detaillierte und umfassende Übersicht über frühe Regionalisierungsprozesse im Zuge der Spezifizierung der embryonalen Spross-Wurzel Achse in Mais erarbeitet.

3.4.4.1 Die *Kn1* Domäne entsteht lateral verschoben zu der von *ZmSCR*

Im Gegensatz zu *ZmSCR* ist *Kn1* Expression erst zum frühen Transitions-Stadium nachweisbar (Smith et al., 1995; vgl. Bilder A und B in Abb. 16). Der Vergleich der Bilder C und D zeigt, dass die *Kn1* Expressionsdomäne räumlich diskret zu der von *ZmSCR* etabliert wird. Dabei überlappt der adaxiale Teil der *ZmSCR* Domäne in benachbarten Schnitten teilweise mit dem abaxialen Bereich *Kn1*- exprimierender Zellen.

3.4.4.2 *Kn1* Expression grenzt Zellen der embryonalen Achse vom Skutellum ab

Im weiteren Verlauf der Embryogenese weitet sich die *Kn1* Domäne in zentralere Bereiche der Spross-Wurzel Achse aus. Im Koleoptilar-Stadium wird *Kn1* nicht nur in Zellen des SAM, sondern auch in denen der prospektiven embryonalen Vaskulatur exprimiert (Bild E). Dieser basale Teil der *Kn1* Domäne markiert im Vergleich zum apikalen Teil einen diskontinuierlichen Zellverband - Zellen im Bereich des Wurzelmeristems bleiben dabei frei von *Kn1* Transkript. Der untere Teil der *Kn1* Domäne wird von der *ZmSCR* Domäne abgeschlossen (vgl. Bilder E/F).

In Bild A in Abbildung 17 ist der diskontinuierliche Teil der *Kn1* Domäne im Koleoptilar-Stadium nochmals gezeigt. Auf einem benachbarten Schnitt wird *ZmWOX5b* Expression in einem komplementären Muster im Bereich des Wurzelmeristems detektiert (Bild B).

Bild C zeigt das *Kn1* Expressionsmuster auf einem transversalen Schnitt durch den Bereich des Wurzelmeristems eines Embryos vergleichbaren Stadiums. Die korrespondierende Schnittebene ist links neben Bild C schematisch wiedergegeben. Die *Kn1* Domäne markiert hier einen ringförmigen Zellverband, der auf der adaxialen Seite des Embryos bis zur äußersten Zellschicht reicht und abaxial sowie lateral eine klare Grenze zwischen Zellen der embryonalen Achse und denen des Skutellums markiert. Das hierzu korrespondierende *ZmWOX5b* Muster zeigt Bild D. Vergleicht man das auf longitudinalen Schnitten mit dem auf

transversalen Schnitten detektierten Muster, stellt sich der basale Teil der *Kn1* Transkriptionsdomäne im Koleoptilar-Stadium als eine längliche Röhre dar, die apikal im Bereich des Sprossmeristems durch einen kontinuierlichen *Kn1*-Deckel geschlossen wird. Diese nach unten offene Röhre wird von der tassenförmigen *ZmSCR* Domäne begrenzt, an welche sich die *ZmNAC6* Domäne anschließt. Die *ZmWOX5b* Domäne überlappt an ihrer Peripherie mit der *Kn1* Domäne, liegt aber größtenteils innerhalb der *Kn1* Röhre. Zusammen markieren die *Kn1*-, *ZmWOX5b*-, *ZmSCR*- und *ZmNAC5/6* Expressionsdomänen im Koleoptilar-Stadium eine in sich geschlossene Spross-Wurzel Achse.

Dieses Ergebnis wird in Bezug auf die zentrale Stellung von *Kn1* während der Regionalisierung der Spross-Wurzel Achse in den Abschnitten 4.2.3 und 4.2.4 diskutiert werden.

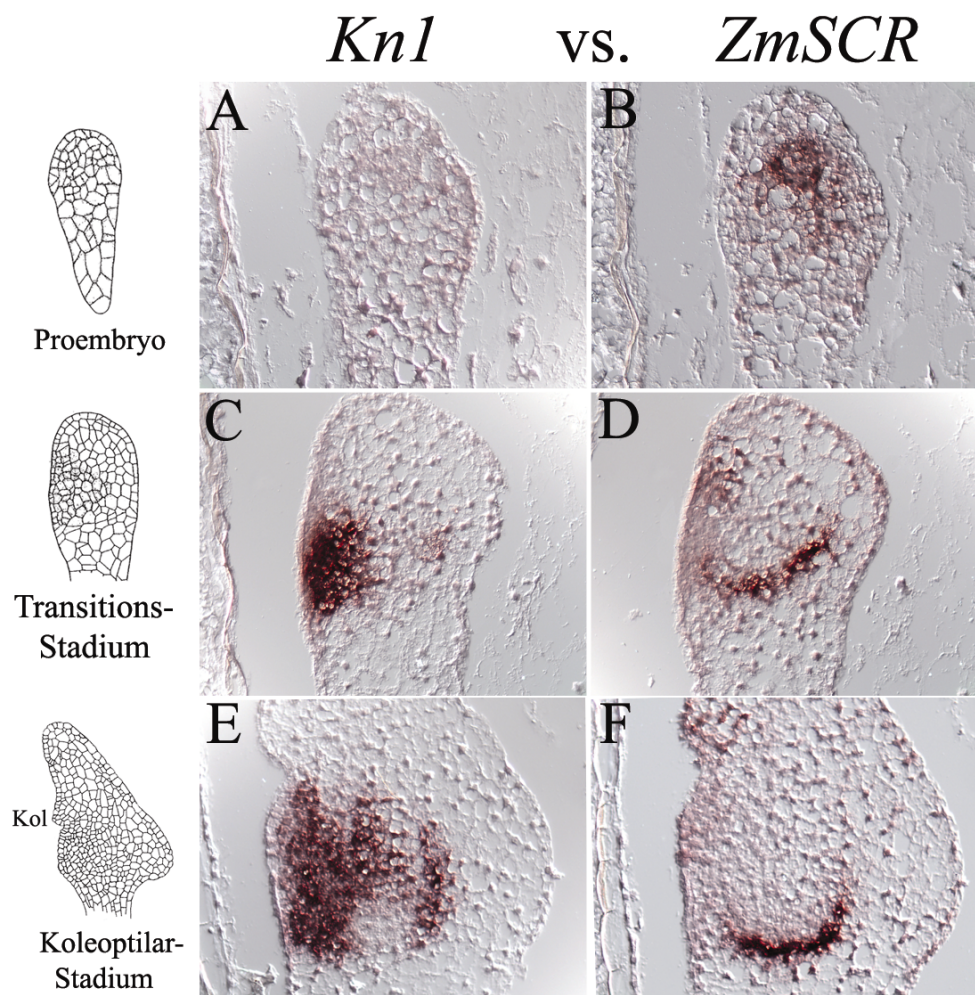


Abb. 16: vergleichende Gegenüberstellung der frühen embryonalen Expressionsmuster von *Kn1* und *ZmSCR*. **A/B:** *Kn1* ist nicht im Proembryo aktiv. Transitions-Stadium: die *Kn1* Domäne entsteht lateral verschoben zur Domäne von *ZmSCR* (C/D). Koleoptilar-Stadium: *Kn1* Expression erstreckt sich auf Zellen der prospektiven Vaskulatur und spart den Bereich des Wurzelmeristems aus. Das basale Ende der *Kn1* Domäne wird von der *ZmSCR* Domäne abgeschlossen (E/F).

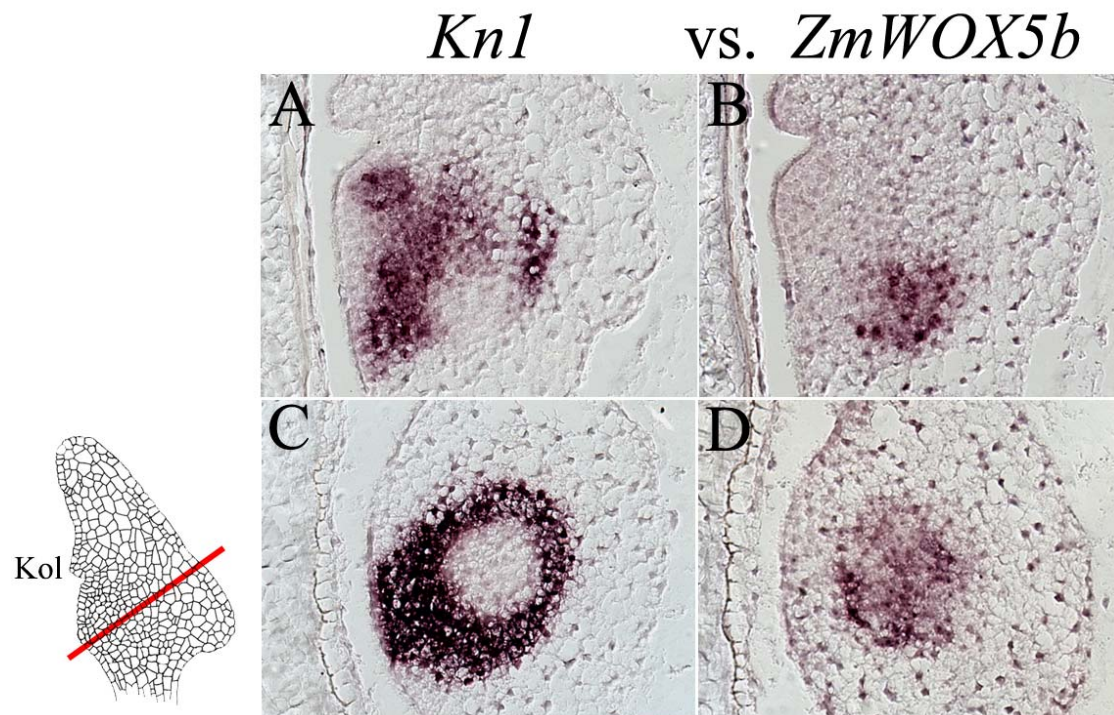


Abb. 17: Vergleich der Expressionsmuster von *Kn1* und *ZmWOX5b* auf benachbarten Schnitten im Koleoptilar-Stadium. **A/B:** *ZmWOX5b* wird komplementär zu *Kn1* im Bereich des Wurzelmeristems exprimiert. **C/D:** *Kn1* Expression markiert auf transversalen Schnitten oberhalb des Wurzelmeristems eine ringförmige Domäne, die Zellen der embryonalen Achse von restlichem Gewebe abgrenzt. *ZmWOX5b* wird im inneren Bereich des *Kn1* Rings und teilweise überlappend dazu exprimiert.

4. Diskussion

Primäres Ziel dieser Doktorarbeit war die Isolierung *PhNAM*-/*AtCUC*-Orthologer aus *Zea mays*. Insgesamt wurden 6 *NAC* Gene isoliert, die hoch Zelltyp-spezifische Transkriptionsmuster während unterschiedlicher Entwicklungsprogramme zeigen. Durch den räumlichen und zeitlichen Vergleich zu Expressionsmustern bekannter molekularer Marker konnten tiefere Erkenntnisse über Musterbildungsprozesse während der SAM Etablierung, der frühen Wurzelentwicklung und darüber hinaus der frühen Regionalisierung der Spross-Wurzel Achse gewonnen werden. Die Resultate dieser Arbeit werden unter phylogenetischen Gesichtspunkten sowie im Vergleich zu Erkenntnissen über die Embryogenese in *Arabidopsis* diskutiert werden. Dadurch soll ein Beitrag zur Aufklärung grundlegender Prinzipien der Angiospermen geleistet werden.

4.1 Phylogenie aus *Zea mays* isolierter *NAC* Sequenzen

4.1.1 *ZmCUC3* und *ZmNAMI/2* repräsentieren konservierte Linien

Zu keinem Zeitpunkt konnten in Datenbanken Maissequenzen anderer Gene als *ZmCUC3* oder *ZmNAMI/2* ermittelt werden, die sich durch höhere Homologiewerte zu *AmCUP*, *AtCUC1-3* oder *PhNAM* auszeichnen. Auch im Reisgenom sind nur ein *AtCUC3*- bzw. ein *PhNAM*-Verwandtes aber keine diskreten *AtCUC1/2*- oder *AmCUP*-Homologe identifizierbar.

Die Genome von Reis und Mais sind durch hohe Syntenie und Genkonservierung charakterisiert (Gale und Devos, 1998; Goff et al., 2002): von 696 bekannten, individuellen Mais-Proteinen werden in Sequenzvergleichen 684 (98%) jeweils eine hoch verwandte Sequenz des Reisgenoms zugeordnet. Die Sequenzidentität zwischen *ZmNAMI* und *OsNAM* innerhalb der *NAC* Domäne liegt beispielsweise bei 92,8%, in Bezug auf die gesamte Länge sind beide Proteine zu 78% identisch. Ähnlich hoch ist die Identität zwischen *ZmCUC3* und *OsCUC3* (94,6% bzw. 73,5%). Ergebnisse für Reis können also durchaus auf das Maisgenom angewendet werden. Dies bedeutet, dass *AtCUC3*- und *PhNAM*-verwandte Genfunktionen vermutlich in beiden monokotylen Spezies diskrete, evolutiv konservierte Linien darstellen. Die gleiche Tendenz zeigt sich in phylogenetischen Rekonstruktionen für dikotyle Vertreter der *AtCUC3/PhNAM* Unterfamilie:

AtCUC3 bildet zusammen mit *ZmCUC3* und *OsCUC3* eine separate Gruppe, alle anderen Mitglieder zeichnen sich durch höchste Homologie zu *PhNAM* aus.

AtCUC2 etwa ist näher verwandt zu *PhNAM* als zu *AtCUC1*. Phylogenetische Beziehungen können dabei durch Ergebnisse von Mutantanalysen bestätigt werden:

nur solche *cuc*-Doppelmutanten, die eine Mutation in *AtCUC2* tragen, sind wie *PhNAM*-Mutanten durch den Verlust der SAM Anlage gekennzeichnet. *cuc1cuc3* Doppelmutanten hingegen bilden ein funktionales SAM aus (siehe Einleitung, Abschnitt 1.3.2). Der in Abbildung 5 gezeigte Stammbaum kann also dahingehend interpretiert werden, dass *AtCUC3* und *PhNAM* in Monokotylen und Dikotylen diskrete, evolutiv konservierte Genfunktionen darstellen.

Möglich ist, dass diese Genfunktionen aufgrund konvergenter Entwicklung unabhängig in beiden Klassen der Angiospermen entstanden sind. Wahrscheinlich existierten jedoch beide Linien bereits vor der Trennung Monokotyler und Dikotyler vor etwa 150 Mio. Jahren (Wikström et al., 2001).

Für andere, ebenfalls in grundlegende Entwicklungsprozesse dikotyler Pflanzen involvierte Genfunktionen konnte gezeigt werden, dass sie auch in evolutiv ursprünglicheren Spezies konserviert sind. Dem *MADS*-Domänen Transkriptionsfaktor *AGAMOUS* kommt beispielsweise eine entscheidende Funktion bei der Spezifizierung reproduktiver Blütenorgane in *Arabidopsis* zu (*AtAG*, Bowman et al., 1989). Ergebnisse von Komplementationsexperimenten unterstützen dabei die Annahme, dass der der Festlegung der Identität reproduktiver Organe (Stamina und Karpelle in Angiospermen bzw. Mikrosporophylle und Megasporophylle in Gymnospermen) zugrunde liegende Mechanismus seit mehr als 300 Mio. Jahren konserviert ist:

Aus Gymnospermen wurden Sequenzen von *MADS*-Box Genen isoliert, deren Proteinsequenz in phylogenetischen Rekonstruktionen als putative Orthologe von *AtAG* klassifiziert wurden (Becker et al., 2000). Für ein *AG*-Orthologes der primitiven Gymnospermen *Cycas endata* (*CyAG*) konnte dabei gezeigt werden, dass die Expression unter Kontrolle des *AG* Promotors den Verlust der *AtAG*-Funktion kompensieren kann (Zhang et al., 2004).

Auch Vertretern der *GRAS* Genfamilie kommen wichtige Funktionen in Dikotylen wie beispielsweise der Initiation von Achselmeristemen (Schumacher et al., 1999; Greb et al., 2003) oder der Erhaltung von Sprossmeristemen (Stuurman et al., 2002) zu. Die Existenz von *GRAS* Genen kann bis zu den Moosen zurückverfolgt werden (Tian et al., 2004).

4.1.2 *ZmNAM1/2* werden wahrscheinlich über miRNAs reguliert

ZmNAM1/2 teilen mit Vertretern der *PhNAM* Gruppe neben der hoch konservierten N-terminalen *NAC* Domäne vier stark sequenzverwandte Motive innerhalb der C-terminalen Domäne. Für *AtCUC1* und *AtCUC2* wurde gezeigt, dass Motiv II eine miRNA Zielsequenz repräsentiert, die über die Interaktion mit der korrespondierenden *AtmiR164a/b* posttranskriptionelle Regulation vermittelt (Mallory et al., 2004; Laufs et al., 2004). Die gleiche miRNA Zielsequenz ist in den Transkripten von *AmCUP* und *PhNAM* vertreten. In Sequenzanalysen konnte ermittelt werden, dass auch in den monokotylen Vertretern *ZmNAM1/2* und *OsNAM* eine ähnliche miRNA Ziel-Sequenz vorhanden ist (Abbildung 18): diese Sequenz unterscheidet sich an 3 Positionen von der 21 Nukleotide langen miRNA Ziel-Sequenz in Vertretern der dikotylen *PhNAM* Untergruppe. Zwei der drei Basenunterschiede bedingen die für monokotyle Vertreter charakteristischen Aminosäure-Substitutionen H→L und S→P innerhalb von Motiv II. Bis auf eine Ausnahme sind jedoch die Ziel-Sequenzen beider Klassen der Angiospermen an Positionen identisch, die sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes neutral in Bezug auf einen Aminosäure Austausch in Motiv II verhalten. Unterschiede zwischen miRNA Ziel-Sequenzen sind also vermutlich primär durch Aminosäure-Substitutionen bedingt, die wichtig für die spezifische Funktion des jeweiligen Proteins innerhalb seiner Spezies sind.

In Übereinstimmung zu Befunden in tierischen Systemen konnte für den HD-ZIPIII-Transkriptionsfaktor *PHABULOSA* (*PHB*, McConnel et al., 2001) gezeigt werden, dass das Einfügen von Punktmutationen in zentralen Bereichen oder am 5'-Ende der korrespondierenden miRNA-Zielsequenz keinen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der *miR165/166*-vermittelten Regulation ausübt. Vielmehr scheinen hierfür Positionen am 3'-Ende von Relevanz zu sein (Mallory et al., 2004).

Die Basenunterschiede zwischen den miRNA-Zielsequenzen monokotyler und dikotyler Vertreter der *PhNAM* Gruppe liegen an zentralen bzw. 5'-gelegenen Positionen und haben somit, unter Berücksichtigung der für *PHB* geschilderten Erkenntnisse, keine maßgebliche Bedeutung für die Paarung zur korrespondierenden miRNA.

Durch Recherchen innerhalb der DDBJ-Datenbank (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) konnten im Reisgenom vier miRNA Vorstufen (*AY551226-AY551229*) identifiziert werden, die für die stark sequenzverwandten miRNAs *OsmiR164c-f* kodieren. Mit *OsmiR164a/b* annotierte miRNAs wurden nicht gefunden. Vermutlich wurde diese Bezeichnung nicht gewählt, um eine Verwechslung mit *miR164a/b* aus *Arabidopsis* zu vermeiden.

OsmiR164c-f unterscheiden sich untereinander an maximal 3 Positionen und von *AtmiR164a/b* an maximal 2 Positionen. *OsmiR164c* und *AtmiR164a/b* sind identisch. Diese Befunde bestätigen die generelle Beobachtung, dass viele der aus *Arabidopsis* isolierten miRNAs in Reis und anderen Spezies konserviert sind (Reinhardt et al., 2002; Bartel und Bartel, 2003; Floyd und Bowman, 2004).

Zusammenfassend deuten die hohen Sequenzverwandtschaften zwischen miRNAs und entsprechenden Zielsequenzen darauf hin, dass die miRNA vermittelte, post-transkriptionelle Genregulation einen gleichermaßen in monokotylen und dikotylen Vertretern der *PhNAM* Gruppe konservierten Mechanismus darstellt. Dieser Aspekt wird in Abschnitt 4.2.1.3 nochmals aufgegriffen werden, wenn das in vegetativen Meristemen detektierte *ZmNAM1* Expressionsmuster diskutiert werden wird.

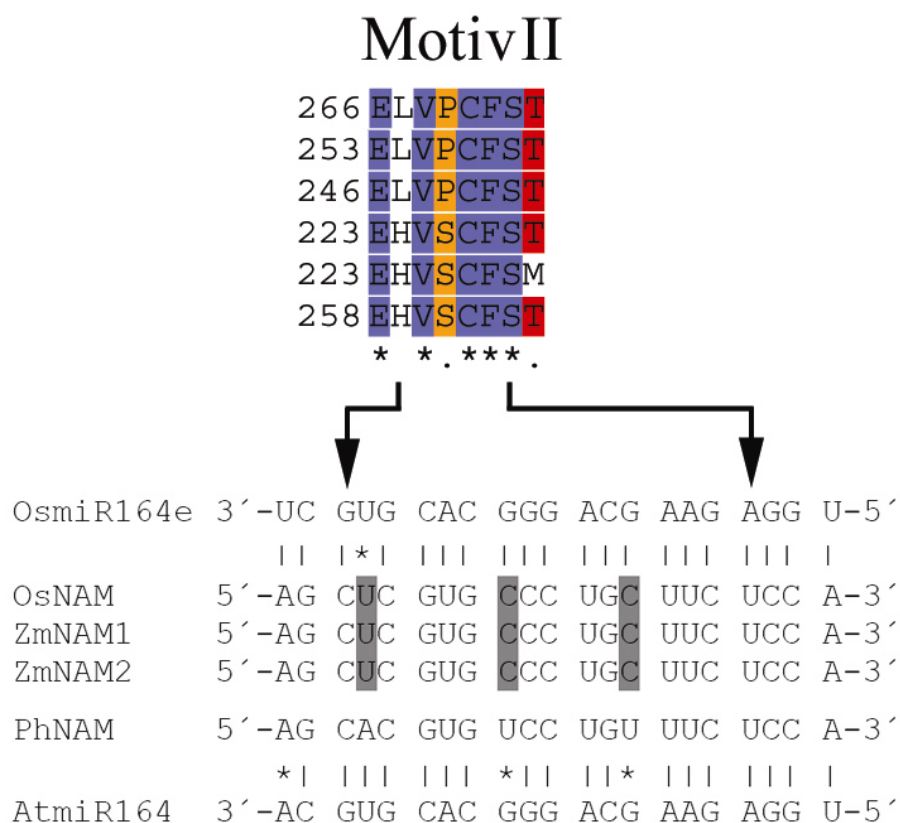


Abb.18: Motiv II repräsentiert eine zwischen monokotylen und dikotylen Vertretern der *PhNAM*-Gruppe konservierte miRNA Zielsequenz. Die miRNA-Zielsequenzen von *OsNAM* und *ZmNAM1/2* sind unterhalb von Motiv II der von *PhNAM* gegenübergestellt. Unterschiede zur Zielsequenz von *PhNAM* sind dabei grau hinterlegt. Exemplarisch ist die Paarung zwischen *OsNAM* zu *OsmiR164e* sowie zwischen *PhNAM* und *AtmiR164a/b* wiedergegeben. Fehlpaarungen sind dabei mit einem Stern gekennzeichnet.

Motive I und II sind nicht nur zwischen *PhNAM*- sondern auch zwischen *AtNAC1*-verwandten Proteinen aus *Arabidopsis* und Reis konserviert (Rhoades et al., 2002; Ooka et al., 2003). Die Überexpression von *AtmiR164a/b* unter Kontrolle des 35S-*CaMV* Promoters führt nicht nur zu einer Reduzierung der Transkript-Abundanz von *AtCUC1/2*, sondern auch von *At5g07680* und *At5g61430*. Für *AtNAC1* selbst konnte ein derartiger Beweis nicht geführt werden (Laufs et al., 2004). *AtNAC1* trägt zur Auxin-vermittelten Bildung lateraler Wurzeln bei (Xie et al., 2000). Ergebnisse von *Northern*-Hybridisierungen belegen, dass *AtmiR164a/b* in Wurzeln exprimiert wird (Mallory et al., 2004). Die Tatsache, dass für *AtNAC1* posttranskriptionelle Regulation nicht nachweisbar ist, erklärt sich also nicht durch fehlende *AtmiR164a/b* Expression in Wurzeln. Denkbar ist, dass die *AtmiR164a/b* vermittelte posttranskriptionelle Kontrolle der *AtNAC1* Genexpression an bestimmte Entwicklungsbedingungen gekoppelt ist, die durch den gewählten experimentellen Ansatz nicht gegeben waren. Alternativ könnte *AtmiR164a/b* reprimierend auf die *AtNAC1* Translation wirken. MiRNA-vermittelte translationale Kontrolle konnte in *Arabidopsis* beispielsweise als wichtige Komponente der Blütenentwicklung identifiziert werden (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004). Obwohl ein entsprechender Nachweis für *AtNAC1* noch aussteht, zeigt sich zusammenfassend, dass in *Arabidopsis* mehrere Zielgene durch *AtmiR164a/b* reguliert werden.

Die Steigerung der Spezifität zwischen *miR165/166* und korrespondierender Ziel-Sequenz hat keinen entscheidenden Effekt auf die Effizienz der Degradierung von *PHB*-Transkript in *Antirrhinum* (Mallory et al., 2004). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass auch bei der Interaktion von *AtmiR164a/b* mit korrespondierenden Ziel-Sequenzen eine gewisse Anzahl von Fehlpaarungen toleriert werden. Generell werden jedoch in Pflanzen scheinbar nicht mehr als maximal 3 Fehlpaarungen zwischen miRNA und Ziel-Sequenz ausgebildet (Rhoades et al., 2002).

In Bezug auf die Sequenz-Spezifität bei der Interaktion zwischen miRNA und Ziel-Sequenz zeichnet sich im Vergleich für *OsNAM* und *ZmNAM1/2* eine andere Tendenz ab (Abb. 18):

OsmiR164e beispielsweise ist bis auf einen Basenaustausch komplementär zur potentiellen Ziel-Sequenz in *OsNAM*. Die miRNA Zielsequenz in *OsNAM* (bzw. *ZmNAM1/2*) ist im Gegensatz zu der dikotyler Vertreter der *PhNAM* Gruppe lediglich durch eine Fehlpaarung (im Vgl. zu 3 Fehlpaarungen) zu *AtmiR164* gekennzeichnet. Monokotyle Vertreter der *PhNAM* Gruppe zeigen also eine höhere Spezifität zu *AtmiR164a/b* als korrespondierende dikotyle Vertreter. Weiterhin stellt Reis mit *OsmiR164c-f* eine hohe Diversität an zu *AtmiR164* verwandter miRNAs.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Vermutung, dass die post-transkriptionelle Regulation *PhNAM*-verwandter Gene in monokotylen Spezies eine höhere Sequenzspezifität zwischen miRNA und Zielsequenz voraussetzt als in Dikotylen. In der Zukunft wird es daher interessant sein zu sehen, inwiefern sich die Hypothese durch experimentelle Daten bestätigen lässt. Unter der Annahme, dass der Mechanismus der miRNA-vermittelten Regulation *PhNAM*-verwandter Gene evolutiv konserviert ist, stellt sich ferner die Frage, ob die für Monokotyle oder eher die für Dikotyle beobachtete Tendenz repräsentativ für ursprünglichere Pflanzen ist? Evtl. hat sich die Toleranz gegenüber Fehlpaarungen zwischen Ziel-Sequenz und miRNA lediglich in der dikotylen *PhNAM* Untergruppe ausgeprägt.

Im Gegensatz zu Vertretern der *PhNAM* Gruppe werden *AtCUC3*-verwandte Gene vermutlich nicht über miRNAs reguliert: weder für *AtCUC3* noch für *OsCUC3* oder *ZmCUC3* konnte eine potentielle miRNA und/oder entsprechende Zielsequenz identifiziert werden.

Mitglieder der *PhNAM* Gruppe grenzen sich klar durch den Besitz von Motiv III und/oder IV von *AtNAC1*-verwandten Proteinen ab (Abbildung 6B, Seite 43). Beide Motive sind stark konserviert zwischen *OsNAM*, *ZmNAM1/2* und *PhNAM*. Dieser Befund bestätigt die hohe Sequenzverwandtschaft innerhalb der *NAC* Domänen dieser Proteine. In *AtCUC1* sind Motive I und III nur schwach konserviert während Motiv IV fehlt. Dementsprechend weist *AtCUC1* innerhalb der dikotylen *PhNAM* Untergruppe die geringste Homologie zur *NAC* Domäne von *PhNAM* auf. *AtCUC1* wurde also wahrscheinlich wesentlich früher als *AtCUC2* von der dikotylen *PhNAM*-Linie getrennt. In *AmCUP* ist Motiv IV ebenfalls nicht vertreten. Hier zeigt jedoch die hohe Sequenzverwandtschaft innerhalb der *NAC* Domänen die enge Gruppierung zu *PhNAM* auf.

4.2 Charakterisierung embryonaler *NAC* Genexpressionsmuster

4.2.1 Etablierung des apikalen Sprossmeristems

4.2.1.1 *ZmCUC3*- und *ZmNAM1/2* Muster bestätigen phylogenetische Vorhersagen

ZmCUC3 und *ZmNAM1/2* werden unterschiedlichen Gruppen der *AtCUC3/PhNAM* Unterfamilie zugeordnet. Diese Tatsache bestätigt sich durch einen Vergleich der entsprechenden Transkriptionsmuster:

ZmCUC3 Aktivität ist sowohl während embryonaler, vegetativer als auch reproduktiver Entwicklung stets mit der Grenze zwischen Meristemen und nachfolgend angelegten Primordien assoziiert. Darüber hinaus bleibt Expression zwischen auswachsenden lateralen Organen erhalten. *ZmCUC3*-Transkript ist zu keinem Zeitpunkt innerhalb von Meristemen nachweisbar. Diese Eigenschaften sind gleichermaßen kennzeichnend für *AtCUC3* (Vroemen et al., 2003).

Das *ZmNAM1* Expressionsmuster kann klar vom *ZmCUC3*-Muster unterschieden werden:

Während der Embryogenese ist *ZmNAM1* Expression im Gegensatz zu *ZmCUC3* innerhalb des SAM detektierbar. Im Transitions-Stadium wird *ZmNAM1* dabei hauptsächlich in der L1 exprimiert, wobei *Kn1*-Expression in einem hierzu komplementären Muster in tiefergelegenen Zellschichten des SAM nachweisbar ist. Auch im Koleoptilar-Stadium sind Transkriptionsdomänen komplementär organisiert: die *ZmNAM1*-Domäne markiert hier zusammen mit der von *ZmNAM2* und *ZmCUC3* einen Ring von Zellen um das SAM, während *Kn1* in Zellschichten innerhalb dieses Rings transkribiert wird. Wie im Embryo ist *ZmNAM1/2* Expression auch während der reproduktiven Phase im Gegensatz zu *ZmCUC3* nicht oder nur sehr schwach zwischen auswachsenden lateralen Organen nachweisbar.

Eine Parallele zur komplementären Organisation der Expressionsmuster von *ZmNAM1* und *Kn1* zeigt sich in der Beziehung der späten embryonalen Transkriptionsmuster von *CUC2* als dem nächsten *PhNAM*-Verwandten aus *Arabidopsis* und *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*, Long et al., 1996) als dem funktionalen *Kn1*-Orthologen:

vom mittleren globulären bis zum späten Herz-Stadium werden *AtCUC2* und *STM* in medianen, longitudinalen Schnitten in überlappenden Expressionsdomänen detektiert. *STM* ist dabei im Gegensatz zu *Kn1* auch in der äußersten Zellschicht nachweisbar (Long et al., 1996). Im späten Torpedo-Stadium richten sich Transkriptionsdomänen dann ebenfalls komplementär zueinander aus, wobei analog zur Situation in Mais *AtCUC2* ringförmig um die *STM*-Domäne exprimiert wird (Aida et al.1999).

Die hohe Sequenzhomologie deutet in Konsistenz mit den auffälligen Gemeinsamkeiten in den Expressionsmustern darauf hin, dass *ZmCUC3* und *ZmNAMI/2* auf ähnliche Weise wie ihre nächsten Verwandten aus *Arabidopsis* und *Petunia* zu Organseparation und Meristeminitiation in Mais beitragen. *ZmCUC3* und *ZmNAMI/2* können demnach als ortholog zu *AtCUC3* und *PhNAM* betrachtet werden.

Die zeitliche Relation der frühen Expressionsmuster von *ZmNAMI* und *Kn1* zeigt dabei im Vergleich zu *AtCUC2* und *STM* signifikante Unterschiede auf, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.2.1.2 Die Initiation des SAM erfolgt unterschiedlich in Mais und *Arabidopsis*

AtCUC3 Expression ist bereits in den oberen 4 Zellen des Oktant-Embryos nachweisbar. Ab dem mittleren globulären Stadium wird *AtCUC3* zusammen mit *AtCUC1/2* streifenförmig in einer zentralen Region des apikalen *Arabidopsis* Embryos exprimiert, in der nachfolgend *STM* aktiviert wird (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2003, siehe Abb. 19A). Dabei ist frühe *STM* Aktivität abhängig von der Expression der *AtCUC* Gene (siehe Einleitung, Abschnitt 1.3.2). Vermutlich wird durch frühe Expression von *AtCUC1-3* eine Domäne schwach proliferierender Zellen gegründet, die eine geeignete Nische für die nachfolgende Etablierung des SAM darstellt (Vroemen et al., 2003). Auf diese Weise tragen die *AtCUC* Gene wahrscheinlich gleichzeitig zur Etablierung der bilateralen Symmetrie des *Arabidopsis* Embryos bei. Zellen des SAM werden also innerhalb eines Feldes *AtCUC1-3* exprimierender Zellen angelegt und müssen somit gleichzeitig von diesen abgegrenzt werden. In *Arabidopsis* erfolgt demnach die Initiation des SAM simultan zur Spezifizierung seiner äußeren Grenzen. Dementsprechend bleibt im Torpedo-Stadium *STM* Aktivität zentral zwischen den Kotyledonen erhalten, während sich die Expressionsdomänen der *AtCUC* Gene flankierend zur *STM*-Domäne ausrichten. Genetische und molekulare Analysen demonstrieren, dass dies auf *STM*-abhängige Weise geschieht (Aida et al., 1997; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996; Long und Barton, 1998).

Im Gegensatz zur bilateralen Symmetrie des *Arabidopsis* Embryos, bildet der Maisembryo während des frühen Transitions-Stadiums eine adaxial/abaxiale Polarität aus, die durch das Auswachsen des Skutellums an abaxialer Seite eingeleitet wird (Randolph, 1936). Einhergehend wird das SAM nicht in apiko-zentraler Lage wie in *Arabidopsis*, sondern an lateraler Position auf der dem Skutellum gegenüberliegenden, adaxialen Seite des Maisembryos angelegt (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1). Dies spiegelt sich auch in den Expressionsmustern von *ZmNAMI/2* und *ZmCUC3* wieder, die in enger Beziehung zum dem

von *Kn1* stehen. Ein wesentlicher Unterschied zu den *CUC* Genen und *STM* aus *Arabidopsis* stellt dabei die zeitliche Abfolge der Genaktivierung dar (Abb. 19B):

ZmNAM1 wird nicht vor, sondern zeitgleich mit *Kn1* aktiviert. Frühe *ZmNAM1* Expression im Transitions-Stadium lokalisiert dabei oberhalb der *Kn1*-Domäne auf der adaxialen Seite des Embryo *propers* (a). Im weiteren Verlauf weiten sich beide Transkriptionsdomänen in tieferliegende Regionen des Embryos aus, in denen dann *ZmCUC3* aktiviert wird (b). Frühe *ZmCUC3* Expression markiert im Vergleich zu *ZmNAM1* einen entsprechend weiter basal gelegenen Bereich des adaxialen Embryos. Im Koleoptilar-Stadium ist ringförmige *ZmNAM1* Expression am deutlichsten zwischen oberer Grenze des SAM und Koleoptile ausgeprägt, während ringförmige *ZmCUC3* Expression stärker an der basalen Flanke des SAM nachweisbar ist (c). Der Vergleich der frühen mit den späten *ZmNAM1* bzw. *ZmCUC3* Expressionsmustern deutet in Abgleich zum Transkriptionsmuster von *Kn1* darauf hin, dass in Mais zuerst die apikale Grenze zwischen SAM und prospektiver Koleoptile und danach die basale Grenze zwischen SAM und prospektivem erstem Blattprimordium festgelegt wird. Demnach werden, im Gegensatz zu *Arabidopsis*, die Grenzen des SAM in Mais nicht gleichzeitig sondern nacheinander definiert.

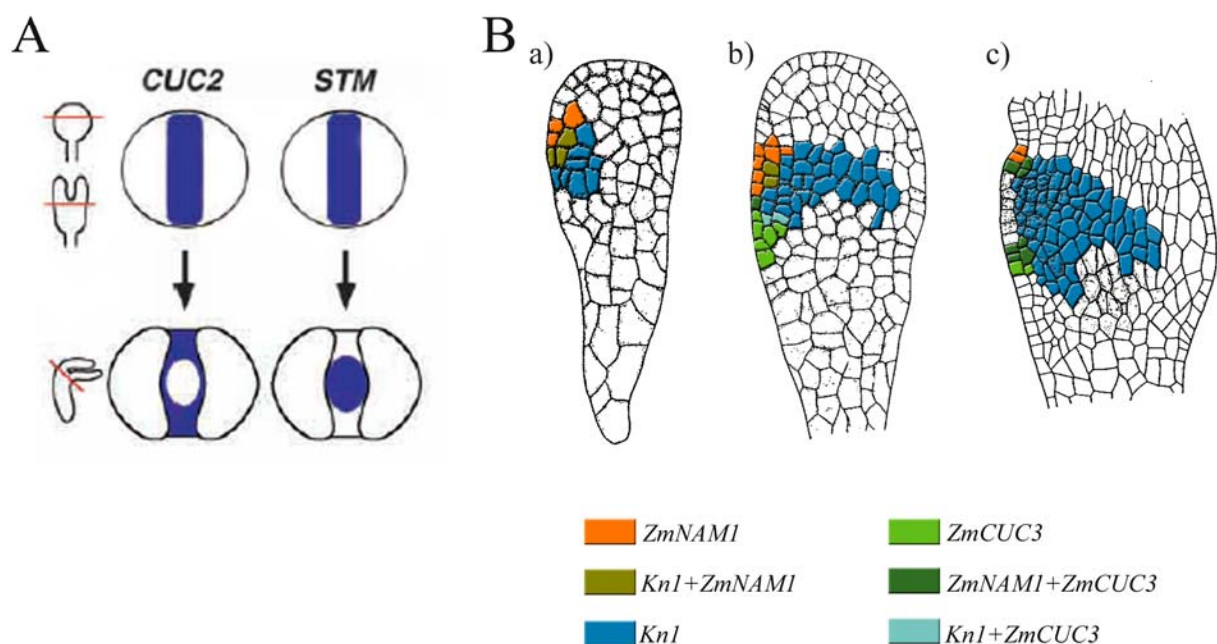


Abb. 19 A: schematische Übersicht über die räumliche Beziehung der Expressionsdomänen von *AtCUC2* und *STM* im globulären-, Herz- und Torpedo-Stadium zueinander (Aufsicht, nach Aida et al., 1999). B: SAM-Etablierung in *Zea mays*. Der Farbcode gibt zelluläre Identitäten im a) frühen Transitions-Stadium, b) spätem Transitions-Stadium und c) frühen Koleoptilar-Stadium an (modifiziert nach Randolph, 1936).

4.2.1.3 *ZmNAM1* trägt zur Spezifizierung primordialer Zellidentität bei

In *Arabidopsis* hat die Repression der *miR164a/b*-Funktion in der Peripherie des vegetativen SAM entscheidenden Einfluss auf die Blattentwicklung (Laufs et al., 2004). In dem entsprechenden Versuchsansatz wurde eine gegen die Degradierung durch *Atmir164a/b* resistente Form der *AtCUC2* mRNA unter Kontrolle von regulatorischen Elementen des *STM*-Promotors in peripheren Zellen des SAM exprimiert. Transgene Keimlinge zeigten im weiteren Entwicklungsverlauf unterschiedliche Phänotypen: Blätter wurden entweder nicht angelegt, waren asymmetrisch zueinander ausgerichtet oder wiesen ein stark retardiertes Wachstum auf. In *Arabidopsis* wird also die korrekte Anlage von Blättern maßgeblich über die *AtmiR164a/b*-vermittelte Degradierung von *AtCUC2* Transkript an der Peripherie des SAM gewährleistet.

In Mais wird *ZmNAM1* Expression auf transversalen Schnitten durch junge Sprosse sichelförmig zwischen der Basis des vegetativen SAM und anliegendem Blattprimordium P1 detektiert (siehe Abb. 10, Bild F auf Seite 53). Darüber hinaus bleibt Aktivität in der adaxialen L1 oberhalb der Blattbasis von P2-P4 erhalten. *ZmNAM1* weist außerdem eine zu *AtCUC2* stark sequenzverwandte miRNA-Zielsequenz auf. Diese Beobachtungen deuten im Abgleich zu den Erkenntnissen über die Funktion von *miR164a/b* in *Arabidopsis* darauf hin, dass *ZmNAM1* in Mais zur Spezifizierung adaxialer Zellidentität angelegter Blattprimordien beiträgt. Demzufolge wird die Grenze zwischen SAM und Blattprimordium dadurch festgelegt, dass *ZmNAM1* Expression miRNA-vermittelt an der Peripherie des SAM herunterreguliert wird, jedoch in der adaxialen L1 des Blattprimordiums erhalten bleibt.

4.2.2 Anlage der embryonalen Wurzel

4.2.2.1 Zellen des Wurzelmeristems werden vor denen des SAM angelegt

Frühe *ZmSCR* Expression ist im Gegensatz zu *Kn1* bereits im Proembryo nachweisbar. Die scheitelförmige *ZmSCR* Transkriptionsdomäne ist zentral im Embryo *proper* ausgerichtet und überlappt mit der punktförmigen Expressionsdomäne von *ZmWOX5b*. Lage und Form beider Domänen spiegeln die radiäre Symmetrie des Proembryos wieder. Wie *ZmWOX5b* markiert auch *ZmSCR* zelluläre Identität des ruhenden Zentrums. Die zeitliche Relation der Expressionsmuster dieser Marker zu dem von *Kn1* deutet darauf hin, dass im Maisembryo Zellen des Wurzelmeristems vor denen des SAM spezifiziert werden.

In *Arabidopsis* konnten durch Untersuchungen zur Ausbildung von Auxin-Konzentrationsgradienten neuere Erkenntnisse über die zeitliche Steuerung von Entwicklungsprozessen im frühen Embryo gewonnen werden (Friml et al., 2003). Auxin-Konzentrationen können innerhalb einer Pflanze durch Verwendung eines synthetischen DR5-Promoters fusioniert mit einem GUS- oder GFP-Reporter gen perzeptiert und dargestellt werden (Li et al., 1999; Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2000; Rashotte et al., 2000; Friml et al., 2002). Durch Verwendung entsprechender Konstrukte in molekularen Analysen (Gälweiler et al., 1998; Müller et al., 1998; Friml et al., 2002; Friml et al., 2003) wurde gezeigt, dass die über *PIN*-Proteine vermittelte Etablierung von Auxin-Gradienten ein allgemeines Prinzip der Organogenese in *Arabidopsis* darstellt (Benková et al., 2003). Dabei kann polarer Auxin-Transport bereits früh im *Arabidopsis* Embryo nachgewiesen werden:

nach der zygotischen Teilung wird Auxin *PIN7*-vermittelt zum apikalen Pol des *Arabidopsis* Embryos transportiert. Im 32 Zell-Stadium wird die Transportrichtung revertiert, wodurch Auxin auf *PIN1/PIN4*-abhängige Weise in der Hypophyse akkumuliert. Aus der Hypophyse gehen das ruhende Zentrum des Wurzelmeristems und die Initialen der Kolumella hervor (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1). In *Arabidopsis* wird demnach im Gegensatz zu Mais die Organogenese des Embryo *propers* (und somit des SAM) vor der des Wurzelmeristems eingeleitet.

4.2.2.1 *ZmNAC5/6* Expression markiert apikal/basale Polarität des Wurzelmeristems

Im frühen Transitions-Stadium wird *ZmNAC6* und kurz danach *ZmNAC5* aktiviert. *ZmNAC5/6* Expression markiert zelluläre Identität der Koleorrhiza/Wurzelhaube:

beide Gene werden während der Embryogenese in enger Assoziation zur Koleorrhiza exprimiert, *ZmNAC5* Expression persistiert in den 4-5 obersten Zellschichten der Wurzelhaube zentral unterhalb des Meristems der Primärwurzel. In Mais wird die Wurzelhaube demnach bereits früh während der Embryogenese zentral innerhalb des Embryos angelegt. Diese Vermutung bestätigt sich auch durch einen räumlichen Vergleich zum Expressionsmuster von *ZmSCR*:

Die *ZmNAC5/6* Transkriptionsdomäne weist aufgrund ihrer tassenförmigen Gestalt ebenfalls radiärsymmetrische Organisation auf und liegt unterhalb der *ZmSCR*-Domäne am zentralen Übergang zum Suspensor. Der Vergleich mit einem späteren Stadium belegt, dass die *ZmNAC5/6* Expressionsdomäne dabei in Orientierung und Gestalt stets zur *ZmSCR*-Domäne ausgerichtet ist. Die relative Lage beider Expressionsdomänen zueinander zeigt klar apikal-

basale Polarität des Wurzelmeristems auf. *ZmSCR* kommt vermutlich eine entscheidende Funktion bei der Etablierung der radiären Organisation der Wurzel zu (siehe Abschnitt 1.2.3). Lage und Ausrichtung der *ZmSCR*- und *ZmNAC5/6* Expressionsdomänen deuten darauf hin, dass die Wurzelhaube über *ZmSCR*-vermittelte zentro-radiäre Positionsinformation spezifiziert wird. Dies bedeutet wiederum, dass in Mais das Wurzelmeristem wahrscheinlich bereits während der Embryogenese aktiv ist.

ZmNAC5 und *ZmNAC6* sind hochverwandt zu *OsNAC7* aus Reis, für welches über RT-PCR Expression in Embryonen nachgewiesen werden konnte (Kikuchi et al., 2000). Evtl. wird auch in Reis die Wurzelhaube bereits embryonal angelegt.

In *Arabidopsis* wird die Kalyptra im Zuge der Keimung von den entsprechenden Initialen am apikalen Pol des Wurzelmeristems ausgebildet. Die Kalyptra-Initialen gehen aus der Hypophyse hervor. Der Kontakt zwischen Hypophyse und Embryo *proper* bzw. Suspensor wird dabei im Gegensatz zu Mais über einzelne Zellkontakte hergestellt.

4.2.2.2 Koleorrhiza und Wurzelhaube werden über lokale Zellwandauflösung getrennt

ZmNAC5/6 Expression markiert zum Laubblatt-Stadium 1 die Grenze, entlang derer Zellschichten von Wurzel und Koleorrhiza voneinander getrennt werden. Dieser Prozess wird wahrscheinlich nicht über Apoptose, sondern über lokale Auflösung der Zellwand in lateralen Bereichen von Wurzel und Koleorrhiza gewährleistet. Am zentralen Übergang bleibt dabei die Verbindung zwischen beiden Organen erhalten. Im Zuge der massiven Zellexpansion während der Keimung werden diese lateralen Bereiche aufgelöst und die keimende Wurzel samt Haube aus dem umgebenden embryonalen Gewebe freigegeben.

4.2.3 Die *Kn1* Domäne besitzt eine zentrale Stellung innerhalb der Spross-Wurzel Achse

Aus dem Vergleich der *Kn1*- und *ZmSCR* Expressionsdomänen im frühen Transitions-Stadium geht hervor, dass die *Kn1* Domäne seitlich verschoben zu der von *ZmSCR* angelegt wird. Der Vergleich der Expressionsmuster dieser Marker deutet also darauf hin, dass die beiden apikalen Meristeme ursprünglich nicht aus einer gemeinsamen Zellgruppe hervorgehen.

Zum Ende des Transitions-Stadiums erstreckt sich die *Kn1* Domäne in weiter zentral gelegene Bereiche des Embryos. Im frühen Koleoptilar-Stadium kann die *Kn1* Transkriptionsdomäne dann klar in eine apikale, kontinuierliche Teildomäne im Bereich des SAM und eine röhrenförmige Teildomäne im Bereich des Hypokotyls oberhalb des Wurzelmeristems unterschieden werden. Der unteren Teildomäne kommt dabei eine zentrale

Stellung zu, da sie ein röhrenförmiges Verbindungsglied zwischen der oberen *Kn1* Teildomäne und der am unteren Ende angrenzenden tassenförmigen *ZmSCR* Domäne schafft. Lage und Orientierung der späteren Spross-Wurzel Achse werden von der *Kn1* Domäne somit bereits im späten Transitions-Stadium vorgegeben. Der basale Teil stellt dabei im Bereich des Hypokotyls eine klare Grenze zu Zellen des abaxialen Skutellums.

4.2.4 Die Spross-Wurzel Achse wird als Subgruppe des Embryos spezifiziert

Bereits im frühen Transitions-Stadium ist die Spross-Wurzel Achse in Mais in diskrete Bereiche unterschiedlicher zellulärer Identität regionalisiert. Im späten Transitions-Stadium liegt die Expressionsdomäne von *ZmWOX5b* innerhalb der *Kn1*-Röhre, basal schließen sich die Domänen von *ZmSCR* und *ZmNAC5/6* an. Zusammen markieren alle 4 Domänen im frühen Koleoptilar-Stadium innerhalb des Embryos eine in sich geschlossene, nach aussen hin klar definierte Spross-Wurzel Achse, die im Wurzelbereich radiäre Organisation aufweist. Durch den basalen Teil der *Kn1* Domäne werden dabei Zellen der Spross-Wurzel Achse von denen des abaxialen Skutellums abgegrenzt. Die *ZmNAC5/6* Expressionsdomänen markieren die Grenze zum Suspensor.

Anders als in *Arabidopsis* wird somit in Mais die Spross-Wurzel Achse als diskrete Subgruppe des Embryos spezifiziert. Erst im weiteren Verlauf wird die embryonale Achse vom Skutellum getrennt, wobei zentral im Bereich des Hypokotyls beide Organe miteinander verbunden bleiben. Aus Abbildung 15 auf Seite 59 ergibt sich die Vermutung, dass dieser Prozess über Apoptosis gesteuert wird. In *Arabidopsis* wird bereits durch frühe Zellteilungen die Grundorganisation des Embryos festgelegt. Hier tragen alle Zellen des Embryos zur Entwicklung von Kotyledonen, SAM, Hypokotyl und Wurzel bei (siehe Abb. 1, Seite 2). Der Embryo wird hier lediglich zum Suspensor hin abgegrenzt.

Zelluläre Identitäten während früher Stadien der Maisembryogenese sind in Abbildung 20 nochmals zusammenfassend dargestellt.

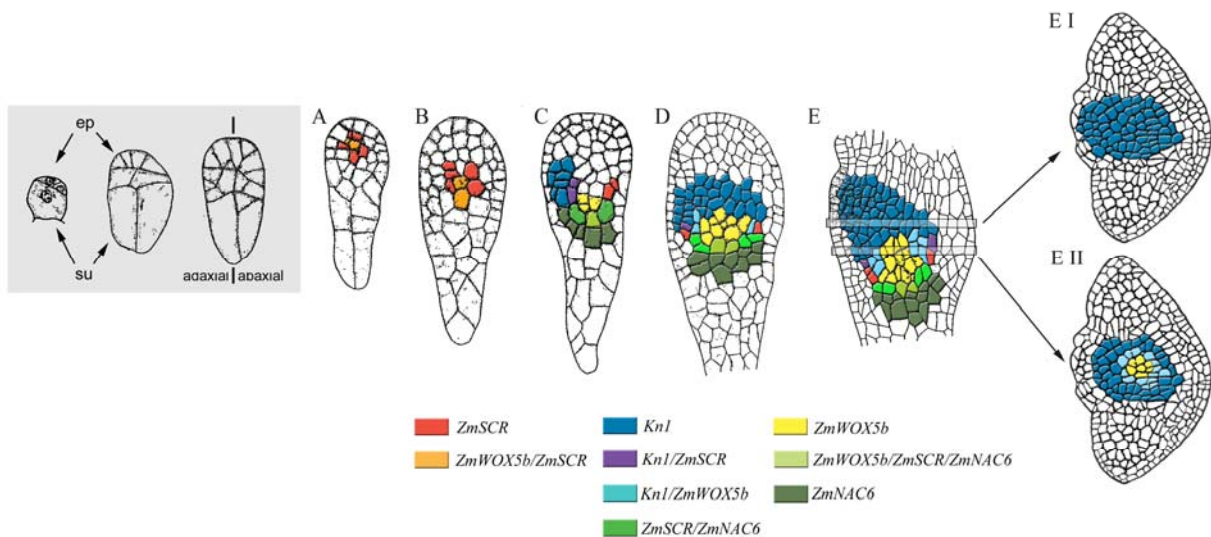


Abb. 20: zelluläre Identitäten im frühen Embryo bzw. der frühen Spross-Wurzel Achse (modifiziert nach Randolph, 1936). **A:** früher Proembryo, **B:** später Proembryo, **C:** frühes Transitions-Stadium, **D:** spätes Transitions-Stadium, **E:** frühes Koleoptilar-Stadium. Die beiden transversalen Ebenen **E I** und **E II** zeigen den homogenen, apikalen Teil der *Kn1* Domäne sowie den röhrenförmigen basalen Teil im Hypokotyl-Wurzel Bereich. Der Farbcode gibt einzelne bzw. gemeinsame zelluläre Identitäten innerhalb des Embryos an.

4.3 Ausblick

Durch die Charakterisierung von *NAC* Genexpressionsmustern konnten insgesamt vielseitige und neue Erkenntnisse über Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Musterbildung im Maisembryo im Vergleich zu *Arabidopsis* gewonnen werden.

Weiterführende Arbeiten könnten den Übergang von der beschreibenden zu einer funktionalen Analytik stellen. In Zusammenarbeit mit Biogemma (Aubière, Frankreich) wurde bereits mit der Sichtung von Kollektionen Transposon-induzierter Mutanten nach potentiellen Insertionsereignissen innerhalb charakterisierter *NAC* Sequenzen begonnen. Durch die phänotypische Analyse korrespondierender Mutanten könnten die Erkenntnisse über den Beitrag isolierter *NAC* Gene zur Maisentwicklung vertieft werden. Evtl. ergeben sich bereits konkrete Hinweise auf die *ZmCUC3*-Funktion aus der Analyse des embryonalen Transkriptionsmusters in *adherent leaf*-Mutanten.

Neben der Mutanten-Analyse könnte die Analyse der Auxin-Verteilung im Maisembryo mittels anti-Auxin Antikörpern im Vergleich zu etablierten *NAC*-Genexpressionsmustern Aufschlüsse darüber geben, inwiefern ein Zusammenhang zwischen der Etablierung der adaxialen/abaxialen Polarität und der Errichtung von Auxin-Gradienten im Maisembryo besteht.

5. Zusammenfassung

Im Vergleich zu *Arabidopsis* ist der Kenntnisstand über die Musterbildung im Maisembryo rudimentär und beruht hauptsächlich auf histologischen Studien. Essentiell für die postembryonale Entwicklung ist die Anlage der beiden apikalen Meristeme im Embryo. Im Gegensatz zu *Arabidopsis* wird in *Zea mays* das sprossapikale Meristem (SAM) nicht an apiko-zentraler, sondern an lateraler Position auf der adaxialen, dem Skutellum gegenüberliegenden Seite des Embryos angelegt. In dikotylen Spezies konnten Mitglieder der konservierten *NAC* Genfamilie wie *NO APICAL MERISTEM* aus *Petunia* (*PhNAM*) oder die *CUP-SHAPED COTYLEDON* Gene aus *Arabidopsis* (*AtCUC1-3*) als essentiell für die Initiation des SAM und Organseparation identifiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung putativer *PhNAM/AtCUC*-Orthologer als molekulare Marker für die Visualisierung von Musterbildungsprozessen, die der SAM-Initiation in Mais zugrunde liegen, angestrebt. Basierend auf Sequenzhomologien wurden 6 *NAC* Gene isoliert und phylogenetisch klassifiziert. Darüber hinaus wurden korrespondierende Kartierungspositionen im Maisgenom bestimmt.

ZmCUC3 und die potentiellen Paraloge *ZmNAM1/2* zeigen höchste Homologie zu *AtCUC3* bzw. *PhNAM*, welche in Monokotylen wie Dikotylen diskrete, evolutiv konservierte Genfunktionen darstellen. Dabei werden *ZmNAM1/2* wie *AtCUC1/2* vermutlich über miRNAs reguliert. Die hohe Sequenzverwandtschaft deutet in Kombination mit den auffälligen Gemeinsamkeiten in den Expressionsmustern darauf hin, dass *ZmNAM1/2* und *ZmCUC3* wie ihre nächsten dikotylen Verwandten zu SAM Initiation und Organseparation in *Zea mays* beitragen.

ZmNAC4 und die potentiellen Paraloge *ZmNAC5/6* werden in phylogenetischen Rekonstruktionen bisher weitestgehend unbekanntem Vertretern zugeordnet. *ZmNAC4* stellt einen frühen und selektiven Marker für die Spezifizierung von Endosperm-Zellschicksal dar. *ZmNAC5/6* sind eng mit der Entstehung der Koleorrhiza bzw. Wurzelhaube assoziiert. Durch die Analyse des *ZmSCR*-Transkriptionsmusters in räumlicher und zeitlicher Relation zu dem von *Kn1* bzw. *ZmNAC5/6* ergeben sich weiterhin folgende Erkenntnisse über die Musterbildung im Maisembryo:

1. Zellen des Wurzelmeristems werden räumlich und zeitlich diskret von denen des SAM spezifiziert.
2. Die Kalyptra wird bereits embryonal als Teil der Koleorrhiza angelegt.

3. Die Spross-Wurzelachse wird im Embryo als diskrete Subgruppe von Zellen des basalen Suspensors bzw. Skutellums abgegrenzt - *Kn1* kommt dabei eine zentrale Stellung zu.
4. Der Gewebespalt zwischen lateralen Bereichen von Wurzel und Koleorrhiza wird über lokale Zellwandauflösung errichtet.

6. Abstract

All aerial parts of a higher plant originate from the shoot apical meristem (SAM) which is initiated during embryogenesis as part of the basic body plan. In contrast to dicot species, the SAM in *Zea mays* is not established in a central but in a lateral position of the root-shoot axis in distance to the single cotyledon (scutellum). Genetic and molecular studies in dicots have revealed that members of the *NAC* gene family of plant-specific transcription factors have crucial functions in the initiation of the SAM: mutations in the *NO APICAL MERISTEM* gene (*PhNAM*) from *Petunia* result in seedlings which lack a SAM and show fusion of cotyledons to a cup-shaped structure. For the orthologous *CUP-SHAPED-COTYLEDON* genes (*AtCUC1-3*) from *Arabidopsis*, initial expression in the globular embryo has been shown to mark the region where the SAM will form between the two cotyledons. At later stages, transcripts become confined to the boundary between the cotyledon margins and the SAM. The *CUC* genes have been proposed to confer formation of organ boundaries which is assumed to be a prerequisite for the establishment and/or maintenance of the SAM.

As an approach to understand how meristem formation is accomplished in an evolutionary distant monocot species, several highly related genes of the maize *NAC* family were isolated and characterized. All genes exhibit highly cell type-specific expression patterns. Phylogenetic data and cellular expression patterns for *ZmCUC3* and the potential paralogues *ZmNAM1/2* provide evidence for the conservation of distinct *NAM*- and *CUC3*-like functions in monocot and dicot species and give clues to a different mode of SAM establishment. Whereas *ZmNAC4* represents an early and selective marker for the specification of endosperm cell fate, transcriptional activity for the potential paralogues *ZmNAC5/6* suggests that the maize root cap is initiated early inside the embryo as part of the coleorhiza. Moreover, *ZmNAC5/6* expression data combined into a comparative temporal and spatial analysis of *Kn1*- and *ZmSCR* expression domains provide detailed insights into the early organisation of the root-shoot axis inside the maize embryo. Results are discussed in comparison to embryogenesis in *Arabidopsis*.

7. Literaturverzeichnis

Abbe, E. C. und Stein, O. L. (1954). The growth of the shoot apex in maize: embryogeny. *Am J Bot* 41, 285-293

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. und Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* 9, 841-857.

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, 1563–1570.

Aukerman, M. J. und Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 15, 2730-2741.

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

Bartel, B. und Bartel, D.P. (2003). MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol.* 132, 709–717.

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

Becker A, Winter KU, Meyer B, Saedler H, Theissen G. (2000). *MADS*-Box gene diversity in seed plants 300 million years ago. *Mol Biol Evol.* 17 (10): 1425-34.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová D., Jürgens, G. und Friml, J. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* Vol. 115, 591–602

Bommert, P. und Werr, W. (2001). Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* 27; 271 (2): 131.42.

Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1 (1): 37-52.

Burr, B. und Burr, F.A. (1991). Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *TIG* 7: 55-60

Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303, 2022-2025.

Cheng, P. C., Greyson, R.I., Walden, D.B. (1983). Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Amer. J. Bot.* 70, 450-462.

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

Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R. (1990). *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 21; 63 (6): 1311-22.

Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-22

Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*. Aug 9; 86 (3): 423-33.

Duval M, Hsieh TF, Kim SY, Thomas TL. (2002). Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the *Arabidopsis* *NAC* domain superfamily. *Plant Mol Biol.* 50 (2): 237-48.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and 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, 967-979.

Ernst HA, Nina Olsen A, Skriver K, Larsen S, Lo Leggio L. (2004). Structure of the conserved domain of *ANAC*, a member of the *NAC* family of transcription factors. *EMBO Rep.* 13;5 (2): 297-303

Esau K (1969) Die Apikalmeristeme. In: Pflanzenanatomie. Fischer, Stuttgart, pp 65–96

Floyd, S.K., und Bowman, J.L. (2004). Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* 428, 485–486.

Friml, J. et al. *AtPIN4* mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 661–673 (2000).

Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewská, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., and Palme, K. (2002). *AtPIN4* mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 661–673.

Friml, J., Wisniewska, J., Benkova', E., Mendgen, K. & Palme, K. Lateral relocation of auxin efflux regulator *AtPIN3* mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806–809 (2002).

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. und Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.

Gale MD, Devos KM. (1998). Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 3; 95(5): 1971-4.

Gallois JL, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R. (2002). Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* Jul; 129 (13): 3207-17.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, Yephremov, A., und Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226–2230.

Goff et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296 (5565): 92-100.

Greb T, Clarenz O, Schafer E, Muller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K. (2003). Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.* 17 (9): 1175-87.

Greve K, La Cour T, Jensen MK, Poulsen FM, Skriver K. (2003). Interactions between plant RING-H2 and plant-specific *NAC* (*NAM/ATAF1/2/CUC2*) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochem J.* 371 (Pt 1): 97-108.

- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T. (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131 (3): 657-68.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN. (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101 (5): 555-67.
- Ingram GC, Magnard J-L, Vergne P, Dumas C, Rogowsky PM (1999). *ZmOCL1*, an HDGL2 family homeobox gene, is expressed in the outer cell layer throughout maize development. *Plant Mol. Biol.* 40:343–354
- Ingram GC, Boisnard-Lorig C, Dumas C, Rogowsky PM. (2000). Expression patterns of genes encoding HD-ZipIV homeo domain proteins define specific domains in maize embryos and meristems. *Plant J.* 22 (5): 401-14.
- Jackson, D. P. (1991). *In situ* hybridisation in plants. In: *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Jiang, K. et al. (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130, 1429–1438
- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A. und Grierson, D. (1997). Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 33: 641–651.
- Johri BM, Ambegaokar KB & Srivastava PS (1992). *Comparative Embryology of Angiosperms*. Springer Verlag, Berlin
- Jürgens, G., Mayer, U., Torres-Ruiz, R.A., Berleth, T., and Miséra, S. (1991). Genetic analysis of pattern formation in the *Arabidopsis* Embryo. *Development* 1 (suppl.), 27–38.
- Jürgens, G. und Mayer, U. (1994). *Arabidopsis*. In A Colour Atlas of Developing Embryos, J. Bard, ed (London: Wolfe Publishing), pp. 7–21.
- Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y, Matsuoka M. (2003). Isolation and characterization of a rice *WUSCHEL*-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J.* 35 (4): 429-41.

- Kerstetter RA, Hake S (1997) Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell* 9: 1001–1010
- Kikuchi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Yoshida, K.T., Nagato, Y., Matsusoka, M. and Hirano, H.-Y. 2000. Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice. *Mol. Gen. Genet.* 262: 1047–1051.
- Kim JY, Yuan Z, Jackson D. (2003). Developmental regulation and significance of *KNOX* protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* 130 (18): 4351-62.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. und Masatoshi Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Laux T., Wurschum T., Breuninger H. Genetic regulation of embryonic pattern formation. (2004). *Plant Cell* 16 Suppl:S190-202.
- Li Y, Wu YH, Hagen G und Guilfoyle TJ (1999). Expression of the auxin-inducible GH3 promoter/GUS fusion gene as a useful molecular marker for auxin physiology. *Plant Cell Physiol*; 40 (7): 675-82.
- Lim J, Helariutta Y, Specht CD, Jung J, Sims L, Bruce WB, Diehn S, Benfey PN. (2000). Molecular analysis of the *SCARECROW* gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *Plant Cell* 12 (8): 1307-18.
- Long J.A., Moan EI, Medford JI, Barton MK. (1996). A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 4; 379 (6560): 66-9.
- Long, J. A. und Barton, M. K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* 125, 3027-35.
- Lu P, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD (1996). Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell*, Dec;8(12):2155-68.
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B. (2004). MicroRNA regulation of *NAC*-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol.* 2004; 14 (12): 1035-46.

- Mansfield, S.G. und Briarty, L.G. (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69, 461–476.
- McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton MK (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411 (6838): 709-13.
- Mühlhardt, C. (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Müller A, Guan C, Galweiler L, Tanzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K. (1998). *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17 (23): 6903-11.
- Olsen AN, Ernst HA, Lo Leggio L, Johansson E, Larsen S, Skriver K. (2004). Preliminary crystallographic analysis of the NAC domain of ANAC, a member of the plant-specific NAC transcription factor family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60 (Pt 1): 112-5.
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 31; 10 (6): 239-47.
- Palmiter RD (1974). Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. Expedient techniques for the isolation of undergraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 13 (17): 3606-15.
- Poethig, R. S., Coe, E. H., Johri, M. M. (1986). Cell lineage patterns in maize embryogenesis: a clonal analysis. *Developmental Biology* 117, 392-404
- Randolph, L.F. (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. *J. Agric. Res.* 53, 881-916
- Rashotte, A., Brady, S., Reed, R., Ante, S. & Muday, G. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122, 481–490 (2000).
- Ren T, Qu F, Morris TJ. (2000). *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* 12 (10): 1917-26.

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., und Bartel, D.P. (2002).

MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616–1626

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110 (4): 513-20.

Sabatini, S. et al. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463–472 (1999).

Sablowski R.W. und Meyerowitz E. M. (1998). A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*. 92 (1): 93-103. Erratum in: *Cell* 1998 Feb. 20; 92(4): following 585.

Sambrooke, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek, P. und Benfey, P.N. (1995). Mutation affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53–62.

Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K. (1999). The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 (1): 290-5.

Smith, L. G., Jackson, D. und Hake, S. (1995). The expression of *knotted1* marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. *Dev. Genetics* 16: 344-348.

Sinha NR, Williams RE, Hake S. (1993). Overexpression of the maize homeo box gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev.* 7 (5): 787-95.

Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tchang F, Grosbois M, Guerbette F, Migniac E, Delseny M, Puigdomenech P, Kader J-C (1991). Spatial and temporal expression of a maize *Lipid Transfer Protein* gene. *Plant Cell* 3: 923–933

Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J. and 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: 159–170.

Steeves TA, Sussex IM (1989). The structure of the shoot apex. In: Steeves TA, Sussex IM (eds) Patterns in plant development. *Cambridge University Press*, Cambridge, pp 46–61

Stuurman J, Jaggi F, Kuhlemeier C. (200). Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev.* 16 (17): 2213-8.

Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M. (2001). The *CUPSHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128, 1127–1135.

Taoka K, Yanagimoto Y, Daimon Y, Hibara K, Aida M, Tasaka M. (2004). The *NAC* domain mediates functional specificity of *CUP-SHAPED COTYLEDON* proteins. *Plant J.* 40 (4): 462-73.

The *Arabidopsis* Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000, 408:796-815.

Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M. (2004). Genome-wide analysis of the *GRAS* gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 54 (4): 519-32.

Tillich H. J. (1977). Vergleichend morphologische Untersuchungen zur Identität der Gramineen-Primärwurzel. *Flora* 166: 415±421.

Van Lammerern AAM. (1986). Developmental morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays* L.). *Acta Bot. Neerl.* 35 (3), 169-188.

Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S. (1991). The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature.* 21; 350 (6315): 241-3.

Vollbrecht E., Reiser L. und Hake S. (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development* 127, 3161-72

Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MA, de Vries SC. (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2003 15 (7): 1563-77.

Weigel, D., and Jürgens, G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature* 415, 751–754.

Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B. (2004). *CUPULIFORMIS* establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* 131 (4): 915-22.

Wikstrom N, Savolainen V, Chase MW. (2001). Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 268 (1482): 2211-20.

Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN (2000). Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127 (3): 595-603.

Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. and Chua, N.H. 2000. *Arabidopsis NAC1* transduces auxin signal downstream of *TIR1* to promote lateral root development. *Genes Dev.* 14: 3024–3036.

Yamashita T. (1991). Ist die Primärwurzel bei Samenpflanzen exogen oder endogen? *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 66: 371±391.

Yamashita T, Ueno C. (1992). Embryo- und Wurzelentwicklung bei *Coix lacryma-jobi* L. (*Gramineae*). *Flora* 187: 79±101.

Zhang P, Tan HT, Pwee KH, Kumar PP. (2004). Conservation of class C function of floral organ development during 300 million years of evolution from gymnosperms to angiosperms. *Plant J.* 37 (4): 566-77.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
d. h.	das heißt
DNA	Desoxribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
h	Stunde
kb	Kilobasenpaar
min.	Minute
ng	Nanogramm
mRNA	Boten-RNA
Pos.	Position
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
ü.N.	über Nacht
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolette Strahlung
vgl.	vergleiche

Internet Referenzen:

BOXSHADE	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html
CLUSTALX	ftp.embl-heidelberg.de
DDBJ	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
IBM	http://www.maizemap.org/CIMDE/cimde.html
MaizeGDB	www.maizeGDB.org
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
PlantGDB	http://www.plantgdb.org
Syngenta	http://www.tmri.org

Datenbank-Annotationen der in phylogenetischen Rekonstruktionen verwendeten Sequenzen:

<i>AmCUP</i>	AJ568269
<i>AtCUC1</i>	BAB20598
<i>AtCUC2</i>	BAA19529
<i>AtCUC3</i>	AAP82630
<i>AtNAC1</i>	AAF21437
<i>AtNAP</i>	O49255
<i>OsCUC3</i>	AP006049
<i>OsNAC7</i>	BAA89801
<i>OsNAM</i>	AP003542
<i>PhNAM</i>	CAA63101
<i>TaGRAB1</i>	CAA0937
<i>TaGRAB2</i>	CAA09372
<i>ZmCUC3</i>	AJ833968
<i>ZmNAM1</i>	AJ833966
<i>ZmNAM2</i>	AJ833967
<i>ZmNAC4</i>	AJ833963
<i>ZmNAC5</i>	AJ83396
<i>ZmNAC6</i>	AJ833965

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. Wolfgang Werr betreut worden.

Köln, den

Lebenslauf

Name: Roman Georg Zimmermann
Geburtsdatum: 09.04.1972
Geburtsort: Köln-Porz
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1978 -1982 Besuch der katholischen Grundschule, Köln Rath-Heumar
1982 -1991 Besuch des Heinrich-Heine-Gymnasiums, Köln Ostheim
Juni 1991 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife,
Hauptfächer: Biologie und Englisch

Dez.1991- Feb.1993 Zivildienst im mobilen sozialen Hilfsdienst der
Arbeiterwohlfahrt, Köln

Akademische Ausbildung:

WS 1993/94 – SS1999 Studium der Biologie an der Universität zu Köln,
Hauptfach: Entwicklungsbiologie
WS 99/00 – WS 00/01 Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie der
Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. W. Werr
mit dem Thema „molekulare Charakterisierung einer
embryonal letalen Mutante aus *Zea mays*“.
WS 00/01- WS04/05 Doktorarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie der
Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang
Werr mit dem Thema:
Musterbildung im Maisembryo:
Klonierung *NAM/CUC*-Orthologer aus *Zea mays* L.

Berufliche Tätigkeiten im Rahmen des Studiums:

Aug. 1996 – April 1997: Studentische Hilfskraft im Labor von Prof. Dr. Rüdiger
Simon, Institut für Entwicklungsbiologie, Köln
Okt. 1997 – Juni 1998: Studentischer Mitarbeiter in der Qualitätskontrolle bei
Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach