

Studien zur Rolle von
Blind-homologen *MYB*-Genen
bei der Anlage von Achselmeristemen
in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Dörte Müller
aus Düsseldorf

Köln 2005

Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Theres
Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung

12.07.2005

für meinen Vater

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien.....	11
2.1.2	Enzyme.....	11
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	11
2.1.4	Antikörper.....	12
2.1.5	Organismen	12
2.1.5.1	Bakterien.....	12
2.1.5.2	Hefen.....	12
2.1.5.3	Pflanzen	13
2.1.6	Vektoren.....	13
2.1.6.1	Vektoren zur Transformation in <i>E.coli</i>	13
2.1.6.2	Hefe-Vektoren	13
2.1.6.3	Pflanzen-Vektoren.....	14
2.1.7	Oligonukleotide	14
2.1.8	Lösungen und Kulturmedien.....	16
2.1.9	Computerprogramme und Datenbanken	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Isolierung von DNA.....	17
2.2.2	Isolierung von RNA aus Pflanzen.....	18
2.2.3	cDNA-Synthese / RT-PCR	18
2.2.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	18
2.2.5	Nick-Translation.....	19
2.2.6	Southern-Blot und –Hybridisierung	19
2.2.7	Inkubationsbedingungen für Bakterien	19
2.2.8	Inkubationsbedingungen für Hefen	20
2.2.9	Wachstumsbedingungen für Pflanzen.....	20
2.2.10	Transformation und Selektion von Bakterien	20
2.2.11	Transformation und Selektion von Hefen.....	21
2.2.12	Transformation und Selektion von Pflanzen.....	21
2.2.13	Sequenzierungen.....	21
2.2.14	RNA in situ-Hybridisierungen (RNA-ISH)	21
2.2.14.1	Beschreibung der Sonden	21
2.2.14.2	Präparationen und Durchführung der Hybridisierungen.....	22
2.2.15	Screenings der UWBC-Population.....	23
2.3	Verwendete Abkürzungen	23
3	Ergebnisse	25
3.1	RT-PCR-Analyse der Blind-homologen MYB Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>...	25
3.2	Identifizierung von Knock-out Linien	26
3.3	Etablierung einer Methode zur Analyse des Verzweigungsphänotyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.3.1	Dekapitierungsanalyse	30
3.3.2	Makroskopische Analyse der Verzweigung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	30

3.4	Analyse der Anlage von Achselmeristemen in myb-Insertionslinien unter Kurztagbedingungen	31
3.4.1	<i>Allgemeine Bemerkungen zur Analyse der Insertionslinien</i>	31
3.4.2	<i>Analyse von Einzelmutanten.....</i>	32
3.4.2.1	<i>Analyse der myb37-Insertionslinie</i>	32
3.4.2.2	<i>Analyse der myb38- und myb84-Insertionslinien</i>	34
3.4.3	<i>Analyse von Doppel- und Tripelmutanten.....</i>	34
3.4.3.1	<i>Analyse der myb37 myb38 Doppelmutante.....</i>	35
3.4.3.2	<i>Analyse der myb37 myb84 Doppelmutante.....</i>	37
3.4.3.3	<i>Analyse der myb38 myb84 Doppelmutante.....</i>	38
3.4.3.4	<i>Analyse der myb37 myb38 myb84 Tripelmutante.....</i>	41
3.5	Phänotypanalyse der Anlage von Achselmeristemen in R2R3 MYB Insertionslinien unter Langtagbedingungen	44
3.5.1	<i>Verzweigungsverhalten von Columbia Wildtyppflanzen in kurzen und langen Fotoperioden</i>	44
3.5.2	<i>Verzweigung von R2R3 MYB-Insertionslinien in langen Photoperioden.....</i>	45
3.6	Überexpression des MYB38-Gens unter der Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-Promotors	48
3.7	Charakterisierung des Expressionsmusters von MYB37, MYB38 und MYB84 durch RNA in situ-Hybridisierungen	50
3.7.1	<i>Allgemeine Bemerkungen zur Methode der RNA in situ-Hybridisierungen.....</i>	50
3.7.2	<i>Transkriptverteilung von MYB37 in der vegetativen Phase</i>	51
3.7.2.1	<i>Transkriptakkumulation von MYB37 in 4 Wochen alten Sprossapices</i>	51
3.7.2.2	<i>Transkriptakkumulation von MYB37 in zwei Wochen alten Sprossapices</i>	53
3.7.3	<i>Transkriptverteilung von MYB37 in der reproduktiven Phase.....</i>	54
3.7.3.1	<i>Untersuchung von reproduktiven Sprossapices.....</i>	54
3.7.3.2	<i>Untersuchung von jungen Blütenknospen.....</i>	54
3.7.4	<i>Transkriptakkumulation von MYB37 in myb37 Pflanzen.....</i>	55
3.7.5	<i>Transkriptverteilung von MYB38</i>	55
3.7.6	<i>Transkriptverteilung von MYB84</i>	56
3.8	Integration der MYB37-Funktion in den Prozess der Achselmeristembildung.....	57
3.8.1	<i>LAS-Expression und MYB37-Expression sind nicht voneinander abhängig.....</i>	57
3.8.2	<i>In der myb37 myb38 myb84-Tripelmutante unterbleibt die Anlage von Achselmeristemen</i>	59
3.8.3	<i>Charakterisierung der las-4 myb37 Doppelmutante.....</i>	60
3.8.4	<i>Charakterisierung der las-4 myb84 Doppelmutante.....</i>	62
3.9	Untersuchungen zu möglichen Interaktionspartnern von MYB37, MYB38 und MYB84.....	63
3.9.1	<i>Mutationen in bHLH-Genen verursachen Defekte bei der Anlage von Achselmeristemen ..</i>	63
3.9.2	<i>Allgemeine Bemerkungen zum Hefe-Zwei-Hybrid-System.....</i>	65
3.9.3	<i>Konstrukte für die Analyse von Interaktionen zwischen MYB- und bHLH-Proteinen</i>	66
3.9.4	<i>Untersuchungen zu Proteinwechselwirkungen zwischen MYB- und bHLH-Proteinen...</i>	67
3.9.4.1	<i>Untersuchungen von MYB- und bHLH-Proteinen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System.</i>	67
3.9.4.1.1	<i>Analyse der autoaktivierenden Wirkung von MYB- und bHLH-Proteinen.....</i>	67

3.9.4.1.2	Untersuchungen zu Interaktionen zwischen MYB- und bHLH-Proteinen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	69
3.9.4.2	Charakterisierung des Verzweigungsphänotyps von <i>bhlh</i> -Mutanten	70
4	Diskussion.....	72
4.1	Blind-homologe MYB-Gene aus <i>Arabidopsis thaliana</i> kontrollieren differentiell die Verzweigung entlang der Sprossachse	72
4.2	Die Bildung von Achselmeristemen in <i>Arabidopsis</i> wird durch zwei verschiedene Regulationswege kontrolliert.....	77
4.3	MYB37- und MYB84-Transkripte akkumulieren in Achselmeristemgründerzellen	79
4.4	Regulation des Blühzeitpunkts durch MYB37	83
5	Literaturverzeichnis	85
6	Erklärung	92
7	Zusammenfassung	94
8	Abstract.....	96

1 *Einleitung*

Das Wachstum von Pflanzen wird in entscheidender Weise durch die Aktivitäten meristematischer Zellengruppen an den Spross- und Wurzelspitzen, den Apikalmeristemen, gesteuert. Im Embryo wird die primäre Wachstumsachse der Pflanze angelegt, an deren basalem Ende das Wurzelapikalmeristem und an deren apikalem Ende das Sprossapikalmeristem etabliert werden. Aus dem Wurzelapikalmeristem geht das gesamte Wurzelsystem der Pflanze hervor, während durch das Sprossapikalmeristem (SAM) alle oberirdischen Teile gebildet werden. In Samenpflanzen werden während der postembryonalen Entwicklung durch die Anlage neuer Meristeme in den Achseln von Blättern, den sogenannten Achselmeristemen, neue Wachstumsachsen initiiert. Aus diesen Achselmeristemen (Lateralmeristemen, LM) gehen zunächst Seitentriebknospen hervor, die je nach Pflanzenart zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt und Grad zu Seitentrieben auswachsen. Der Austrieb der Achselknospen wird in vielen Pflanzenarten zunächst durch einen inhibitorischen Effekt des primären Sprossapikalmeristems unterdrückt. Dieses Phänomen, das man als Apikaldominanz bezeichnet, wird durch Pflanzenhormone gesteuert, wobei Auxin einen reprimierenden und Cytokinin einen fördernden Einfluß auf den Austrieb der Seitentriebknospen hat (Horvath et al., 2003). Neue Arbeiten zeigen, dass ein weiteres bisher noch nicht eindeutig identifizierte Molekül eine zentrale Rolle bei der Unterdrückung der Verzweigung spielt (z.B.: Sorefan et al. 2003, Foo et al. 2005). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Architektur von Pflanzen wesentlich bestimmt wird durch das Muster der Anlage von lateralen Meristemen sowie durch die Wachstumseigenschaften der daraus entstehenden Achselknospen.

Das Sprosswachstum höherer Pflanzen erfolgt in Modulen, wobei jedes Modul (Phytomer) aus einem Blatt, einer Achselknospe (Nodium) und einem dazugehörigen Stängelabschnitt (Internodium) besteht (Sussex, 1989). Das gesamte Sprossystem besteht aus solchen Phytomeren. Je nach Entwicklungsphase der Pflanze können die lateralen Meristeme, die in jedem Phytomer enthalten sind, jedoch unterschiedliche Identitäten annehmen. So produzieren die Achselmeristeme in der vegetativen Phase von *Arabidopsis thaliana* Seitentriebe, während sie sich in der reproduktiven Phase zunächst zu Infloreszenztrieben und schließlich zu Blüten entwickeln. Die Zahl der angelegten Phytomere sowie die unterschiedlichen Aktivitäten und

Identitäten der Achselmeristeme sind die Hauptvoraussetzungen für die Komplexität der Sprossarchitektur, die man in den Bauplänen vieler Pflanzenarten wiederfindet.

Da der gesamte oberirdische Pflanzenkörper auf die Aktivität des Sprossapikalmeristem zurückgeht, bedürfen die Initiation und Organisation sowie die Aktivität und Aufrechterhaltung des SAM einer genauen Regulation. Mit Hilfe von Mutanten, die einen Defekt in der Initiation des Sprossapikalmeristems zeigen, wurden Gene isoliert, die wichtig für die Entstehung dieser Meristeme sind. Das SHOOT MERISTEMLESS (*STM*)-Protein, das zur Klasse der KNOX (Knotted1 like homeobox containing)-Proteine gehört, ist entscheidend für die Initiation des SAM und für die Aufrechterhaltung des meristematischen Charakters der Zellen (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996). Für die beiden Gene *KNAT1* und *KNAT2* (Knotted like from *Arabidopsis thaliana*), die ebenfalls zu dieser Klasse gehören und im SAM exprimiert werden (Lincoln et al., 1994), wurden ähnliche Funktionen wie für *STM* nachgewiesen (Byrne et al, 2002). Pflanzen mit schwächeren *stm*-Allelen können noch Sprosse bilden, die vermutlich auf die Aktivität von *KNAT1* und *KNAT2* zurückzuführen sind. Das *STM*-Homolog aus Mais ist das *Knotted1-Gen* (Vollbrecht et al., 1991). Die Bildung von ektopischen Meristemen auf Blättern wurde zuerst in der gain-of-function Mutante *knotted1* (*kn1*) beobachtet (Freeling und Hake, 1985). Wenn *Kn1* aus Mais in Tabakpflanzen überexprimiert wird, führt dies ebenfalls zur Bildung von ektopischen Meristemen auf der Blattoberseite (Sinha et al., 1993). Dies gilt auch für die Überexpression von *KNAT1* in *Arabidopsis* (Chuck et al., 1996), was dafür spricht, dass *Kn1* und *KNAT1* hinreichend für die Initiation von Meristemen sind. Die Sprossachsen von Pflanzen, die homozygot für schwache *stm*-Allele sind, terminieren früher als die von Wildtyppflanzen, woraus sich eine Funktion von *STM* für die Aufrechterhaltung des SAM ableiten läßt (Clark et al., 1996). In *Arabidopsis*, wo das primäre SAM über die gesamte Lebensspanne der Pflanze aktiv ist, wird *STM* im Meristem und den interprimordialen Bereichen exprimiert (Long und Barton, 2000; Grbic et al, 2000). Eine Wirkung, durch die *STM* den meristematischen Zustand von Zellen erhält, besteht in der Inhibition der Expression von Genen, die an der Differenzierung von lateralen Organen beteiligt sind, wie zum Beispiel *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) (Byrne et al, 2000). Andererseits wird *STM* selbst in Blattprimordien reprimiert, was die exakte Regulation der Genexpression im SAM widerspiegelt. Ein weiterer Mechanismus, wie *STM* die

Differenzierung von Zellen unterbindet, besteht vermutlich in der Herabsetzung der Gibberellinsäure (GA)-Spiegel in den SAM-Zellen, da GA die Differenzierung von Zellen fördert (Hay et al., 2002). Arbeiten von Sakamoto et al. (2001) zeigten, dass das Homeodomänenprotein NTH15 in Tabak die Aktivität des GA-Biosynthesegens *GA 20-Oxidase* reprimiert, was eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des meristematischen Zustands der Zellen im SAM darstellt.

Neben *STM* wurde auch für die beiden Gene *CUP-SHAPED-COTYLEDON 1 (CUC1)* und *CUP-SHAPED-COTYLEDON 2 (CUC2)* die zu den NAC-Domäne-Genen gehören, eine entscheidende Funktion bei der Etablierung des Sprossapikalmeristems während der Embryogenese nachgewiesen. *cuc1 cuc2*-Doppelmutanten bilden kein SAM und stellen im Keimlingsstadium das Wachstum ein, wobei die beiden Keimblätter meist zu einer becherförmigen Struktur fusioniert sind, die diesen Genen ihre Namen gegeben hat (Aida et al., 1997). Die Funktionen von *CUC1* und *CUC2*, die im Embryo an der Stelle des entstehenden SAMs exprimiert werden (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001), sind demnach essentiell für die Etablierung eines Sprossapikalmeristems. Überexpression von *CUC1* resultiert in der Bildung von zusätzlichen Seitentrieben auf der adaxialen Seite von Keimblättern (Takada et al., 2001). Daten von Aida (1999) und Takada (2001) liefern Hinweise darauf, dass die beiden *CUC*-Gene *STM* regulieren. In *cuc1 cuc2*-Pflanzen findet man kein *STM*-Transkript, während *CUC1* und *CUC2* im *stm*-Hintergrund normal exprimiert werden. Des Weiteren wird *STM* in Pflanzen, die *CUC1* überexprimieren, ebenfalls ektopisch exprimiert, während im *stm*-Hintergrund die Bildung von zusätzlichen Trieben durch die *CUC1*-Überexpression unterdrückt wird. Neuere Arbeiten zeigen, dass die Gene *CUC1* und *CUC2* selbst durch eine microRNA reguliert werden (Laufs et al., 2004).

Die Bildung von Organanlagen aus dem Meristem erfolgt, indem sich Stammzellen des Meristems teilen und Tochterzellen abgliedern, die dann zu Organgründerzellen werden (Steeves und Sussex, 1989). Damit das SAM über einen langen Zeitraum hinweg seine Funktion aufrecht erhalten kann, muss ein Gleichgewicht zwischen der Stammzellpopulation und den Zellen, die vom Meristem zur Differenzierung abgegliedert werden, bestehen. Das SAM kann aufgrund von unterschiedlichen Zellteilungsaktivitäten in drei Zonen unterteilt

werden, eine zentrale Zone in der Mitte des SAM, die periphere Zone an den Flanken des SAM und die Rippenzone unterhalb der zentralen Zone. Für die Homeostase zwischen den in die periphere Zone und die Rippenzone abgegliederten Zellen einerseits und den Stammzellen andererseits, sind die Aktivitäten der *CLAVATA*-Gene und des *WUSCHEL* (*WUS*)-Gens, die antagonistisch zueinander die Größe der Stammzellpopulation regulieren, von entscheidender Bedeutung. *WUS* gehört zu den Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren und wird im Zentrum des Meristems in wenigen Zellen exprimiert (Laux et al., 1996). *wus*-Mutanten zeichnen sich durch ein fehlerhaft arbeitendes SAM aus. Diese Pflanzen stellen das Wachstum jedoch nicht gänzlich ein, da sie Adventivmeristeme bilden, aus denen Triebe hervorgehen, die wiederum nach Bildung einiger Blattprimordien terminieren. Anschließend werden erneut Adventivmeristeme und Triebe gebildet, die wiederum frühzeitig das Wachstum einstellen. Auf diese Weise entsteht ein „wuscheliges“ Erscheinungsbild der Pflanzen. Die Ursache für den vorzeitigen Wachstumsstop liegt in einer verkleinerten Stammzellpopulation im SAM, wodurch sich das Meristem aufbraucht (Laux et al., 1996). Im Gegensatz zur *wus*-Mutante besitzen *CLAVATA* (*CLV*)-Mutanten ein vergrößertes Meristem, was auf eine vergrößerte Stammzellpopulation zurückzuführen ist (Brand et al., 2000). Bei *clv*-Pflanzen äußert sich die veränderte Meristemgröße zum Beispiel in einer erhöhten Zahl von Blütenorganen. *CLV1* und *CLV2* kodieren für eine LRR-Rezeptorkinase (Clark et al., 1993) bzw. ein Rezeptorprotein (Jeong et al., 1999), die zusammen einen membranständigen Rezeptor bilden. *CLV3* kodiert für einen Liganden, der an den *CLV1/2*-Rezeptor binden kann und vermutlich von den Stammzellen des Meristems sekretiert wird (Fletcher et al., 1999; Rojo et al., 2002). Die drei *CLV*-Gene werden in der zentralen Zone des Meristems oberhalb der *WUS*-Domäne exprimiert (Fletcher et al., 1999; Brand et al., 2000). Die Funktion der drei *CLV*-Proteine besteht darin, die *WUS*-Expression zu reprimieren. Auf diese Weise bilden die *WUS*- und *CLV*-Faktoren einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Während *WUS* die Bildung von Stammzellen fördert, reprimieren die Stammzellen über die *CLV*-Kaskade die Expression von *WUS*. Auf diese Weise wird die Stammzellpopulation in der zentralen Zone des Meristems erhalten und auf eine bestimmte Anzahl von Zellen eingeschränkt.

Über die Entstehung von sekundären Meristemen, die im Gegensatz zum SAM in der postembryonalen Phase etabliert werden, ist noch wenig bekannt. Diese Arbeit fokussiert sich

auf die Mechanismen, die die Initiation von Achselmeristemen kontrollieren. Über die Herkunft der Zellen, aus denen die lateralen Meristeme entstehen, gibt es zwei Hypothesen. Zum einen könnten Lateralmeristeme in den Blattachsen *de novo* aus teilweise oder vollständig differenzierten Zellen entstehen (Snow und Snow, 1942; Napoli et al., 1999). Die Alternative dazu ist, dass sie aus Zellgruppen hervorgehen, die vom SAM bei der Anlage eines Blattprimordiums abgegliedert werden, und die ihre meristematische Identität beibehalten („*detached meristem*“; Steeves und Sussex, 1989). In verschiedenen Pflanzenarten, wie zum Beispiel Tomate oder Kartoffel, entwickeln sich Achselknospen in geringem physischen Abstand zum SAM (Steeves und Sussex, 1989). In *Arabidopsis* bilden sich Achselknospen nur während der reproduktiven Phase in räumlicher Nähe zum SAM (Hempel und Feldmann, 1994). In diesen Fällen ist es leicht vorstellbar, dass vom Hauptmeristem abgegliederte Zellen unmittelbar die Anlage von Lateralmeristemen einleiten. Im Gegensatz dazu werden in *Arabidopsis* während der vegetativen Entwicklung Achselknospen erst in größerem Abstand vom SAM beobachtet (Hempel und Feldmann, 1994). Bei Versuchen, die Frage nach der Herkunft der Achselmeristemgründerzellen zu klären, wurde die *STM*-Expression in den interprimordialen Bereichen, aus denen auch die Achselmeristeme entstehen, als molekularer Marker für den meristematischen Zustand der Zellen eingesetzt (Long und Barton, 2000; Grbic und Blecker, 2000). Diese Arbeiten zeigten, dass *STM* im Bereich der Achselzellen von der Abgliederung durch das SAM bis zur Bildung einer Achselknospe kontinuierlich exprimiert wird. Unmittelbar bevor ein Achselmeristem morphologisch erkennbar wird, fokussiert sich die *STM*-Expression auf das Zentrum der Blattachsel. Obwohl sich mit diesen Untersuchungen nicht eindeutig feststellen ließ, ob die Achselmeristemgründerzellen eine Phase durchlaufen, in der die *STM*-Expression fehlt, unterstützen diese Ergebnisse eher das „*detached meristem*“-Konzept. Greb et al. (2003) nutzten die Transkriptakkumulation des *LATERAL SUPPRESSOR* (*LAS*)-Gens als molekularen Marker, um das Schicksal der Zellen, aus denen Achselmeristeme entstehen, zu verfolgen. *LAS*, ein Mitglied der GRAS-Genfamilie, wird entlang der gesamten Basis aller Blattprimordien exprimiert, von der Anlage eines Blattprimordiums bis zur Organisation des Lateralmeristems. Die *LAS*-Expression in den Blattachsen geht zurück, wenn sich die *STM*-Expression unmittelbar vor der Organisation eines Achselmeristems fokussiert. In *las*-Mutanten, in denen während der vegetativen Entwicklungsphase die Bildung von lateralen Meristemen ausbleibt, ist auch die fokussierte *STM*-Expression nicht nachweisbar.

LAS-Aktivität stellt also eine Voraussetzung für die Etablierung der fokussierten *STM*-Expression (Greb et al., 2003) und somit für die Anlage von bestimmten Achselmeristemen dar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der *las*-Mutante Achselknospen gebildet werden, deren Entwicklung in unmittelbarer Nähe zum SAM abläuft (reproduktive Phase), aber die Bildung von anderen Achselknospen ausbleibt, die normalerweise in einem größeren Abstand zum SAM entstehen (vegetative Phase). Dieser Befund führte zu der Hypothese, dass Achselmeristeme aus Zellen entstehen, die vom SAM abgegliedert wurden, und dass diese Zellen, wenn sie nicht sofort zur Meristembildung übergehen, durch die *LAS*-Aktivität vor Differenzierung geschützt werden (Greb et al., 2003).

las ist ein Beispiel für Mutanten, die einen spezifischen Defekt in der Anlage von Achselmeristemen aufweisen. Das *Lateral Suppressor*-Gen wurde zuerst aus Tomate (*Ls*) isoliert (Schumacher et al., 1999). Wie erwähnt gehört das Protein zur Familie der GRAS-Proteine, die vermutlich als Transkriptionsfaktoren fungieren (Pysh et al., 1999). Die *ls*-Mutante der Tomate ist ebenfalls durch eine Reduktion der Seitentriebbildung während der vegetativen Phase charakterisiert. Darüber hinaus zeigen diese Pflanzen in der reproduktiven Entwicklungsphase Defekte in der Anlage von Petalen (Williams, 1960) und eine Verminderung der Fertilität (Groot et al., 1994). Außerdem ist in *ls*-Mutanten die Entwicklung der Abszissionzonen, an denen sich später die Früchte von der Pflanze lösen, gestört (Schmitt, 1999). In Reis unterdrückt eine Mutation im *Ls*-orthologen Gen *MONOCULMI* (*MOCI*) die Anlage von Tillern und reduziert die Verzweigung der Infloreszenz (Li et al., 2003). Dies zeigt, dass die *LAS/Ls/MOCI*-Funktion bei der Anlage von Achselmeristemen zwischen mono- und dikotyledonen Pflanzen konserviert ist. Außer *LAS* sind weitere Gene bekannt, deren Ausfall eine Störung in der Initiation von Achselmeristemen nach sich zieht und die folglich eine Reduktion der Verzweigung bewirken. In Tomate wurde neben *ls* die *blind*-Mutante beschrieben, die einen spezifischen Defekt in der Anlage von lateralen Meristemen sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Phase zeigt, was auf eine Mutation in einem *MYB*-Transkriptionsfaktorgen zurückzuführen ist (Schmitz et al., 2002; siehe unten). Des Weiteren ist in der *lax panicle* (*lax*)-Mutante aus Reis die Verzweigung sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Phase deutlich reduziert, was ebenfalls durch fehlende laterale Meristeme zu erklären ist. *LAX* kodiert für einen *bHLH*-Transkriptionsfaktor

(Komatsu et al, 2003). In der entsprechenden Mais-Mutante, *barren stalk1*, die ein Mutation im homologen *bHLH*-Gen trägt, wird die Anlage von allen Achselmeristemen unterdrückt (Gallavotti et al., 2004). *Arabidopsis revoluta (rev)*-Pflanzen zeigen neben vergrößerten Sprossen, Blättern und Blüten Defekte in der Gefäßentwicklung und auch eine Störung in der Achselmeristeminitiation (Talbert et al., 1995; Zhong und Ye, 1999; Otsuga et al., 2001). REVOLUTA kodiert für einen HD-ZIP-Transkriptionsfaktor und wird in Leitbündeln, im SAM und in Achselmeristemen exprimiert. Arbeiten von Greb et al. (2003) haben gezeigt, dass die REV-Expression in Blattachsen unmittelbar vor der Initiation von Achselmeristemen einsetzt und von LAS abhängig ist. Zhong und Ye (2004) konnten zeigen, dass eine *gain-of-function*-Mutation in REV/IFL unter anderem eine Radialisierung der Leitbündel zur Folge hat. Dieses mutante Allel mit der Bezeichnung *amphivasal vascular bundle 1* führt im *Arabidopsis* Ökotyp *Columbia* neben anderen Effekten zu der Bildung von ektopischen Sprossen am Stamm. Eine *gain-of-function*-Mutation in dem mit REV/IFL verwandten PHABULOSA-Gen zeichnet sich durch eine Adaxialisierung der Blätter aus. In dieser *phabulosa-1d*-Mutante finden sich Achselknospen auch auf der abaxialen Seite der Blätter, wo normalerweise keine Achselmeristeme angelegt werden (McConnell und Barton, 1998). Weiterhin wurden ektopische Meristeme häufig auf der Oberseite von Blättern gefunden, wie es für transgene Pflanzen als Folge einer Überexpression der Gene *Knotted1*, *KNAT1* und *CUC1* beschrieben worden ist (Freeling und Hake 1991; Sinha et al., 1993; Chuck et al., 1996; Takada et al, 2001). Dabei fällt auf, dass diese zusätzlichen Meristeme vorzugsweise über Leitbündeln angelegt werden. Zusammen genommen deuten diese Befunde darauf hin, dass für die Etablierung von lateralen Meristemen bestimmte Eigenschaften der Blattoberseite wichtig zu sein scheinen und, dass Gefäße einen positiven Einfluss auf die Bildung dieser Meristeme haben.

Die *blind*-Mutante aus Tomate weist, wie schon oben erwähnt, sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Entwicklungsphase Defekte bei der Anlage von Seitentrieben auf (Stubbe, 1959; Stubbe, 1964). In der vegetativen Phase bleiben die meisten Blattachsen (40-90 %) leer (Abb. 1-1 A), während Wildtyppflanzen in nahezu 100% der Achseln Seitentriebe bilden (Abb. 1-1 B) (Schmitz et al., 2002). Die Blattachsen von *blind*-Pflanzen, in denen die Bildung eines Seitentriebs unterstützt wird, sind nach einem bestimmten Muster entlang der Sprossachse verteilt. Bis zur Bildung der ersten Infloreszenz bilden Tomaten meistens elf

vegetative Nodien. In *blind*-Pflanzen werden vorzugsweise in den Blattachsen der Nodien zwei bis fünf und in den beiden Nodien unterhalb der Infloreszenz Seitentriebe gebildet (Mapelli und Kinet, 1992). Dekapitierungsexperimente von Mapelli und Lombardi (1982) und histologische Untersuchungen von Mapelli und Kinet (1992) zeigten, dass in den Blattachsen von *blind*-Pflanzen, in denen keine Seitentriebe gebildet werden, laterale Meristeme fehlen. *blind*-Pflanzen terminieren häufig nach Bildung der ersten oder zweiten Infloreszenz. Außerdem ist die Verzweigung der Infloreszenzen stark reduziert, so dass nur ein bis vier Blüten angelegt werden. Im Gegensatz dazu bilden Wildtyppflanzen 7 bis 12 Blüten pro Infloreszenz (Abb. 1-1 D; Schmitz et al., 2002). *blind*-Blüten fusionieren häufig und weisen eine erhöhte Zahl an Petalen auf (Abb. 1-1 C).

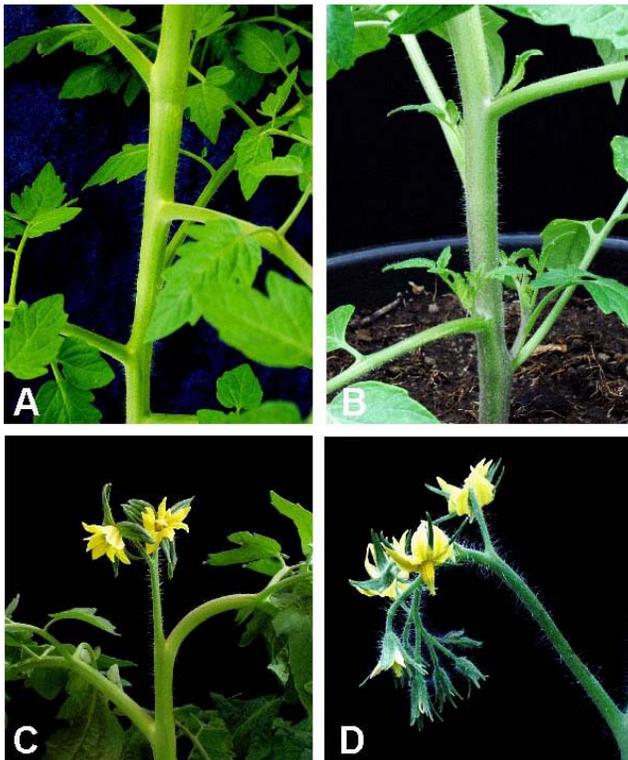


Abb. 1-1: Phänotyp der *blind*-Mutante der Tomate. (A) Ausschnitt der vegetativen Sprossachse von *blind-2*. In den meisten Blattachsen werden keine Seitentriebe gebildet. (B) Abschnitt der vegetativen Sprossachse einer Wildtyppflanze, die in jeder Achsel einen Seitentrieb bildet. (C) Infloreszenz einer *blind-2* Pflanze, die nach der Bildung von zwei Blüten terminiert. (D) Wildtypinfloreszenz. Die Abbildung ist modifiziert nach Schmitz et al., 2002.

Mit einem „map-based-cloning“-Ansatz wurde das *Blind*-Gen isoliert, es gehört zur Familie der R2R3-Myb-Transkriptionsfaktoren (Schmitz et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine dem *Blind*-Gen aus Tomate entsprechende Funktion in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und charakterisiert werden. *R2R3 MYB*-Gene bilden eine der größten Genfamilien im *Arabidopsis*-Genom. Bisher wurden in *Arabidopsis* 125 *R2R3 MYB*-Gene identifiziert (Stracke et al., 2001), die verschiedene Prozesse, wie zum Beispiel die Flavonoid-Biosynthese oder die Spezifizierung von Trichomen und Wurzelhaaren (Borevitz et al., 2000; Debeaujon et al., 2000, Schiefelbein, 2003) kontrollieren. Alle *R2R3 MYB*-Gene besitzen am N-Terminus eine MYB-Domäne, die DNA-Bindung vermittelt und die zudem kritische Aminosäuren enthält, welche für Interaktionen mit anderen Proteinen notwendig sind (Grotewold et al, 2000). Innerhalb der MYB-Domäne sind die Proteine zu einem hohen Grad konserviert. Das offene Leseraster der *R2R3 MYB*-Gene wird innerhalb der MYB-Domäne durch zwei Introns unterbrochen. Im Gegensatz zum N-Terminus zeigt der C-Terminus der *MYB*-Gene nur wenige konservierte Abschnitte. Die Konservierung von im C-terminalen Bereich vorhandenen Sequenzmotiven ist jedoch in der Regel ausreichend, um Mitglieder dieser Genfamilie in Untergruppen einzuteilen (Stracke et al., 2001). Die *R2R3-MYB*-Gene aus *Arabidopsis thaliana*, die in der MYB-Domäne Homologie zu *Blind*-Gen der Tomate aufweisen, bilden eine Untergruppe mit sechs Mitgliedern. Innerhalb der MYB-Domäne zeigen die Proteine dieser Untergruppe 76-86 % identische Aminosäuresequenzen (Abb. 1-2).

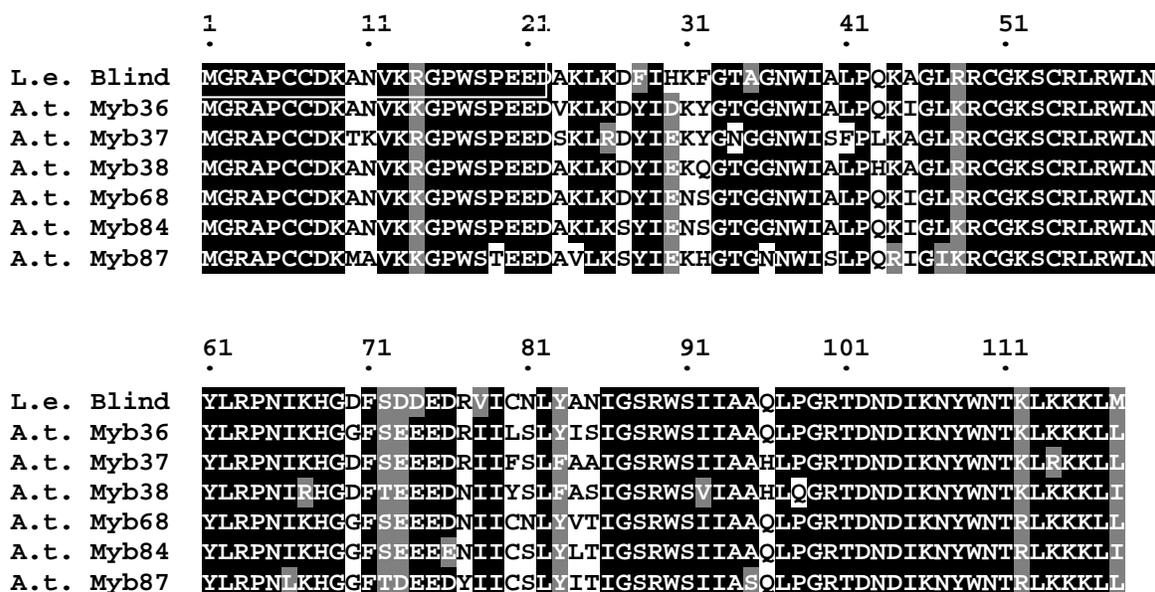


Abb. 1-2: Vergleich der MYB-Domänen-Sequenzen. Vergleich der MYB-Domänen des *Blind*-Proteins mit den Proteinen aus *Arabidopsis*, die am ähnlichsten zu *Blind* sind und eine Untergruppe bilden.

Die Gene der *Blind*-homologen Untergruppe zeichnen sich nicht durch konservierte Motive im C-terminalen Bereich aus, sondern durch eine charakteristische Abfolge von Tryptophan- und Phenylalaninresten (Stracke et al., 2001).

Arbeiten von Schmitz et al. (2002) haben gezeigt, dass in Tomate mindestens zwei verschiedene Regulationswege für die Anlage von Achselmeristemen existieren. Neben *Lateral suppressor (Ls)* wurde ein *R2R3-MYB*-Gen identifiziert (*Blind*), welches unabhängig von *Ls* entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von lateralen Meristemen ausübt. Ziel dieser Arbeit war es, eine *Blind*-entsprechende Funktion in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren. Dies sollte einerseits einen Vergleich der *Blind*-Funktion in einer Pflanze mit sympodialelem (Tomate) und einer mit monopodialelem (*Arabidopsis*) Verzweigungssystem ermöglichen. Auf der anderen Seite sollten mit Hilfe von Arbeiten zur *Blind*-homologen Funktion in *Arabidopsis* tiefere Einblicke in die Regulation der Verzweigung ermöglicht werden, da in diesem Modellsystem bereits viele Gene bekannt sind, die bei der Kontrolle von Aktivitäten des SAM und bei der Regulation der Achselmeristeminitiation eine Rolle spielen. Somit könnten potenzielle Wechselwirkungen zwischen *Blind*-homologen Genen und den oben erwähnten Regulatoren untersucht werden. Das zweite Ziel dieser Arbeit war, das Expressionsmuster von *Blind*-verwandten Genen aus *Arabidopsis* mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung zu charakterisieren, um detailliertere Hinweise auf die Orte der Genwirkung zu gewinnen. Ein weiteres Ziel bestand darin, die *Blind*-entsprechende Funktion in *Arabidopsis* in den Prozess der Anlage von Achselmeristemen einzuordnen. Dies sollte durch Expressionsanalysen und Vergleiche mit den Expressionsmustern anderer Regulatoren der Meristeminitiation, durch die Analyse von Doppelmutanten und durch Untersuchung von Proteininteraktionen mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-System erreicht werden.

2 *Material und Methoden*

2.1 *Material*

2.1.1 *Chemikalien*

Im Folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Chemikalien angegeben.

Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig
Biozym, Hess. Oldendorf
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Duchefa, Haarlem, Niederlande
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Merck, Feinchemikalien und Laborbedarf, Darmstadt
Roche, Mannheim
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.2 *Enzyme*

Im Folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Enzyme aufgeführt.

Invitrogen GmbH, Karlsruhe
New England BioLabs GmbH, Schwalbach (Taunus)
MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.3 *Verbrauchsmaterialien*

Inkubationsröhrchen, Petrischalen:	Greiner Labortechnik Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Kits zur Nukleinsäurebehandlung:	Qiagen, Hildesheim
Röntgenfilme:	BioMax MR-1, Kodak Co., New York
Nylonmembranen:	Hybond TM -N+, Amersham International plc.

2.1.4 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragments (aus Schaf), Roche, Mannheim

2.1.5 Organismen

2.1.5.1 Bakterien

In den Experimenten wurden zur Klonierung von in Vektoren legierten DNA-Fragmenten kompetente DH5 α Zellen (Hanahan, 1983) verwendet. Der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α F-, end A1, hsdR17 (rk-, mk+), gyrA96, relA1, supE44, L-, recA1, 80dlacZM15, Δ (lacZYAargF) U196 wurde benutzt.

Zur Pflanzen-Transformation wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 verwendet. Es wurde entweder das Virulenz-Plasmid pMP90 (Koncz und Schell, 1986) oder pMP90RK (erhalten von M. Jakoby) eingesetzt.

2.1.5.2 Hefen

Innerhalb des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden zwei Stämme unterschiedlichen Konjugationstyps verwendet. Beide Stämme sind auxotroph für Tryptophan, Leucin und Histidin, AH109 außerdem für Adenin. Die Tryptophan- und Leucin-Marker dienen zum Nachweis der Präsenz von Vektoren nach erfolgter Transformation. Die Proteininteraktion wurde mittels des HIS3-Reportergens und bei AH109 zusätzlich mit Hilfe des ADE2-Reportergens detektiert. Beide Reportergene sind unter der Kontrolle der *Gal4*-Bindestelle des *Gal1*-Promotors.

AH109: MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ (James et al., 1996)

Y187: MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ (Harper et al., 1993)

2.1.5.3 Pflanzen

Die Pflanzenanalysen in dieser Arbeit wurden mit der Art *Arabidopsis thaliana* Heynh. vom Ökotyp Columbia und Wassilewskija durchgeführt. Samenmaterial der verschiedenen Ökotypen und Mutanten wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)* erhalten. Als *las*-Mutante wurde die Mutante mit dem Allel *las-4* verwendet, das eine Deletion von 20 bp bei bp 365 des offenen Leserasters aufweist (Greb et al., 2003).

2.1.6 Vektoren

2.1.6.1 Vektoren zur Transformation in *E.coli*

Zur Klonierung und Vermehrung von DNA-Fragmenten in *E.coli* wurden folgende Vektoren verwendet:

pGEM4Z+	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten, Promega
pGEM11Z+	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten, Promega
pGEM11Z+	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten, Promega
pGEM-T	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten und deren Transkription unter dem T7-Promotor, Promega
pDONR201	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten zur Verwendung im Gateway System, Invitrogen

2.1.6.2 Hefe-Vektoren

Zur Expression von Fusionsproteinen mit der aktivierenden oder der DNA-bindenden Domäne des *Gal4*-Transkriptionsfaktors wurden verschiedene Vektoren verwendet.

pCL1	Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für den <i>Gal4</i> -Transkriptions-faktor, Clontech
------	--

pGBKT7-53	Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für Fusionsprotein zwischen p53 aus Maus und der <i>Gal4</i> -DNA bindenden Domäne, Clontech
pGBKT7-Lam	Negativkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für Fusionsprotein zwischen Lamin C aus dem Menschen und der DNA-bindenden Domäne von <i>Gal4</i> , Clontech
pACT-attR	Zur Fusion von Proteinen an die aktivierende Domäne des <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktors (erhalten von J. Uhrig)
pAS-attR-new	Zur Fusion von Proteinen an die aktivierende Domäne des <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktors (erhalten von J. Uhrig)

2.1.6.3 Pflanzen-Vektoren

Zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die Vektoren pGPTV-BAR oder pLEELA verwendet (erhalten von M. Jakoby).

2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden hauptsächlich von *metabion*, Planegg-Martinsried, von *MWG Biotech*, Ebersberg, oder von *Invitrogen*, Karlsruhe, bezogen. Die aufgeführten Oligonukleotide sind von 5' nach 3' notiert.

zu Kap. 3.1

M36-1	GGAAGAGAACAACAACGACAAGATCAAG
M36-2	CCATCAATAATCCATTATCCATCCC
M37-1	AACGAGAGAAATGGGAAGAGC
M37-2	CCTCCCATACCCCATCAAATC
6299-1	AGATAGAGAGATGGGTAGGGCTCC
6299-2	TACTCGAGATCAGTAGTACAACATGAAC
M68-1	AAGAATCAAGAAAATGGGAAGAGC
M68-2	CTACCACTCCCTAAAGACACAG
M84-1	AGGCCGCTATCAAGAACAAG
M84-2	CCATATATACGTTACGTACCCCC
M87-2031F	AGAATAAGAAGAAAATGGGAAGAGC
M87-3020R	CTCAAACCCGTCCATAAAGAAC
ActinATFo	TGGTGTCATGGTTGGGATG
ActinATRev	CACCACTGAGCACAATGTTAC

zu Kap. 3.2

Oligonukleotide für Screening in der ZIGIA-Population

M36-231F	ACACATACACATTTTGTGTCGTCATC
M36-1015R	TCATGAGGAATCTCTCTCTTGAC
M37-255F	CGTCCAATGCAATCTTCTCTTC
M37-951R	AGGAGTAGTTGAATATGTGCC
M38-373F	GGTTCTGACTTTTGGTTGGTTC
M38-1012R	CTATCTGTCTCTCTTGGTCTAAGTG
M68-158F	CCAAGACATGAATCATGAGGAAAG
M68-896R	TACATGGAAATGTGTGTAAGGTG
M84-380F	TATATAATAGCGACATCAAAGTAG
M84-2466R	CTCTTTTCACATAGGCATCCATAC
Myb84-1307R	AACTCTTCCACATCTCTTTAAACC
M84-865R	AAAGGAGACTATATAATAGCTGGAGG
M87-1421F	CAATGCAATCAAAGTTGTGAATCC
M87-1987R	TATTTCCCTTCCCCTCAATCTTG

Oligonukleotide für Screening in der UWBC-Kollektion

M37-4F	TCAGACAGTTCCATATAGTTCACTGGTC
M37-5R	TTTGCCCAGGTTTACTTTCAACAATTTA
M38-2-F	CATTGACTTGAGCGTTTCCAATACATAGA
M38-3R	TCAAGTGATGAACCTAGCTGATGGATAA
M68-3F	GACATCTTCCATCACATGAAGGACTATCT
M68-5R	AGTCCCTTAATGTAATTGGTGATCGATG
M84-4-F	GTTTGGCAATTTTGTTCACCTACCATAAC
M84-4R	AAGAAACAGACTAGTGACTTGCTAGGAAT
M87-1-F	AAGCTCGTTGAATATACTGGATCAGGCAT
M87-2R	GTAGAAACATCAAGTCCTAGGATTCCCAT

zu Kap. 3.7Oligonukleotide für die Synthese von *in-situ*-Sonden

M37-1987F	CAATCCCATCTTCTTCTTACAATCC
M37-2489R	GCTACCACTGCTTTTGTTC
M38-2010F	AACCCATCAACAAACCAACTTC
M38-2421R	TATCCTCCGTCTTGTTCGTC
Myb38-1950F	TCATCAGCATCCCCATCATC
Myb38-2419R	TATCCTCCGTCTTGTTCGTC
Myb84-1636F	CAAGAGATGATGGTGATGATGAAG
Myb84-2167R	AAAATTGCTTTGAATCAGAATAACAAG

zu Kap. 3.9

Oligonukleotide für Analysen mittels *Yeast two Hybrid System*

M36-1031F	TGATTTGTAAGAAAATGGGAAGAGC
M36-2533R	CTTATTAAACACTGTGGTAGCTCA
M36-384R	TTAGTCTTGACGATTCATTTGTTTCTG
M37-1036F	ATTCACTAACGAGAGAAAATGGGAA
M37-2549R	CAAGAGAGTCTAGAAGAAGTAGGAG
M37-384R	CTAGGCTGATGATGATGAATCAGAG
M38-1003F	TGACAGATAGAGAGATGGGTAGG
M38-2447R	CTCGAGATCAGTAGTACAACATGAA
M38-390R	TCAGGCTAAGTGGTGTGTGGAG
M68-1316F	CAAGAATCAAGAAAATGGGAAGAGC
M68-2681R	GTTACACATGATTTGGCGCAT
M68-390R	TTACATTCGCGCTTCTTGGAAC
M84-999F	CTAGGAGTACAAGTATGGGAAGAG
M84-381R	TTATTCTTGAAGCTCCTTGCCTT
M87-2031F	TGAATAAGAAGAAAATGGGAAGAGC
M87-3168R	TCTACTCATTATCGTATAGAGGATAATCA
M87-383R	CTATGTTGATGAAATGCCTTCCCT
AtbHLH137-1040F	CAATGGATGATTTCAATCTTCGTAG
AtbHLH137-1557R	CTAGGACGAGTCACGTTCTT
AtbHLH040-1037F	TGAAAATGGAAAATGGTATGTATAAAAAGA
AtbHLH040-1639R	ATCAGGGTTGGGAGTTGTG
AtbHLH087-343F	ATCCGATGGAAGGATTGGAAT
AtbHLH087-1471R	TGTCAACACTCTGGATGATGG
AtbHLH088-147F	CTATGGATTCTGACATAATGAACATGA
AtbHLH088-878R	ATCATCATCTAAGAATCTGTGCATTG
AtbHLH043-1023F	TACGAACCAAACAAACAAAATTATGAA
AtbHLH043-1721R	TCTAGATTAATTCTCCTACTCCTCTTC
AtbHLH037-998F	GGAGGATGGATAACTCCGAC
AtbHLH037-1699R	ATCATCTAAGAATCTGTGCATTTC
Gal4AD2	GAAGATACCCACCAAACCC
Gal4BD2	CCATCATGGAGGAGCAGAAG
Gal4BD3	GCGACATCATCATCGGAAGAG
Gal4AD3	GTTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACG

2.1.8 Lösungen und Kulturmedien

YPD

Bacto-Yeast-Extract (1%)
 Bacto-Pepton (2%)
 Glukose (2%)
 (Bacto-Agar (2%))

SD

Bacto-yeast nitrogen base, w/o amino acids
 (0,67%)
 Glukose (2%)
 (Bacto-Agar (2%))
 0,062% DO-Supplement (-Ade-His-Leu-Trp)

PBS	(Clontech)
0,1 M NaP _i , pH 8,0	- je nach Selektion wurden 0,002% His, 0,01% Leu,
0,1 M NaCl	0,002% Trp oder 0,02% Ade zugegeben
YEP	TBS
1% Pepton	0,02 M TrisHCL, pH 7,6
1% Yeast Extract	150 mM NaCl
0,5% NaCl	
0,5% Saccharose	
(1% Bacto-Agar)	

2.1.9 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Sequenzanalyse wurde die Software des UWGCG Programmpaket benutzt (Genetics Computer Group, 1997). Für Sequenz-Suchen und -Vergleiche wurde die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, Bethesda, USA oder der *Arabidopsis Information Resource (TAIR)* (Huala et al., 2001) verwendet.

2.2 Methoden

Gängige Labormethoden, auf die nicht näher eingegangen wird, wurden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

2.2.1 Isolierung von DNA

Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mittels des *Plasmid Midi Kits (Qiagen)* durchgeführt. Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde der *PCR Purification Kit (Qiagen)* verwendet. Pflanzen-DNA wurde nach Brandstaedter et al. (1994) isoliert.

2.2.2 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Die Isolierung von RNA aus Pflanzen erfolgte mittels *RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)*. Anschließend wurde die RNA einem DNaseI-Verdau (DNaseI, RNase-frei, Roche) unterzogen und mit dem *RNA cleanup Kit (Qiagen)* gereinigt.

2.2.3 cDNA-Synthese / RT-PCR

Zur cDNA-Synthese von gesamt RNA aus Pflanzen wurde die SuperscriptTM II Reverse Transkriptase von *Invitrogen* verwendet und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Es wurden ca. 2 µg RNA eingesetzt. 2 µl von 1:5 oder 1:10 Verdünnungen der Reaktion wurden für eine darauf folgende PCR eingesetzt.

2.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Wenn nicht anders angegeben, wurde eine PCR-Reaktion wie folgt angesetzt:

- 37 µl H₂O
- 5 µl 10x Puffer (Sambrook und Rusell, 2001)
- 3 µl MgCl₂ (50 mM)
- 0,5 µl dNTPs (jeweils 25 mM)
- 0,3 µl *Taq*-Polymerase (von Elisabeth Schäfer nach dem Protokoll von Pluthero (1993) hergestellt)
- 1 µl je Oligonukleotid (10 pmol/µl)
- 2 µl DNA (max. 20 ng)

Wenn nicht anders angegeben, wurde die PCR-Reaktion wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung 94°C 3 min
2. Denaturierung 94°C 15 sec
3. Annealing 60°C 30 sec
4. Extension 72°C 1 min
5. Extension 72°C 5 min

Die Schritte 2-4 wurden generell 34 mal wiederholt. Die verwendete PCR-Maschine war der T3 Thermocycler von *Biometra* oder der Multicycler PTC200 von *Biozym*. Bei PCRs für Klonierungen wurde zum Teil die Pfu-Polymerase von *Invitrogen* anstelle der *Taq*-Polymerase eingesetzt.

2.2.5 Nick-Translation

Zur radioaktiven Markierung der Sonden für Hybridisierungen wurde die Methode der Nick-Translation angewendet. Die Reaktion wurde nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. 50-100 ng Sonden-DNA, meist PCR-Produkte, wurden jeweils verwendet. Als radioaktives Nukleotid wurden 3 µl α ATP³² (10 µCi/µl) eingesetzt. Anschließend wurde die markierte Sonde mittels einer Sephadex-Säule (Nick Columns, *Pharmacia*) durch Ausschlusschromatographie gereinigt. Die so erhaltene Sonde wurde - wie unten beschrieben - zur Hybridisierung eingesetzt.

2.2.6 Southern-Blot und –Hybridisierung

Die Herstellung von DNA-Filtern zur Hybridisierung erfolgte wie bei Sambrook und Russell (2001) für den Kapillartransfer von DNA auf positiv geladene Nylonmembranen (Amersham) unter alkalischen Bedingungen beschrieben. Vor dem Blotting wurde das entsprechende Gel für 10 min in 1%iger HCl inkubiert, dann für 10 min in 0,4 M NaOH laut Protokoll des Membranherstellers. Als Transfer-Puffer wurde 0,4 M NaOH verwendet. Der Membran-Transfer erfolgte für mindestens 4 h oder ÜN. Anschließend wurde die Nylonmembran für 10 min in 2xSSPE gewaschen. Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten nach dem Protokoll des Membranherstellers. Abweichend vom Protokoll wurde in nur 30 ml Lösung 3-4 h vorhybridisiert und 200 µg/ml Kalbs-Thymus-DNA (CT-DNA) zum Blocken eingesetzt. Nach der Vorhybridisierung wurde die Lösung etwa um die Hälfte reduziert und die radioaktive Sonde nach 10 min Denaturierung bei 98°C (Kap.2.2.5) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 65°C in einer Glasröhre im Hybridisierungssofen (400 HY, *Bachofer*). Abschließend wurde der Filter ebenfalls nach Herstellerangaben gewaschen und ein Röntgenfilm 3-5 d lang bei -70°C exponiert.

2.2.7 Inkubationsbedingungen für Bakterien

E.coli-Bakterien wurden generell in LB-Medium bei 37°C ÜN inkubiert, während Agrobakterien in YEP-Medium bei 28°C für mindestens zwei Tage inkubiert wurden. Die

Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm auf einem Schüttler geschüttelt. Zur Platteninkubation wurde das jeweilige Medium mit 1% Agar verfestigt.

2.2.8 Inkubationsbedingungen für Hefen

Hefezellen wurden auf Vollmedium (YPD) oder Selektionsmedium (SD) bei 30 °C 3-5 d inkubiert. Flüssigkulturen wurden generell ÜN auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Hefen auf Platten wurden bei 4°C bis zu drei Monaten gelagert. Spätestens nach drei Monaten wurde ein neuer Ausstrich vorgenommen.

2.2.9 Wachstumsbedingungen für Pflanzen

Arabidopsis-Pflanzen wurden bei einer Tagestemperatur von 20 - 25 °C und einer Nachttemperatur von 10 – 15 °C im Gewächshaus oder in einer Klimakammer kultiviert. Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit), Landtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit).

2.2.10 Transformation und Selektion von Bakterien

Transformationen von *E.coli* mit Plasmiden wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt. Zur Transformation von Agrobakterien wurde 200µl kompetenten Zellen ca. 100 ng DNA zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen für jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C. Nach der Zugabe von 800 µl YEP wurden die Zellen für 2-4 h bei 28 °C geschüttelt. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurde dem Medium für *E. coli*- oder Agrobakterien je nach Selektionsmarker der transformierten Plasmide Ampicilin (200 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Gentamycin (25 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) oder Tetracyclin (10 µg/ml) beigefügt. Zur Selektion von Agrobakterien wurde Rifampicin (100 µg/ml) zugegeben.

2.2.11 Transformation und Selektion von Hefen

Die Transformation von Hefe erfolgte nach der LiAc-Methode von Gietz und Woods (2002). Zur Einfach- und Doppeltransformation von GAL4-Expressionsvektoren wurden 1 µg des jeweiligen Plasmids eingesetzt. Die Transformanten wurden auf entsprechendem Minimalmedium ohne Leucin und/oder Tryptophan selektiert. Zur Selektion auf Proteininteraktion fehlte dem Medium zusätzlich Histidin oder Histidin und Adenin. Um die Stringenz des Histidin Reportergens zu erhöhen, wurde der kompetitive Inhibitor 3-Aminotriazol (3-AT) in Konzentrationen von 5 mM bis 50 mM zugegeben.

2.2.12 Transformation und Selektion von Pflanzen

Arabidopsis-Pflanzen wurden mittels der *Floral-Dipping*-Methode nach Clough und Bent (1998) transformiert. Zur Selektion von transgenen Pflanzen in der T1 wurden die Sämlinge im 4-6 Blatt-Stadium mit 250 mg/l Glufosinat (BASTA®, Hoechst) gesprüht. Die Behandlung erfolgte zwei- bis dreimal im Abstand von 2 Tagen. Für die Segregationsanalyse in der T2 wurde gleichermaßen verfahren.

2.2.13 Sequenzierungen

DNA Sequenzierungen wurden durch die MPIZ Service-Einheit *Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung* (ADIS) auf *Applied Biosystems* (Weierstadt) *Abi Prism 377* und *3700* Sequenzierern mittels *BigDye-terminator chemistry* durchgeführt. Reagenzien wurden von *Applied Biosystems* bezogen.

2.2.14 RNA in situ-Hybridisierungen (RNA-ISH)

2.2.14.1 Beschreibung der Sonden

Die Positionen der *MYB*-Gen-Sonden sind in Bezug auf das offene Leseraster angegeben. Die Sonden sind jeweils spezifisch für Bereiche im dritten Exon der Gene. Die *MYB37*-Sonden umfassten die bp 934 bis 1436. *MYB38*-Sonden enthielten die bp 993 bis 1404 bzw. 933 bis

1402. Die Sonden zum Nachweis von *MYB84*-mRNA umfassten die bp 623 bis 1154. *LAS*-Sonden beinhalteten die bp 2 bis 1348 bezüglich des Startcodons auf der cDNA. *STM*-Sonden enthielten die bp 78 bis 1122 des offenen Leserasters. Die Fragmente (PCR-Produkte) wurden entweder in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung relativ zum T7-Promotor in den pGEMT-Vektor kloniert. Je 1 µg linearisierter Vektor wurde für die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase eingesetzt.

2.2.14.2 Präparationen und Durchführung der Hybridisierungen

RNA-ISH wurden wie von Coen et al. (1990) und Jackson (1991) beschrieben, durchgeführt mit einigen Modifikationen. Dem Fixierungspuffer wurde 0,03% Tween 20 zugegeben. Nach der Fixierung des Pflanzenmaterials erfolgten die Schritte bis zur Einbettung in Paraplast+ (*Kendall*) mit Hilfe des ASP300 (*Leica*). Das Entwässern des Pflanzenmaterials wurde ohne die Zugabe von NaCl durchgeführt, indem das Material bei RT jeweils eine Stunde in 50%, 70%, 90% und dreimal 100% Ethanol inkubiert wurde. Daran anschließend erfolgte zur Einbettung eine Inkubation von jeweils dreimal 1 h in HistoClear (*Agar Scientific*) und zweimal 1 h in Paraplast+ (60°C). Das Material wurde in einem dritten Paraplast+ -Bad ÜN bis zur eigentlichen Einbettung in Paraplast+ gelassen. Alle weiteren Rehydrierungs- bzw. Dehydrierungsschritte des Pflanzenmaterials oder der Schnitte (8µm) erfolgten ebenso ohne Zugabe von NaCl. Um das Gewebe für die Sonden zugänglicher zu machen, wurde neben der Proteinasebehandlung eine Inkubation der Schnitte in 0,2 M HCl für 10 min eingefügt. Für die Sondensynthese wurde ausschließlich Digoxigenin-11-rUTP (Roche) verwendet. Die Sondenhydrolyse nach Jackson (1991) wurde für die Generierung von 150 nts langen Fragmenten ermittelt und durchgeführt. Größtenteils wurde jedoch auf die Sondenhydrolyse ganz verzichtet. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C in einem Brutschrank (*Innovens 55 EBI*) von *Jouan*. Nach der Farbreaktion wurden die Schnitte gewaschen, mit 30% Glycerin bedeckt und mittels einfachem Durchlicht oder *Differential Interference Contrast* (DIC) unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.2.15 Screenings der UWBC-Population

Die PCRs für das Screening dieser Population wurde wie unter Kap. 2.2.4 angegeben durchgeführt.

2.3 Verwendete Abkürzungen

Verwendete Maßeinheiten richten sich nach dem System für internationale Maßeinheiten.

Chemische Elemente werden mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet.

A	Adenosin / Adenin
Abb.	Abbildung
AD	aktivierende Domäne des <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktors
Ade	Adenin
AS	Aminosäure
<i>AS1</i>	<i>ASYMMETRIC LEAVES 1</i>
<i>AS2</i>	<i>ASYMMETRIC LEAVES 2</i>
3-AT	3-Aminotriazol
BD	DNA-bindende Domäne des <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktors
bp	Basenpaar
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
<i>CLV</i>	<i>CLAVATA</i>
<i>CUC</i>	<i>CUP-SHAPED COTYLEDON</i>
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
GA	Gibberellinsäure
<i>GUS</i>	β -Glukoronidase-Gen
His	Histidin
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
<i>KNAT</i>	<i>KNOX</i> -Gene aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>KNOX</i>	<i>Knotted1</i> -ähnliche Homeobox-Gene
L	Leucin
<i>LAS</i>	<i>LATERAL SUPPRESSOR</i> aus <i>Arabidopsis</i>
Leu	Leucin
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
LM	laterales Meristem
<i>LOB</i>	<i>LATERAL ORGAN BOUNDARIES</i>

<i>Ls</i>	<i>Lateral suppressor</i> aus Tomate
M	molar
mRNA	Boten-RNA
nts	Nukleotide
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAM	Sprossapikalmeristem
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
T	Thymidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Trp	Tryptophan
ÜN	über Nacht
UTP	Uridin-Triphosphat
W	Tryptophan
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>

3 Ergebnisse

3.1 RT-PCR-Analyse der Blind-homologen MYB Gene in *Arabidopsis thaliana*

Zunächst wurde die Expression der *Blind*-homologen *MYB* Gene durch RT-PCR-Analyse charakterisiert. Mit der RT-PCR-Analyse wurde auch das Ziel verfolgt, innerhalb der Untergruppe eventuell die Zahl der Kandidaten, die für eine *Blind*-ähnliche Funktion in Frage kommen, eingrenzen zu können. Für ein Gen, das eine dem *Blind*-Gen entsprechende Funktion in *Arabidopsis* vermittelt, ist eine Expression in Geweben und Organen zu erwarten, die in der *blind*-Mutante eine phänotypische Veränderung zeigen (Kap. 1).

In den untersuchten Geweben – Sprossspitzen, geschlossene Blütenknospen, offene Blüten, Rosettenblätter, Internodien und Wurzeln – waren alle 6 Mitglieder jeweils am stärksten in der Wurzel exprimiert. *MYB36*-mRNA wurde ausschließlich in der Wurzel nachgewiesen. *MYB37* zeigte neben der Expression in der Wurzel schwache Banden in Blütenknospen und Sprossspitzen. Das gleiche gilt für *MYB68*, wobei die Banden in Blütenknospen und Sprossspitzen allerdings sehr schwach waren. *MYB38* Transkripte fanden sich in jedem untersuchten Gewebe. Neben der Wurzel wurde eine stärkere Expression noch in Blütenknospen, offenen Blüten und im Sprossapex nachgewiesen. In den restlichen Geweben war die Transkriptakkumulation schwächer. *MYB84* zeigte eine ähnliche Transkriptverteilung wie *MYB38*, jedoch war hier die Intensität der Expression deutlich schwächer als bei *MYB38*. Im Sprossapex war die Expression mittels RT-PCR kaum nachweisbar. *MYB87*-Transkriptakkumulation fand sich wie erwähnt in Wurzeln, außerdem in Blütenknospen und sehr schwach in Blüten sowie im Sprossapex (Abb. 3-1). Aufgrund der ausschließlichen Expression von *MYB36* in der Wurzel wurde dieses Gen in nachfolgenden Untersuchungen weitgehend zurückgestellt. *MYB38* ist hinsichtlich des Expressionsmusters und der relativen Expressionsintensitäten am ähnlichsten zum *Blind*-Gen aus Tomate (Schmitz et al., 2002). Somit weist *MYB38* neben der höchsten Sequenzähnlichkeit zu *Blind* auch die ähnlichste Expression auf.

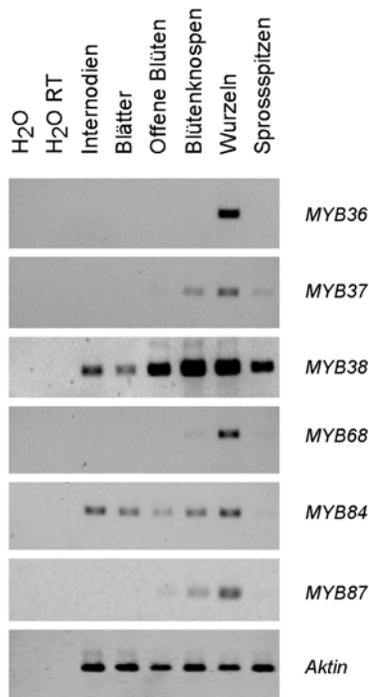


Abb. 3-1: RT-PCR Analyse der Blind-homologen R2R3 MYB Gene aus *Arabidopsis thaliana*. Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Geweben von *Columbia* Wildtyp geerntet und mittels RT-PCR Analyse charakterisiert (32 PCR-Zyklen). Aktin cDNA wurde amplifiziert, um die eingesetzten cDNA Mengen zu kontrollieren (29 PCR-Zyklen).

3.2 Identifizierung von Knock-out Linien

Verschiedene Kollektionen von Insertionslinien wurden nach Knock-out-Linien in den erwähnten *MYB*-Genen durchsucht. Pro Gen wurden dabei insgesamt ca. 200 000 Linien nach einer Insertion durchsucht. Die Populationen von Burkhard Schulz, Cszaba Koncz, „ZIGIA“ und die Kollektion des University of Wisconsin Biotechnology Center (UWBC) wurden mit einer PCR gestützten Strategie durchsucht. Zum anderen wurden *in silico* Suchen durchgeführt. Insertionslinien wurden für *MYB36*, *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* gefunden. Für *MYB68* wurden Kandidaten bestätigt.

Die Suche nach Insertionslinien in der ZIGIA-Population (Baumann et al., 1998, Wisman et al., 1998a) ist auf einen Southern Blot-Nachweis der PCR-Produkte gestützt. In einer Einzellinie der Kollektion, die mit dem *ENHANCER-1 (EN-1)*-Element aus Mais mutagenisiert wurde, befinden sich im Durchschnitt sechs Insertionen. Mit den Linien der Population wurden nach Spaltung der genomischen DNAs und Ligation von Adaptern PCR-Reaktionen mit Adapter- und *EN-1*-spezifischen Primern durchgeführt, wodurch DNA-Sequenzen, die ein *EN-1*-Element flankieren, amplifiziert wurden. Die PCR-Produkte wurden auf DNA-Arrays

angeordnet, so dass jeder Position eine bestimmte dazugehörige Pflanzenlinie zugeordnet werden kann (Steiner-Lange et al., 2001). Bei der Suche nach Insertionen in den *MYB*-Genen wurden die DNA-Arrays mit genspezifischen Sonden hybridisiert. Positiven Signalen wurden entsprechende Samen zugeordnet. Die so identifizierten Insertionslinien wurden mittels PCR und Sequenzierung überprüft und eventuell zusätzlich durch eine Southern-Blot-Analyse charakterisiert.

In einer ersten Suche, bei der unter stringenten Bedingungen mit Sonden hybridisiert wurde, die das offene Leseraster (ORF; engl: open reading frame) der Gene ohne die konservierte *MYB*-Domäne umfassten, wurden zwei Hybridisierungsbanden zu *MYB84* gefunden und bestätigt. Die Sequenzanalyse diagnostischer PCR-Produkte ergab, dass sich die eine *EN-1*-Insertion 61bp 3' vom Stopkodon befand, während das andere *EN-1*-Element 86 bp 3' vom Startkodon inseriert hatte. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Linie mit der T-DNA-Insertion im ersten Exon des Gens verwendet (Abb. 3-3). Bei einer zweiten Durchsichtung der ZIGIA-Population wurden genspezifische Sonden verwendet, die im Promotorbereich der Gene lagen. Hierbei wurden Insertionslinien für *MYB38*, *MYB84* und für *MYB87* identifiziert. Die beiden *MYB38*-Insertionen befinden sich 400 bp bzw. 2,1 kb 5' des Startkodons. Für die erstgenannte Linie wurde eine RT-PCR durchgeführt, um in einer semiquantitativen Analyse zu untersuchen, ob die Transkriptakkumulation im Vergleich zu Wildtyppflanzen verändert ist. Es wurde keine Abweichung zu der Wildtypkontrolle gefunden (Daten nicht gezeigt). Diese Linien wurden in die unten erwähnten Analysen nicht mit einbezogen. Bei *MYB84* befanden sich die Insertionen 2,2 kb 5' vom Startkodon bzw. 2 kb 3' davon, wie durch Southern-Blot-Analyse bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Linien wurden nicht für weitere Analysen verwendet. *MYB87* hatte eine Insertion 3,4 kb 5' vom ATG, wie durch Southern-Blot-Analyse gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Linie wurde ebenfalls nicht in weitere Analysen einbezogen.

Die Population des Biotechnologie-Zentrums der Universität Wisconsin besteht aus *Arabidopsis* Pflanzen (Ökotyp *Wassilewskija*), die mittels T-DNAs mutagenisiert wurden (Krysan et al., 1999). Pro Linie sind im Durchschnitt ein bis drei Insertionen im Genom enthalten. Für die Durchsichtung der Kollektion wurden auf DNA-Pools der Linien zwei PCR-Reaktionen durchgeführt mit zwei genspezifischen Oligonukleotiden und einem T-DNA-

spezifischen Oligonukleotid. Die Produkte aller Reaktionen wurden mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und mit genspezifischen Sonden in einem Southern-Blot-Experiment untersucht. Bei einem positiven Ergebnis (Bande) wurde eine weitere PCR-Reaktion mit einem zweiten genspezifischen Oligonukleotid durchgeführt, um das erste PCR-Produkt zu reamplifizieren. Wurde ein Produkt erhalten, folgte eine Sequenzierung dieses Produkts, um die Insertion zu verifizieren und die genaue Insertionsstelle zu identifizieren. Diese Prozedur erfolgte auf immer kleiner werdenden DNA-Pools, bis schließlich durch Analyse von 10er-Pools entsprechende Samen-Gemische identifiziert wurden. Die Insertionen wurden dann durch molekulare Analysen einzelner Pflanzen einer bestimmten Pflanzenlinie zugeordnet. Bei dieser Suche wurden Kandidaten für Insertionen in *MYB38*, *MYB68* und *MYB84* gefunden. Zwei Kandidaten für *MYB38* (1. Exon) und *MYB68* (3. Exon) konnten bis zu 225er DNA-Pools durch Sequenzierung von diagnostischen PCR-Produkten nachgewiesen werden, aber nicht mehr in einzelnen Linien gefunden werden. Für *MYB38* wurde eine weitere Linie identifiziert, bei der die T-DNA in das zweite Intron des Gens inseriert war. Diese Insertion wurde durch Sequenzanalysen verifiziert. Für die weiteren Analysen der *MYB38*-Funktion wurde diese UWBC-Linie mit der T-DNA-Insertion im zweiten Intron verwendet (Abb. 3-3).

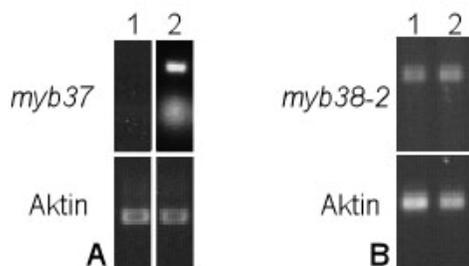


Abb. 3-2: Analyse der Genexpression in *MYB*-Insertionslinien. Gesamt-RNA von Blütenknospen wurde mittels RT-PCR analysiert. **(A)** PCRs (32 Zyklen) auf cDNA mit genspezifischen Oligonukleotiden für *MYB37*. Mit Oligonukleotiden, die die Insertionsstelle flankieren, wurde kein Produkt erhalten (1); Oligonukleotide, die vor der Insertionsstelle binden, lieferten ein Produkt (2). **(B)** PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden von *MYB38* auf cDNA von *Col*-Wt (1) und der Promotorinsertionslinie *myb38-2* (2; beide 29 Zyklen). PCRs für Aktin zur Kontrolle der eingesetzten cDNA Menge mit 26 Zyklen.

Zum anderen wurden die Sammlungen der „GABI-KAT“ Linien (Rosso et al., 2003) sowie der „SALK“-Linien (Alonso et al., 2003) *in silico* durchsucht. Innerhalb der GABI-KAT Linien wurde eine T-DNA-Insertion in *MYB37* 200bp 5' vom Startkodon mittels diagnostischer PCR und Sequenzierung bestätigt. In einer RT-PCR-Analyse wurde getestet, ob die *MYB37*-

Transkriptakkumulation dieser Insertionslinie gegenüber dem Wildtyp verändert ist. Hier wurde keine Veränderung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Diese Linie wurde in weiteren Untersuchungen nicht verwendet.

Bei einem Screening der SALK-Kollektion wurden Insertionen in *MYB37* und *MYB38* gefunden und verifiziert. Die T-DNA im *MYB37*-Gen befand sich 297 bp 3' des Startkodons. Für die nachfolgenden Phänotypenanalysen wurde diese SALK-Linie mit der T-DNA-Insertion im dritten Exon von *MYB37* verwendet (Abb. 3-3). Eine weitere Linie (*myb38-2*) enthielt eine Insertion ca. 550 bp vor dem Startkodon des *MYB38*-Gens. *myb38-2* wies in der semiquantitativen RT-PCR im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in der Intensität der Transkriptakkumulation auf (Abb. 3-2 B). Aufgrund dessen wurde diese Linie nicht weiter analysiert. Abb. 3-3 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit charakterisierten Insertionslinien. Alle verwendeten Allele wurden mittels RT-PCR untersucht. Zur cDNA Synthese wurde Gesamt-RNA eingesetzt, die aus Blütenknospen isoliert wurde. Für diese Analysen wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet, die die Insertionsstelle flankieren. Die Analysen zeigten, dass die Insertionen einen vorzeitigen Transkriptionsabbruch zur Folge haben. PCR-Reaktionen mit Oligonukleotiden, die beide vor der Insertionsstelle binden, ergaben dagegen ein PCR-Produkt. Exemplarisch ist eine RT-PCR-Analyse für die *MYB37*-Insertionslinie in Abb. 3-2 A dargestellt.

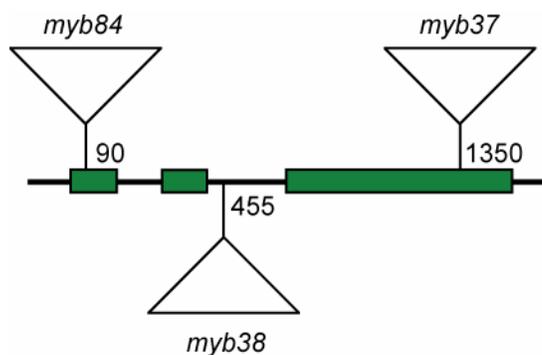


Abb.3-3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Insertionslinien. Positionen der T-DNA-Insertionen (Dreiecke) in den Genen sind bezüglich des offenen Leserasters der Gene angegeben. Grüne Rechtecke symbolisieren Exons, Linien repräsentieren Introns bzw. 5'- oder 3'-nicht translatierte Sequenzen.

3.3 Etablierung einer Methode zur Analyse des Verzweigungsphänotyps in *Arabidopsis thaliana*

3.3.1 Dekapitierungsanalyse

Die gefundenen Insertionen wurden durch Sequenzierung von diagnostischen PCR-Produkten bestätigt. Für die Phänotypanalyse wurden ausschließlich homozygote Linien verwendet, die durch PCR oder mittels Southern-Blot-Analyse identifiziert worden waren. Die Insertionslinien *myb37*, *myb38* und *myb84* wurden zunächst mittels Dekapitierung auf eine mögliche Veränderung im Verzweigungsphänotyp untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Pflanzen im Kurztag angezogen, wodurch viele Rosettenblätter gebildet werden. Somit steigt das Potenzial der Pflanzen Seitentriebe zu bilden, die aus den Blattachsen hervorgehen. Die Pflanzen wurden entweder nach vier Wochen in den Langtag transferiert, um das Blühen zu induzieren, oder bis zur Blüte im Kurztag kultiviert. Die Primärfloreszenz (ca. 10-15 cm lang) wurde nach der Blühinduktion bei einer Länge von 10-15 cm entfernt. Diese Methode fördert das Austreiben der vorhandenen Achselknospen und erleichtert so die Analyse. Die aus der Rosette ausgetriebenen Parakladien wurden darauf folgend ebenfalls dekapitiert, um die sekundäre Verzweigung zu analysieren. Die beschriebenen Experimente wurden für jede der oben genannten Insertionslinien mindestens einmal wiederholt; dabei wurden jeweils 20 Pflanzen analysiert.

Die Analysen ergaben, dass sich die Anzahl der primären und sekundären Parakladien in keinem Fall von den entsprechenden Wildtyppflanzen, die als Kontrollen parallel dazu analysiert wurden, unterschied. Bei keiner Insertionslinie von *MYB37*, *MYB38* oder *MYB84* konnte mittels dieser Methode ein Defekt in der Anlage von Achselmeristemen nachgewiesen werden.

*3.3.2 Makroskopische Analyse der Verzweigung in *Arabidopsis thaliana**

Um das Verzweigungsverhalten der Insertionslinien detaillierter analysieren zu können, wurde eine neue Untersuchungsmethode entwickelt, bei der die Pflanzen mit Hilfe eines Binokulars untersucht wurden. Die Pflanzen wurden im Bereich des Hypokotyls von der Wurzel getrennt,

so dass der Zusammenhalt der Rosette gewährleistet blieb. Die Infloreszenz wurde nach ihrer Auswertung unter dem Binokular ebenfalls entfernt, damit die Rosetten der Pflanzen leichter zu handhaben waren. Für die Analyse der vegetativen Sprossverzweigung wurde die Rosette kopfüber gehalten und ausgehend vom ältesten Rosettenblatt jede einzelne Blattachsel unter dem Binokular ausgewertet. Nach der Auswertung einer Achsel wurde das dazugehörige Rosettenblatt entfernt, um die nächstjüngeren Rosettenblattachsen zugänglich zu machen. Auf diese Weise war gewährleistet, dass eindeutig entschieden werden konnte, ob eine Achselknospe vorhanden war oder nicht. Dass die untersuchten Blattachsen tatsächlich keine Seitentriebe oder andere Strukturen aufwiesen, wurde zusätzlich durch eine Analyse nach der Dekapitierung der Primärinfloreszenz untersucht. Die Dekapitierung vermindert die Apikaldominanz, wodurch das Auswachsen von eventuell vorhandenen Anlagen aus den Blattachsen gefördert wird. Nach dem Blühen der Pflanzen wurden die Infloreszenzen (10-15 cm lang) entfernt und die Entwicklung einzelner als leer charakterisierter Blattachsen über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen verfolgt. In keinem Fall wurde ein Auswachsen von Seitentrieben oder anderen Strukturen beobachtet. Diese Untersuchung bestätigte, dass es sich um leere Blattachsen handelte, in denen kein funktionales Achselmeristem angelegt worden war, und nicht um einen Defekt im Austreiben von bereits vorhandenen Anlagen.

3.4 Analyse der Anlage von Achselmeristemen in myb-Insertionslinien unter Kurztagbedingungen

3.4.1 Allgemeine Bemerkungen zur Analyse der Insertionslinien

Zunächst wurden die Linien *myb37*, *myb38* und *myb84* auf einen veränderten Verzweigungsphänotyp hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Linien unter Kurztagbedingungen kultiviert, da dann viele Rosettenblätter gebildet werden und somit das Potenzial Seitentriebe zu bilden größer ist. Dies erleichtert eine Analyse der Sprossverzweigung. Falls nicht besonders darauf hingewiesen wird, wird hier von Anzuchtbedingungen der Pflanzen unter Kurztagbedingungen ausgegangen. Nach Beginn der Blüte wurden die Pflanzen für ein bis zwei Wochen unter Langtag-Bedingungen kultiviert, bis

die Phänotypanalyse der Infloreszenzen und der Rosetten erfolgte. Die Langtagperioden fördern das Auswachsen von Seitentriebknospen. Als Kontrollen wurden parallel zu den Insertionslinien jeweils entsprechende Wildtyppflanzen angezogen. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden alle ein- bis zweimal wiederholt; pro Experiment wurden 20 Pflanzen ausgewertet. In allen Fällen bestätigt sich das erste Ergebnis.

3.4.2 Analyse von Einzelmutanten

3.4.2.1 Analyse der *myb37*-Insertionslinie

Die *myb37*-Insertionslinie, die eine T-DNA-Insertion im dritten Exon enthält (Abb. 3-3), weist eine starke Reduktion der Anzahl von Seitentrieben aus der Rosette auf (Abb. 3-4 C, D). Besonders ist hierbei die Seitentriebbildung früh in der vegetativen Entwicklung betroffen. Aus den ältesten Rosettenblattachsen gingen in der Regel keine Seitentriebe hervor, während in Richtung der jüngsten Rosettenblätter zunehmend Achseltriebe gebildet wurden und nahezu 100% der Pflanzen in diesen Positionen Seitentriebe aufwiesen. *myb37*-Pflanzen zeigen also einen akropetalen Gradienten der Seitentriebbildung (Abb. 3-4 F). Aus den beschriebenen Experimenten kann geschlossen werden, dass die Mutation im *myb37*-Gen einen Defekt in der Anlage von Achselmeristemen in der frühen vegetativen Entwicklung nach sich zieht. In der reproduktiven Phase zeigte sich keine Reduktion in der Bildung von lateralen Meristemen in den Achseln der Stängelblätter (Abb. 3-4 A).

Hinsichtlich der Blütenmorphologie war ebenfalls keine offensichtliche Abweichung vom Wildtyp zu entdecken. Sowohl die Anzahl der Blütenorgane als auch die Anordnung entsprachen dem Wildtyp. Dagegen schien die Abszission der Petalen verzögert zu sein. Insgesamt unterschied sich der Habitus der Insertionslinie nicht wesentlich von Wildtyppflanzen (Abb. 3-4 A). Allerdings wiesen *myb37*-Pflanzen weniger Nodien mit Stängelblättern auf als entsprechende Kontrollen (Abb. 3-4 G). Die *myb37*-Pflanzen zeigten im Zustand der Samenreife außerdem einen signifikant längeren Primärstängel als die Wildtyp-Kontrollen (Abb. 3-4 E). Im Durchschnitt betrug die Infloreszenzlänge von *myb37* Pflanzen

34,9 cm, die der *Columbia* Wildtyppflanzen 22 cm. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Mutanten im Kurztag ca. vier Tage früher blühten als Wildtyppflanzen ($78,9 \pm 2$ Tage gegenüber $83,2 \pm 2$ Tagen) (Abb. 3-4 B). Die Verzweigung der Wurzeln wurde untersucht, indem sterilisierte Samen auf Agar-Medium ausgelegt und die Platten im Lichtraum vertikal aufgestellt wurden. Die Wurzel-Verzweigung der *myb37*-Linie wich nicht offensichtlich von der des Wildtyps ab (Daten nicht gezeigt).

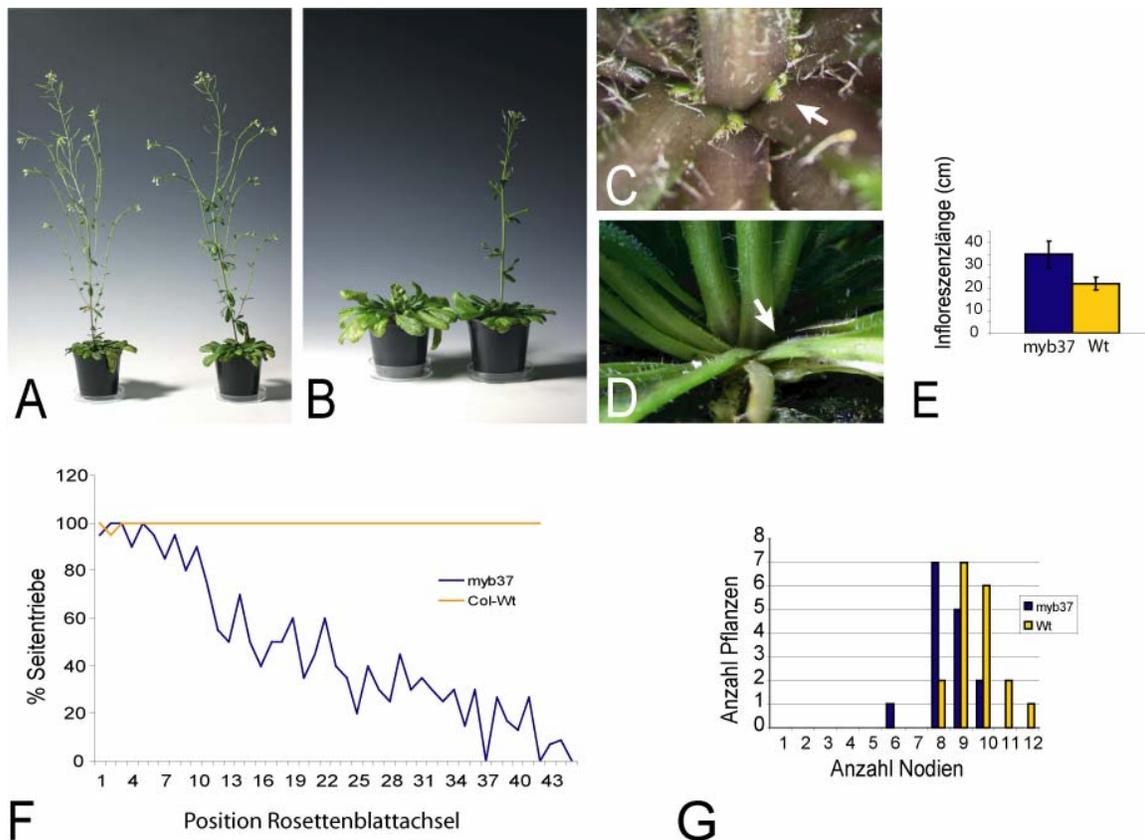


Abb. 3-4: Phänotyp von *myb37*-Pflanzen. (A) Habitus der *myb37* Mutante (links) und des *Columbia*-Wildtyps (rechts). (B) Unter Kurztagbedingungen blühte *myb37* (rechts) früher als Wildtyp (links). (C) Wildtyppflanzen bildeten in jeder Rosettenblattachsel eine Seitentriebknospe (Pfeil). (D) *myb37* Pflanzen wiesen im unteren Bereich der Sprossachse viele leere Rosettenblattachsen auf (Pfeil). (E) Die *myb37*-Insertionslinie besitzt eine signifikant längere Infloreszenz als Wildtyppflanzen (n=20). (F) Das Diagramm zeigt, in wieviel Prozent der Pflanzen in einer bestimmten Achselposition Seitentriebe detektiert wurden (n=20). Das Potenzial von *myb37*, Achselmeristeme zu bilden, folgt einem akropetalen Gradienten entlang der Sprossachse. 1 stellt die jüngste Rosettenblattachsel dar, während 43 für die älteste Rosettenblattachsel steht. (G) Die Infloreszenz von *myb37* bildete weniger Nodien mit Stängelblättern als der Wildtyp (n=20). 1 bezeichnet das älteste Nodium, 12 das jüngste.

In einem weiteren Experiment wurden induzierte *myb37*-Pflanzen auf ihren Verzweigungsphänotyp hin untersucht. Diese Pflanzen wurden vom Tag ihrer Aussaat an 28d in kurzen Fotoperioden kultiviert. Danach wurden sie in lange Fotoperioden transferiert und bis zur Auswertung nach dem Ansetzen von Schoten wachsen gelassen. Sowohl *Columbia* Wildtyp- als auch *myb37*-Pflanzen verhielten sich in diesem Experiment ähnlich wie wenn sie ausschließlich unter Kurztagbedingungen angezogen wurden. Durch die Induktion nach vier Wochen bildeten beide Genotypen wie erwartet weniger Rosettenblätter als Pflanzen, die vollständig unter Kurztagbedingungen zum Blühen gebracht wurden. Während *Columbia*-Pflanzen unter diesen Bedingungen in fast jeder Blattachsel einen Seitentrieb vorwiesen, zeigte die *myb37*-Linie den gleichen akropetalen Gradienten in der Bildung von Achselmeristemen, wie er auch bei Kurztagpflanzen gefunden wurde (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass beim *Columbia*-Ökotyp die anfängliche Zeit von vier Wochen Kurztag nicht hinreichend ist, damit in jeder Blattachsel ein laterales Meristem angelegt wird.

3.4.2.2 Analyse der *myb38*- und *myb84*-Insertionslinien

Für *myb38* und *myb84* (Abb. 3-3) stellte sich heraus, dass keine Unterschiede zu den Wildtypen, die in jeder Blattachsel einen Seitentrieb bilden (Keimblätter nicht berücksichtigt), vorhanden waren. Beide Insertionslinien zeigten unter Kurztagbedingungen keine Beeinträchtigung der Fähigkeit, Achselmeristeme sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Phase zu bilden (Daten nicht gezeigt). Es wurden keine anderen Veränderungen der Phänotypen im Vergleich zu Wildtypkontrollen festgestellt.

3.4.3 Analyse von Doppel- und Tripelmutanten

Um Funktionen von *Blind*-homologen Genen aufzudecken, die eventuell durch Redundanz innerhalb von Mitgliedern der *R2R3-MYB*-Gen Untergruppe verdeckt werden, wurden alle möglichen Doppelmutanten der vorhandenen Insertionslinien und eine Tripelmutante hergestellt.

3.4.3.1 Analyse der *myb37 myb38* Doppelmutante

myb37 myb38 Doppelmutanten zeigten eine erhebliche Verstärkung des Verzweigungsdefektes im Vergleich zu *myb37* Pflanzen (Abb. 3-4). In den meisten Blattachsen der Rosette produzierten die Doppelmutanten keine Seitentriebe (Abb. 3-5. B, C). Der akropetale Gradient, der die *myb37*-Mutante charakterisiert, ist hier aufgehoben (Abb. 3-5 G). Die Verzweigung war entlang der gesamten vegetativen Sprossachse reduziert. Im oberen Bereich der Rosette wurden keine oder nur bis zu 20% der Seitentriebe gebildet. Im unteren Teil der Rosette war das Verzweigungsmuster ähnlich, es wurden maximal bis zu 50% Seitentriebe gebildet.

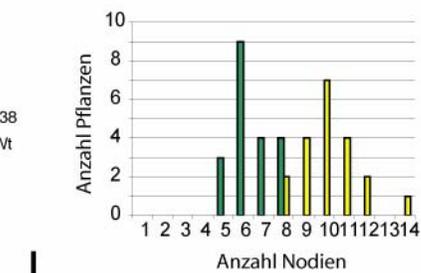
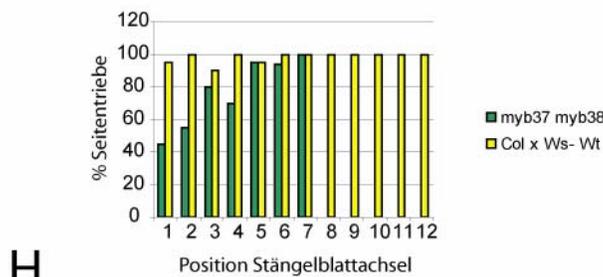
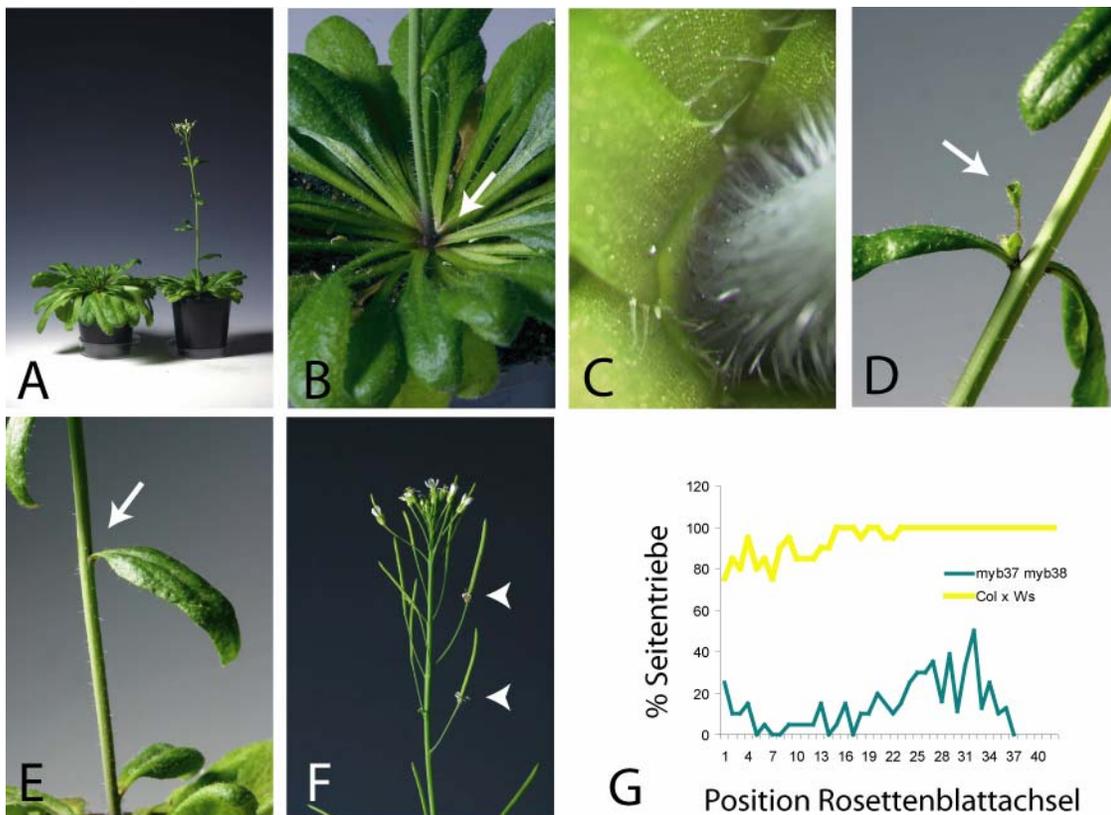


Abb. 3-5: Phänotyp der *myb37 myb38* Doppelmutante. (A) Der Habitus von *myb37 myb38* Pflanzen (rechts) ist ähnlich wie der von Wildtyppflanzen (links). Die Doppelmutante blüht im Kurztag früher als Wildtypkontrollen. (B) In *myb37 myb38* Pflanzen ist die Seitentriebbildung in der Rosette stark unterdrückt, so dass die Mehrheit der Achseln leer bleibt (Pfeil). (C) Nahaufnahme einer Rosettenblattachsel von *myb37 myb38*, in der keinerlei Organanlagen vorhanden sind. (D) Aberranter Seitentrieb in einer Stängelblattachsel, der mit der Bildung einer becherförmigen Struktur terminiert (Pfeil). (E) Leere Stängelblattachsel (Pfeil) einer *myb37 myb38*-Infloreszenz. (F) Verzögerte Abszission von Petalen in der Mutante (Pfeilspitzen). (G) Im Diagramm dargestellt ist der Prozentsatz, mit dem Seitentriebe in einer Blattachsel an einer bestimmten Position gefunden wurden (n=20). Die Verzweigung von *myb37 myb38* in der vegetativen Phase ist über die gesamte Sprossachse hinweg stark reduziert. In den meisten Achseln wird kein funktionales laterales Meristem angelegt, so dass höchstens 50% der Pflanzen in einer bestimmten Achsel Seitentriebe bilden. (1) Jüngste Rosettenblattachsel, (40) älteste Rosettenblattachsel. (H) In der Infloreszenz ist die Seitentriebbildung in den älteren Stängelblattachsen inhibiert und nimmt in einem akropetalen Gradienten zu (n=20). (1) Ältestes Stängelblatt, (12) jüngstes Stängelblatt. (I) Die Anzahl der Nodien mit Stängelblättern ist in der Doppelmutante im Vergleich zu Wildtypkontrollen deutlich reduziert (n=20).

Darüber hinaus war die Sprossverzweigung auch in der reproduktiven Phase deutlich reduziert (Abb. 3-5 H). In den Achseln der ältesten Blätter blieb die Bildung von lateralen Meristemen häufig aus. Richtung Sprossspitze wurde eine Zunahme der Seitentriebbildung (akropetaler Gradient) festgestellt. In manchen Stängelblattachsen der Doppelmutante entwickelten sich blattartige Strukturen anstelle von Seitentrieben, was auf einen frühen Verlust der Achselmeristem-Funktion hindeutet. Außerdem wurden becherförmige Achseltriebe beobachtet (Abb. 3-5.D), die in ihrer Form an die fusionierten Keimblätter von *cuc1 cuc2*-Doppelmutanten (Aida et al., 1999) erinnerten.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass sowohl *MYB37* als auch *MYB38* eine Funktion bei der Anlage von Achselmeristemen nicht nur in der vegetativen, sondern auch in der frühen reproduktiven Phase innehaben. Der frühzeitige Verlust der Meristemaktivität in einigen lateralen Meristemen der reproduktiven Phase offenbart neben der Rolle von *MYB37* und *MYB38* bei der Anlage von Achselmeristemen auch eine Funktion in der Aufrechterhaltung von Meristemen. Ferner produzierten die Mutanten in der reproduktiven Phase weniger Nodien mit Stängelblättern als die Wildtypkontrollen (Abb. 3-5 I). Dies deutet darauf hin, dass diese Phase der Entwicklung in den Mutanten verkürzt ist. Neben dem Verzweigungsphänotyp wiesen diese Doppelmutanten einen signifikant längeren Primärstängel auf als die Kontrollen (durchschnittlich 30,8 cm gegenüber 22 cm). Ebenso ließ sich hier der bereits bei der *myb37* Mutante festgestellte Abszissionsphänotyp beobachten (Abb. 3-5 F). Die *myb37 myb38*

Doppelmutante blühte nach $74,5 \pm 2$ Tagen, während entsprechende Col x Ws-Kontrollpflanzen erst nach $78,1 \pm 3$ Tagen blühten (Abb. 3-5 A). Ein veränderter Wurzelphänotyp wurde auch bei dieser Doppelmutante wie in allen nachfolgend erwähnten Kombinationen nicht beobachtet.

3.4.3.2 Analyse der *myb37 myb84* Doppelmutante

Die *myb37 myb84* Doppelmutante zeigte ebenfalls eine Verstärkung des *myb37*-Verzweigungsdefekts. Die Bildung von Seitentrieben ist in der Doppelmutante im Vergleich zur Einzelmutante deutlich herabgesetzt. Dies zeigt sich vor allem in den Achseln der jüngsten Rosettenblätter (Abb.3-6 A). Von der Basis der Rosette, wo keine Seitentriebe mehr gebildet werden bis zur Spitze, wo 40-65% Seitentriebe gebildet werden, nimmt die Kapazität, funktionale Achselmeristeme anzulegen, mit einem flach verlaufenden Gradienten zu. Im mittleren und unteren Bereich der Rosette mit den älteren Rosettenblattachsen entspricht die Verzweigung dieser Doppelmutante der in *myb37* Pflanzen (Vgl. Abb. 3-4 F). In der Mitte der Sprossachse werden 30-40% der Seitentriebe gebildet, während in Richtung der Basis der Rosette die Sprossverzweigung abnimmt. In den Achseln der ältesten 3-5 Rosettenblätter werden schließlich gar keine Achselknospen mehr angelegt.

In der reproduktiven Phase glich die Doppelmutante der *myb37* Mutante. Neben der reduzierten Anzahl an Nodien mit Stängelblättern (Abb. 3-6 B) und der längeren Infloreszenz (Abb. 3-6 C) ließ sich keine offensichtliche Abweichung vom Wildtypphänotyp feststellen. Aus dem Phänotyp dieser Doppelmutante wird eine Rolle von *MYB84* bei der Anlage von lateralen Meristemen in der späteren vegetativen Entwicklungsphase ersichtlich.

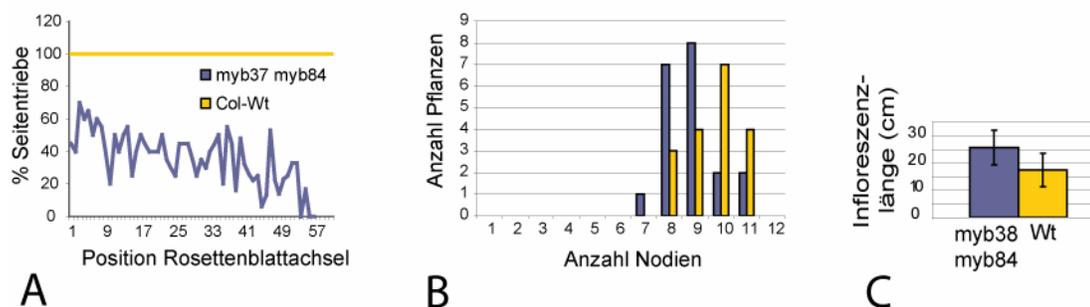


Abb. 3-6: Analyse des Phänotyps der *myb37 myb84* Doppelmutante. (Diagramm A) In *myb37 myb84* Pflanzen werden entlang der gesamten Sprossachse weniger Achselmeristeme angelegt. Das Potenzial, Seitentriebe zu bilden, nimmt in einem flach verlaufenden Gradienten von den ältesten Rosettenblattachsen (57) zu den jüngsten Rosettenblattachsen (1) hin zu. Angegeben ist der Prozentsatz an Seitentrieben, die in einer Achsel an einer bestimmten Position gefunden wurden. (Diagramm B) Die Anzahl der Nodien mit Stängelblättern in der Infloreszenz ist in der Doppelmutante reduziert. (Diagramm C) Die Infloreszenzlängen von *myb37 myb84* Pflanzen sind erhöht im Vergleich zu *Columbia* Wildtyppflanzen.

3.4.3.3 Analyse der *myb38 myb84* Doppelmutante

Die *myb38 myb84* Doppelmutante zeigte im Vergleich zu Kontrollpflanzen nur geringe Veränderungen im Muster der Sprossverzweigung (Abb. 3-7 A-C). In dieser Mutante waren vor allem Achseln der jüngsten Rosettenblätter betroffen, die sich im oberen Bereich der Rosette befinden. In diesem Bereich, der sich bis zur Mitte der Sprossachse ausdehnte, war die Bildung von Seitentrieben reduziert. In 30-60% der jüngeren Achseln wurden Seitentriebe angelegt. Ab der Mitte der Sprossachse (ca. 50% Seitentriebe) wurden einem basipetalen Gradienten folgend zunehmend Seitentriebe gebildet, so dass in den ältesten Blattachsen wie in Kontrollpflanzen zu 100% Seitentriebe zu finden waren (Abb. 3-7 D). Bei diesem Experiment ist zu beachten, dass auch die Kontrollpflanzen (F_2 von *Columbia* x *Wassilewskija*) einen Verzweigungsdefekt aufwiesen. Dieser äußerte sich vom Verlauf her ähnlich zu dem oben beschriebenen Phänotyp für die Doppelmutante *myb38 myb84*. An der Rosettenspitze wurden pro Achsel um die 80% Seitentriebe gebildet, während im mittleren Bereich ca. 90% Achselknospen vorlagen und in den Blattachsen an der Basis der Rosette 100% (Abb. 3-7 D). Sowohl *Columbia* als auch *Wassilewskija* Wildtyppflanzen generieren in jeder Blattachselposition der Rosette zu 100% laterale Meristeme. Der Phänotyp der F_2 -

Nachkommen legt nahe, dass durch die Kreuzung zwischen den beiden Ökotypen *Columbia* und *Wassilewskija* ein QTL (Quantitative Trait Locus; englisch: Quantitativer Pfad Locus) aufgedeckt wurde, der die Anlage von Achselmeristemen betrifft (Abb. 3-7 D).

In der reproduktiven Phase wiesen die untersuchten Linien die Verzweigung betreffend keinen Unterschied zu Kontrollpflanzen auf. Die Anzahl an Stängelblattnodien war in dieser Doppelmutante jedoch deutlich reduziert (Abb. 3-7 F, G). Außerdem hatte die *myb38 myb84* Linie mit durchschnittlich 46 cm einen signifikant längeren Hauptspross als die Kontrollpflanzen mit durchschnittlich 32 cm (Abb. 3-7 E). Für die Kombination von *myb38* und *myb84* konnte unter diesen Bedingungen keine eindeutige Funktion in der Anlage von lateralen Meristemen nachgewiesen werden. Weiteren Aufschluß über die Rolle von *MYB38* und *MYB84* in der Anlage von Achselmeristemen könnte eine Doppelmutante liefern, die beide mutante Allele in dem gleichen genetischen Hintergrund trägt. Dieses Experiment konnte aufgrund der zeitlichen Limitierung dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

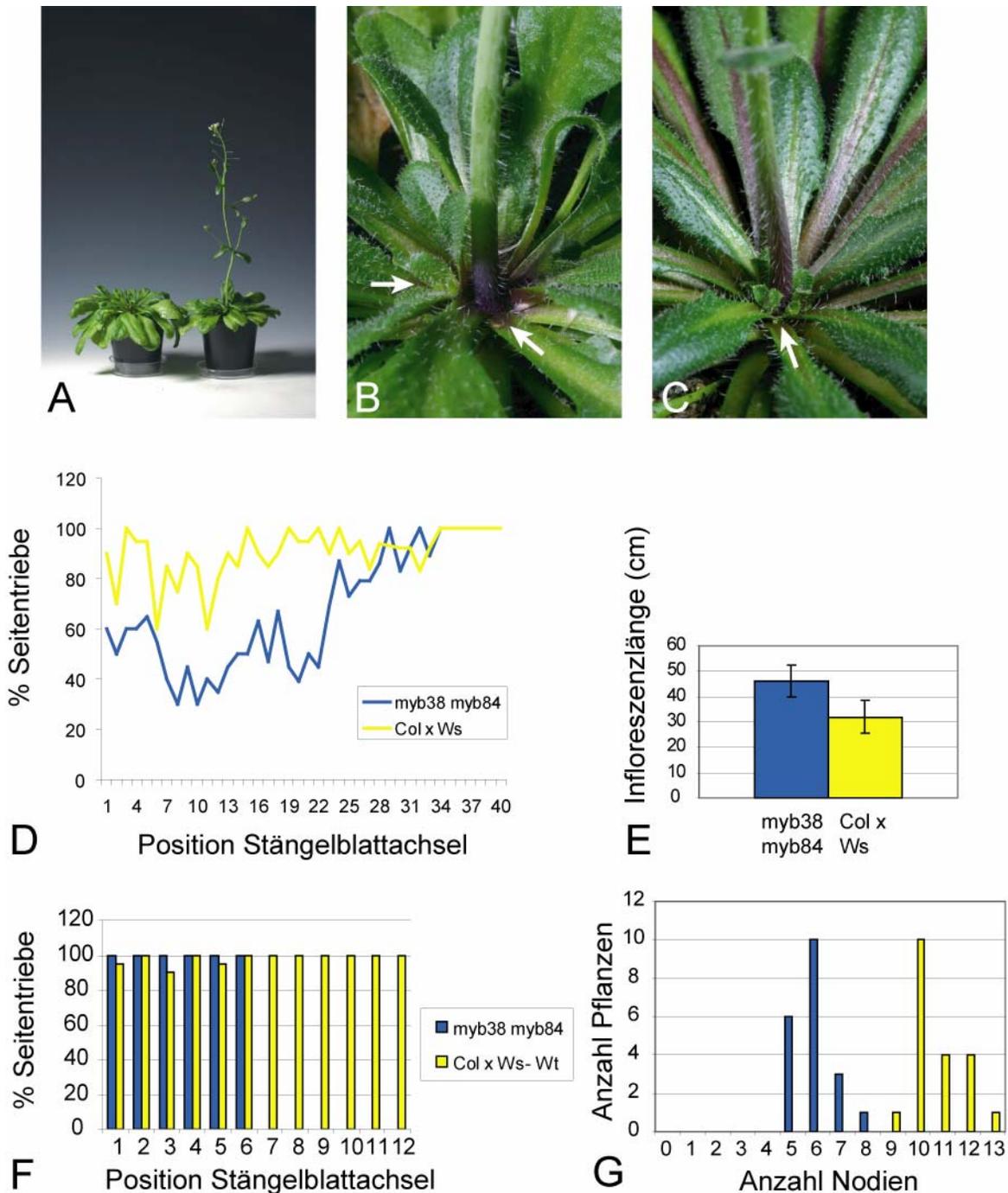


Abb. 3-7: Phänotyp der *myb38 myb84* Doppelmutante. (A) Habitus von Wildtypkontrollen (*Col x Ws*; links) und *myb38 myb84* (rechts). Die Doppelmutanten blühen früher unter Kurztagbedingungen. (B) Aufnahme einer Rosette der Doppelmutante. In den jüngsten Rosettenblattachseln wurden zum Teil Seitentriebe gebildet, zum Teil blieben die Achseln leer (Pfeile). (C) Rosette einer Kontrollpflanze, die deutlich mehr Seitentriebe (Pfeil) bildete als die Doppelmutante. (D) *myb38 myb84* Pflanzen generierten zunehmend Seitentriebe in einem basipetalen Gradienten (n=20). Bei Kontrollpflanzen (*Col x Ws*) verläuft dieser Gradient deutlich flacher als der von *myb38 myb84* Pflanzen. (E) Während Infloreszenzen der Doppelmutante im Schnitt 46 cm lange Infloreszenzen aufwiesen, betrug die Länge bei Kontrollpflanzen 32 cm. (F) Im Diagramm dargestellt sind die Prozentsätze, mit denen in Achseln von Stängelblättern Seitentriebe angelegt wurden (n=20). (1) Ältestes Stängelblatt, (12) jüngstes Stängelblatt. In der reproduktiven Phase unterschied sich die Verzweigung von Doppelmutanten und Kontrollen nicht signifikant voneinander. (G) Die *myb38 myb84* Linie bildete deutlich weniger Nodien mit Stängelblättern (n=20).

3.4.3.4 Analyse der *myb37 myb38 myb84* Tripelmutante

Die Tripelmutante, die alle drei erwähnten mutanten Allele vereint, zeigte die stärkste Reduktion der Sprossverzweigung. In dieser Kombination war die Bildung von Seitentrieben während der vegetativen Entwicklungsphase fast vollständig unterdrückt (Abb. 3-8 A-D). Darüber hinaus blieben die Achseln der Stängelblätter, die nach der Blühinduktion als erstes gebildet werden, häufig leer. In der Infloreszenz wurden Seitentriebe in einem akropetalen Gradienten gebildet. In der Position der ältesten Stängelblattachsel lag der Prozentsatz der Seitentriebbildung bei 30% und stieg dann bis zu den Positionen der beiden jüngsten Stängelblattachsen auf 100%. Die Anlage von lateralen Meristemen der Tripelmutante ist demnach auch in der reproduktiven Phase deutlich inhibiert (Abb. 3-8 F-H). Die Zahl der Stängelblattnodien ist hier etwa um die Hälfte reduziert (Abb. 3-8 I). Die sekundäre Verzweigung der Infloreszenz wies ebenfalls einen Defekt auf, der sich in einer akropetalen Zunahme bei der Bildung von Seitentrieben zweiter Ordnung äußerte (Abb. 3-8 J). Außerdem zeigte die Tripelmutante mit durchschnittlich 55,3 cm einen erheblich längeren Hauptspross im Vergleich zu den Kontrollen (32,2 cm) (Abb. 3-8 E). Bei der Blütenbildung wurde kein offensichtlicher Phänotyp beobachtet. Die Anzahl und Anordnung der Blütenorgane wich nicht vom *Columbia*-Wildtyp ab. Die Abszission der Petalen schien auch in dieser Mutante verzögert zu sein. Die Tripelmutante blühte in kurzen Fotoperioden deutlich früher ($69,9 \pm 5,8$ Tage) als *Columbia*-Wildtyppflanzen ($83,1 \pm 2$ Tage), was auch bei den oben beschriebenen *MYB*-Insertionslinien und deren Kombinationen beobachtet wurde (Abb. 3-8 A).

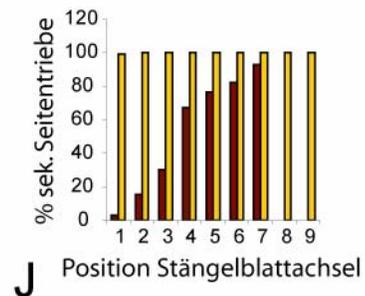
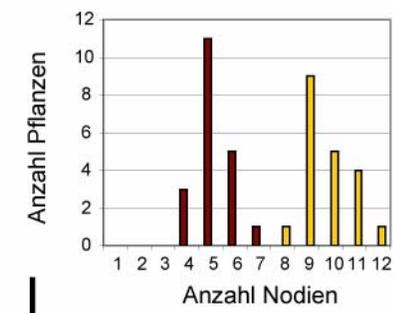
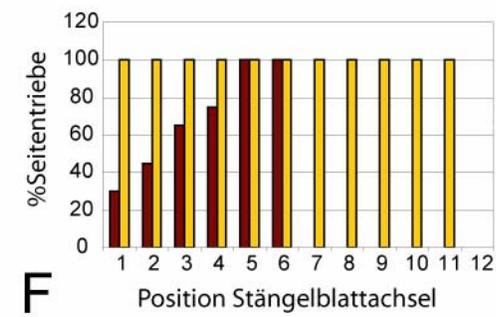
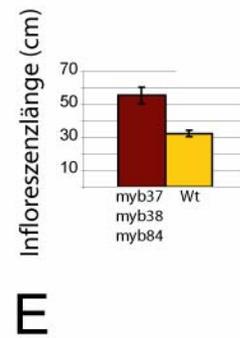
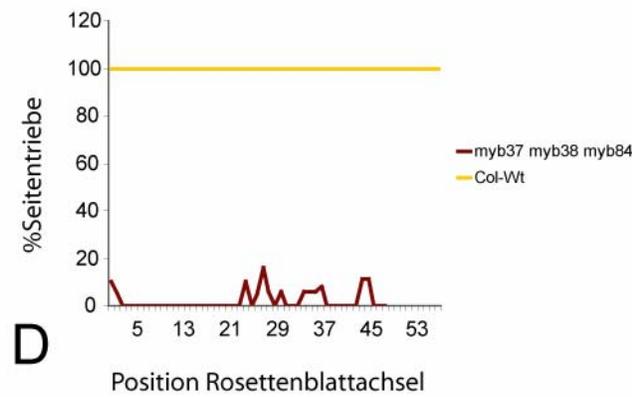


Abb. 3-8: Phänotyp der *myb37 myb38 myb84* Tripelmutante. (A) Habitus der Tripelmutante (links) und des *Columbia*-Wildtyps (rechts). *myb37 myb38 myb84* Pflanzen blühen unter Kurztagbedingungen früher als Wildtyppflanzen und bilden nur wenige Seitentriebe in Achseln von Stängelblättern. (B) Ansicht einer Rosette der Tripelmutante mit leeren Blattachsen (Pfeil). (C) Ansicht einer Wildtyprossette, die in jeder Blattachsel Seitentriebknospen besitzt (Pfeil). (D) In der Tripelmutante ist die Verzweigung in der vegetativen Phase über die gesamte Länge der Sprossachse erheblich reduziert (n=20). In Wildtyppflanzen werden dagegen in jeder Achsel Seitentriebe generiert. (E) Die Infloreszenzen der *myb37 myb38 myb84* Linie waren signifikant länger (n=20) als die der Kontrollen. (F) Wildtyppflanzen bilden in jeder Stängelblattachsel einen Seitentrieb (n=20). In der Kombination der *myb37 myb38 myb84* Insertionsallele nimmt die Anlage von Achselmeristemen in der Infloreszenz mit einem akropetalen Gradienten zu. (G) Das Foto zeigt eine leere Stängelblattachsel der Tripelmutante. (H) Nahaufnahme einer leeren Stängelblattachsel, die keinerlei axilläre Struktur aufweist. (I) Die Anzahl der Nodien mit Stängelblättern ist in der Mutante signifikant reduziert (n=20). (J) Im Diagramm ist die sekundäre Verzweigung der Infloreszenz dargestellt (n=20). (1) bezeichnet die älteste Achsel eines primären Seitentriebs, (9) die jüngste oberste Stängelblattachsel. Die Bildung von sekundären Seitentrieben ist in der Tripelmutante stark reduziert und nimmt in einem akropetalen Gradienten zu. Die sekundären Seitentriebe der Tripelmutante weisen weniger Nodien auf als die der Wildtyppflanzen.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Phänotypanalysen, dass *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* für redundante Funktionen kodieren, die die Bildung von Achselmeristemen während der vegetativen und der beginnenden reproduktiven Phase in unterschiedlichem Maß regulieren. Die beträchtlichen Verzweigungsdefekte der *myb37 myb38* Kombination deuten darauf hin, dass diese beiden Gene dabei die Hautrolle bestreiten, während *MYB84* eher eine untergeordnete Rolle spielt. Die Tripelmutante weist von allen Kombinationen der mutanten Allele die stärksten Verzweigungsdefekte auf. Ebenso wie die reduzierte Verzweigung addieren sich die anderen Defekte der Mutanten und treten bei der Tripelmutante am stärksten hervor. So blüht die Tripelmutante unter Kurztagbedingungen im Vergleich zu den anderen Einzel- und Doppelmutanten am frühesten und zeigt die stärkste Verlängerung der Infloreszenz. Neben den genannten phänotypischen Veränderungen spielen *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* auch eine Rolle bei der Festlegung der Anzahl von Stängelblattnodien, die in der reproduktiven Phase angelegt werden. Das heißt, *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* könnten die Produktion von Phytomeren mit Stängelblättern fördern, oder den Phasenwechsel, bei dem das Infloreszenzmeristem mit der Anlage von Blütenprimordien beginnt, verzögern.

3.5 Phänotypanalyse der Anlage von Achselmeristemen in R2R3 MYB Insertionslinien unter Langtagbedingungen

3.5.1 Verzweigungsverhalten von Columbia Wildtyppflanzen in kurzen und langen Fotoperioden

Alle vorhandenen Insertionslinien sowie deren Kombinationen wurden auch unter Langtagbedingungen untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen von der Aussaat an in langen Fotoperioden kultiviert. Unter diesen Bedingungen zeigten Wildtyppflanzen der Accessionen *Columbia* und *Wassilewskija* ein anderes Verzweigungsmuster als unter Kurztagbedingungen. Im Langtag wurde beobachtet, dass in den Achseln der ältesten Rosettenblätter keine lateralen Meristeme angelegt wurden, bis zur Mitte der Rosette jedoch in zunehmendem Maß. Vom mittleren Bereich der Sprossachse bis zu den jüngsten Rosettenblättern wurde in jeder Achsel ein Seitentrieb gebildet. Das Potenzial laterale Meristeme zu bilden folgt somit einem akropetalen Gradienten. Dieser Gradient betrifft nur die untere Hälfte der Sprossachse, da wie erwähnt bis zur Mitte der Rosette zu 100% Achselmeristeme angelegt werden. Auch in den Keimblattachseln besteht das Potenzial Achselmeristeme zu bilden, was jedoch nur in ca. 50% der Achseln realisiert wird (Abb. 3-9 C). Die beschriebenen Beobachtungen beziehen sich hier auf die Entscheidung, ob ein Achselmeristem angelegt wird oder nicht. Auf eine zeitliche Dynamik der Anlage von Achselmeristemen wurde hier nicht eingegangen im Gegensatz zur Analyse des Entwicklungszustands von Achselknospen. Als „weiter entwickelte“ Knospen wurden hier Knospen bezeichnet, die größer waren und mehr sichtbar entwickelte Blattprimordien zeigten als andere Knospen, die als weniger weit entwickelt eingestuft wurden. Die Achselknospen waren bei der Analyse der Wildtyppflanzen im Langtag in den jüngsten Blattachseln am weitesten entwickelt, während sie in Richtung der Rosettenbasis in der Entwicklung immer weiter zurück lagen, mit Ausnahme der Achselknospen in den Keimblättern (Abb. 3-9 D). Im Gegensatz dazu wurde bei Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen worden waren, in der Regel in jeder Achsel eines Rosettenblatts die Anlage eines Achselmeristems beobachtet (Keimblätter nicht berücksichtigt) (Abb. 3-9 A). Im oberen und unteren Bereich der vegetativen Sprossachse waren die Achselknospen weiter entwickelt als in der Mitte (Abb. 9-3 B). *Columbia*-Pflanzen, die unter

Langtagbedingungen kultiviert wurden, bildeten in einigen Stängelblattachsen akzessorische Seitentriebe. Dagegen wurden bei *Columbia*-Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen worden waren, in den Achseln von Stängelblättern nie akzessorische Seitentriebe gefunden. Das gleiche gilt für *Wassilewskija*-Pflanzen, die im Vergleich zu *Columbia* jedoch mehr akzessorische Seitentriebe bildeten, wenn sie in langen Fotoperioden kultiviert wurden.

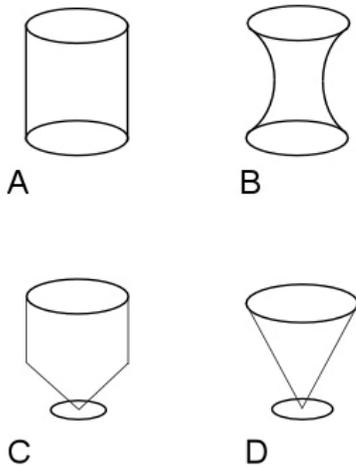


Abb. 3-9: Muster der Anlage von Achselmeristemen und Dynamik der Knospenentwicklung unter Kurz- und Langtagbedingungen. (A, C) Die Schemata zeigen die Entscheidung über die Anlage eines LM entlang der Sprossachse. Oben unter Kurztagbedingungen, unten bei Kultivierung in langen Fotoperioden. (B, D) Schematische Darstellung der Dynamik der Achselknospenentwicklung entlang der Sprossachse. Oben unter Kurztag-, unten unter Langtagbedingungen.

3.5.2 Verzweigung von R2R3 MYB-Insertionslinien in langen Photoperioden

Für die makroskopischen Analysen der Verzweigung wurden jeweils 20 Pflanzen untersucht, jedes Experiment wurde wiederholt. Die unten beschriebenen Verzweigungsmuster wurden in jedem Fall bei der Wiederholung des Experiments bestätigt.

Das Verzweigungsmuster von *myb37* ist in langen Photoperioden gegenüber dem Wildtyp nicht verändert. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen unter Kurztagbedingungen, wo die *MYB37* Funktion eine starke Reduktion der Verzweigung hervorruft. Bei *myb37* Pflanzen, die parallel zu *Columbia* Wildtyppflanzen im Langtag angezogen wurden, wurde ein akropetaler Gradient der Anlage von Achselmeristemen gefunden, der wie der Wildtyp-Gradient verläuft. Im Langtag wurde bei *myb37* außerdem weder ein früheres Blühen noch

eine längere primäre Infloreszenz festgestellt. Diese Beobachtungen treffen auf alle anderen analysierten Linien unter Langtagbedingungen ebenfalls zu. Die Infloreszenzen der im Langtag angezogenen Pflanzen bildeten im Schnitt drei Stängelblätter, aus deren Achseln Seitentriebe hervorgingen. Dies trifft sowohl auf Wildtypen als auch auf die Mutanten zu. Die *myb37*-Mutante wies jedoch in allen Stängelblattachselpositionen weniger akzessorische Seitentriebe auf als die Kontrollen. Im Langtag zeigt sich demnach eine Funktion von *MYB37* in der reproduktiven Phase bei der Anlage von akzessorischen Seitentrieben (Daten nicht gezeigt).

Die vegetative Verzweigung von *Wassilewskija*-Pflanzen im Langtag ist sehr ähnlich zu der von *Columbia*-Pflanzen. Die *myb38*-Linie im *Ws*-Hintergrund zeigte bei der Analyse keine Abweichung der Verzweigung aus Rosettenblattachseln zu den Kontrollpflanzen. In der Infloreszenz hingegen wurde eine Reduktion der Bildung von akzessorischen Seitentrieben beobachtet. Das Ausmaß der Reduktion ist dabei im Verhältnis zu *myb37*-Pflanzen geringer (Abb. 3-10 A).

Die *myb84* Linie zeigte in der vegetativen Phase keine phänotypische Abweichung vom Wildtyp. Im Gegensatz dazu wies die Linie auch eine Reduktion der akzessorischen Triebe während der reproduktiven Phase auf (Daten nicht gezeigt).

Diese Beschreibung trifft auch auf die *myb37 myb84* Doppelmutante zu. Eine Abweichung zum Wildtypphänotyp fand sich bei der Bildung von akzessorischen Seitentrieben, die deutlich stärker reduziert war als bei der *myb37*- oder *myb84*-Einzelmutante (Abb. 3-10 B). *MYB37* und *MYB84* haben demnach redundante Funktionen bei der Kontrolle der Anlage von Achselmeristemen, aus denen akzessorische Seitentriebe hervorgehen.

T₂-Nachkommen aus einer Kreuzung zwischen *Columbia*- und *Wassilewskija*-Wildtypen ließen sich bei Kultivierung in langen Photoperioden bezüglich der Verzweigung nicht von den *Columbia*- oder *Wassilewskija*- Accessionen unterscheiden. In der vegetativen Phase unterschieden sich bei der Analyse weder die Doppelmutante *myb37 myb38* noch *myb38 myb84*, die beide einen gemischten Hintergrund haben, von den Kontrollpflanzen. Bei beiden Linien war jedoch die Anlage von Achselmeristemen betroffen, aus denen akzessorische

Seitentriebe hervorgehen. Exemplarisch sind die Daten der *myb37 myb38* Doppelmutante in Abb. 3-10 C dargestellt. Die Anzahl der akzessorischen Triebe sind in beiden Doppelmutanten deutlich reduziert und zwar jeweils stärker als bei einer der entsprechenden Einzelmutanten (Daten nicht gezeigt). Dies spricht wiederum für redundante Funktionen der Gene bei der Anlage von Achselmeristemen in der reproduktiven Phase unter Langtagbedingungen.

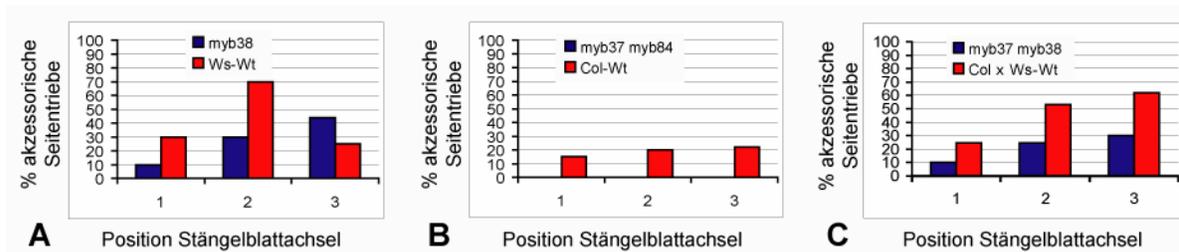


Abb. 3-10: Verzweigung von *myb*-Insertionslinien in der generativen Phase unter Langtagbedingungen. Exemplarisch dargestellt ist die Bildung von akzessorischen Seitentrieben in *myb38* (Diagramm A), *myb37 myb84* (Diagramm B) und in *myb37 myb38* (Diagramm C).

Die Tripelmutante zeigte unter Langtagbedingungen nur in der reproduktiven Phase eine Abweichung vom Wildtypphänotyp. In der Mutante fehlten akzessorische Seitentriebe in der Infloreszenz gänzlich (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Verzweigung in den Insertionslinien und deren Kombinationen machte eine Funktion der *MYB*-Gene in der reproduktiven Phase unter Langtagbedingungen deutlich. Die Anlage von Meristemen, aus denen akzessorische Seitentriebe gebildet werden, ist in den Mutanten inhibiert. Dabei zeigen die verschiedenen Doppelmutanten und die Tripelmutante jeweils einen stärkeren Effekt als die Einzelmutanten, wodurch die Redundanz in der Funktion von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* bei der Kontrolle der Anlage von lateralen Meristemen erneut deutlich wird.

3.6 *Überexpression des MYB38-Gens unter der Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-Promotors*

MYB38 weist über die gesamte Länge des ORFs hinweg die größte Sequenzähnlichkeit zum *Blind*-Gen der Tomate auf. Daneben zeigt dieses Gen von allen Genen der Untergruppe die stärkste Expression im Sprossapex und ist insgesamt, wie in Kap. 3.1 beschrieben, am ähnlichsten zu *Blind* exprimiert. Diese Eigenschaften lassen vermuten, dass *MYB38* eine ähnliche Funktion wie *Blind* ausüben könnte. Daher war es zunächst überraschend, dass die *myb38* Einzelmutante keinen Phänotyp aufweist. Um die Genfunktion von *MYB38* genauer zu analysieren, wurde ein Überexpressionskonstrukt generiert, wodurch *MYB38* unter der Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-35S-Promotors ubiquitär exprimiert wird. Dazu wurde der ORF von *MYB38* hinter den 35S-Promotor in den Vektor pGPTV-BAR kloniert. Für die Klonierung wurden die *MYB38*-Sequenzen aus *Columbia* verwendet. Mit dem resultierenden Plasmid wurden mittels der „Floral Dipping“ Methode (engl.: florale Eintauchmethode) nach Clough und Bent, 1998, *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen (*Columbia*) transformiert. Im 4-6-Blattstadium wurde eine Basta®-Selektion durchgeführt und so transgene Pflanzen identifiziert. Primärtransformanten wurden zunächst unter Kurztagbedingungen angezogen, um die Pflanzen zu kräftigen. Die Pflanzen wurden nach 4 Wochen in Langtagbedingungen überführt. Transgene Pflanzen zeichneten sich durch einen kleineren, zierlicheren Habitus aus (Abb. 3-11 A). Des Weiteren waren die Stängelblätter schmal und aufgerollt (Abb. 3-11 B). Die Blüten wiesen kürzere Sepalen auf als der Wildtyp (Abb. 3-11 D, Pfeilspitze) und öffneten sich eher als Wildtypblüten (Vgl. Abb. 3-11 C, D). Pflanzen mit extremem Phänotyp bildeten keinen Pollen. Ca. zwei Drittel der 63 untersuchten Primärtransformanten blühten spät im Vergleich zu Wildtypkontrollen. Hinsichtlich der Bildung von Seitentrieben zeichnen sich die Überexpressionspflanzen durch die Bildung eines akzessorischen Seitentriebs in fast jeder Stängelblattachsel aus (Abb. 3-11 B, Pfeilspitze). Dies beobachtet man bei dem Ökotyp *Columbia* nur in einzelnen Achseln. Mittels Northern-Blot-Analyse wurden fünf verschiedene transgene T₂-Linien untersucht. Pro Linie wurden fünf Schwesterpflanzen analysiert. Das Ergebnis zeigte eine positive Korrelation zwischen der *MYB38*-Transkriptakkumulation und der Stärke des Phänotyps. Dieser Verzweigungsphänotyp deutet darauf hin, dass *MYB38* während der reproduktiven Phase eine spezifische Funktion bei der Anlage von

Achselmeristemen ausübt und zur Kompetenz der Blattachsen für die Anlage von Achselmeristemen beiträgt.

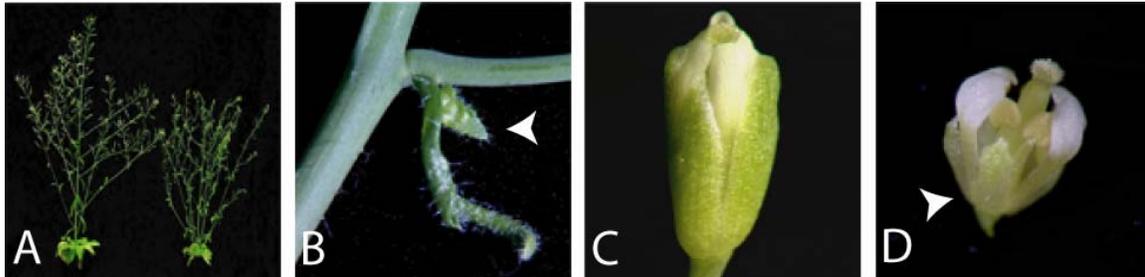


Abb. 3-11: Phänotyp von *MYB38*-Überexpressionspflanzen. (A) Der Habitus von Pflanzen, die *MYB38* unter der Kontrolle des 35S-Promotors (Blumenkohlmosaikvirus) exprimieren (rechts) ist gestauchter und zierlicher als der Habitus von *Columbia* Wildtyppflanzen (links). (B) Transgene Pflanzen haben aufgerollte Stängelblätter und bilden in fast jeder Stängelblattachsel einen akzessorischen Seitentrieb (Pfeilspitze). (C) Wildtypknospe im gleichen Entwicklungsstadium wie die Knospe in (D). (D) Knospe einer 35S::*MYB38*-Pflanze, die sich eher öffnet als Wildtypknospen (C) und verkürzte Sepalen bildet (Pfeilspitze).

In einem weiteren Schritt wurden 35S::*MYB38* Transgene mit *las-4* Pflanzen gekreuzt. Die Phänotypanalyse in Bezug auf die akzessorischen Seitentriebe soll Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Funktionen der beiden Gene beeinflussen. Arbeiten von Greb et al., 2003, haben anhand von *axr-1 las-4* Doppelmutanten gezeigt, dass *LAS* die Kompetenz vermittelt, akzessorische Seitentriebe zu bilden. Während in *axr-1* Mutanten zu einem hohen Prozentsatz akzessorische Seitentriebe gebildet wurden, war dies in *axr-1 las-4*-Doppelmutanten nicht mehr zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wachsen T₂-Pflanzen aus der oben genannten Kreuzung heran, die im Rahmen dieser Arbeit phänotypisch nicht mehr ausgewertet werden können.

3.7 Charakterisierung des Expressionsmusters von MYB37, MYB38 und MYB84 durch RNA in situ-Hybridisierungen

3.7.1 Allgemeine Bemerkungen zur Methode der RNA in situ-Hybridisierungen

Die Expressionsanalyse eines Gens hat zum Ziel, die Aktivität des Gens im Organismus zu verfolgen. Das Expressionsmuster eines Gens kann neben dem Phänotyp der Mutante wichtige Informationen zur Funktion eines Gens liefern. Während der Phänotyp Aufschluss über den biologischen Vorgang gibt, an dem ein Gen beteiligt ist, gibt das Expressionsmuster Aufschluss über das räumliche und zeitliche Muster, in dem ein Gen während der Entwicklung exprimiert wird. Mit diesem Ansatz lässt sich auch die Beziehung zwischen Expressions- und Wirkungsort des Gens analysieren. Beim Vergleich der Lokalisierung der Expression mit dem Phänotyp kann festgestellt werden, ob der Expressionsort eines Gens mit dessen Wirkungsort übereinstimmt. Stimmt die gefundene Domäne nicht mit den Geweben oder Zellen überein, die den Phänotyp aufweisen, kann dies zum Beispiel bedeuten, dass das entsprechende Protein zur Ausübung seiner Funktion transportiert werden muss. Weiterhin kann eine Expression, die über die Domänen des Phänotyps hinausgeht, Hinweise zu möglichen weiteren Genfunktionen liefern. Darüberhinaus kann ein Vergleich der Expressionsdomänen verschiedener Gene Hinweise darauf geben, ob die Gene *in vivo* in regulatorischer Beziehung zueinander stehen oder die Genprodukte miteinander interagieren könnten.

Mit Hilfe der RNA in situ-Hybridisierung (RNA-ISH) lässt sich auf direktem Wege feststellen, in welchen Zellen des Organismus ein bestimmtes Gen aktiviert wird, indem man spezifisch die mRNA des Gens nachweist. Insofern lässt sich die RNA-ISH mit Reporteranalysen vergleichen, die ebenfalls auf zellulärer Ebene die Promotoraktivität von Genen widerspiegeln. Die Reportergene – zum Beispiel GFP oder GUS – werden unter der Kontrolle des Promoters des zu untersuchenden Gens exprimiert. Dabei hat sich allerdings in einigen Beispielen gezeigt, dass durch eine erhöhte Stabilität des GUS-Proteins im Vergleich zu dem endogenen Protein die zeitliche Expression durch den Reporter verändert wiedergegeben werden kann. Anders als bei den bisher erwähnten Methoden verhält es sich dagegen bei translationalen Fusionen. Hier gibt das Signal des Reporterproteins die Lokalisierung des endogenen Proteins

wieder und nicht die Transkriptverteilung des Gens, die sich von der Verteilung des Proteins unterscheiden kann. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass sich die Lokalisierung des nativen Proteins von der der Proteinfusion unterscheiden kann, wenn z.B. durch die entstandene Größenzunahme oder eine veränderte Proteinfaltung die Stabilität oder der Transport geändert wird. Des Weiteren kann es zu Diffusion kommen, die den Signalbereich im Vergleich zum endogenen Protein verfälschen. Um dem zu entgehen, bleibt ein Ansatz, in dem direkt das Protein immunologisch durch Antikörper nachgewiesen wird. Diese Methode ist allerdings relativ aufwändig und bei niedriger Abundanz der Proteine, wie es im hier vorliegenden Fall zu erwarten ist, nicht unproblematisch.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* mittels RNA-ISH untersucht. Bei dieser Methode wird eine Gegensinn-RNA synthetisiert, die mit der mRNA des untersuchten Gens hybridisieren kann. Zur Synthese wird UTP verwendet, an das Digoxigenin gekoppelt ist. An die markierten UTP-Bausteine bindet dann ein Antikörper, an welchen wiederum das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Bei Inkubation mit den entsprechenden Substraten bildet das Enzym daraus lokal begrenzt farbige Präzipitate, die somit die mRNA-Verteilung des Gens auf zellulärer Ebene widerspiegeln.

3.7.2 *Transkriptverteilung von MYB37 in der vegetativen Phase*

3.7.2.1 *Transkriptakkumulation von MYB37 in 4 Wochen alten Sprossapices*

Achselmeristeme entstehen in der Verbindung zwischen Blattprimordium und dem Stamm, also in der Blattachsel. Für den *Columbia*-Wildtyp wurde die Bildung von lateralen Meristemen und die daraus resultierende Bildung von Achselknospen ab P21/22 beschrieben (Stirnberg et al., 2002). Die Blattprimordien werden hier mit P0, P1, P2 usw. vom jüngsten Primordium (P) an mit aufsteigendem Alter bezeichnet, wie bei Smith et al. (1992) und Long und Barton (2000) beschrieben. In der beschriebenen *myb37*-Mutante fehlen Seitentriebe insbesondere in den Achseln von älteren Rosettenblättern. Aufgrund dieses Phänotyps, der sich

auf die vegetative Phase der Entwicklung bezieht und Gewebe betrifft, die im Sprossapex angelegt werden, wurden zunächst vegetative Sprossapices (28d alt) untersucht.

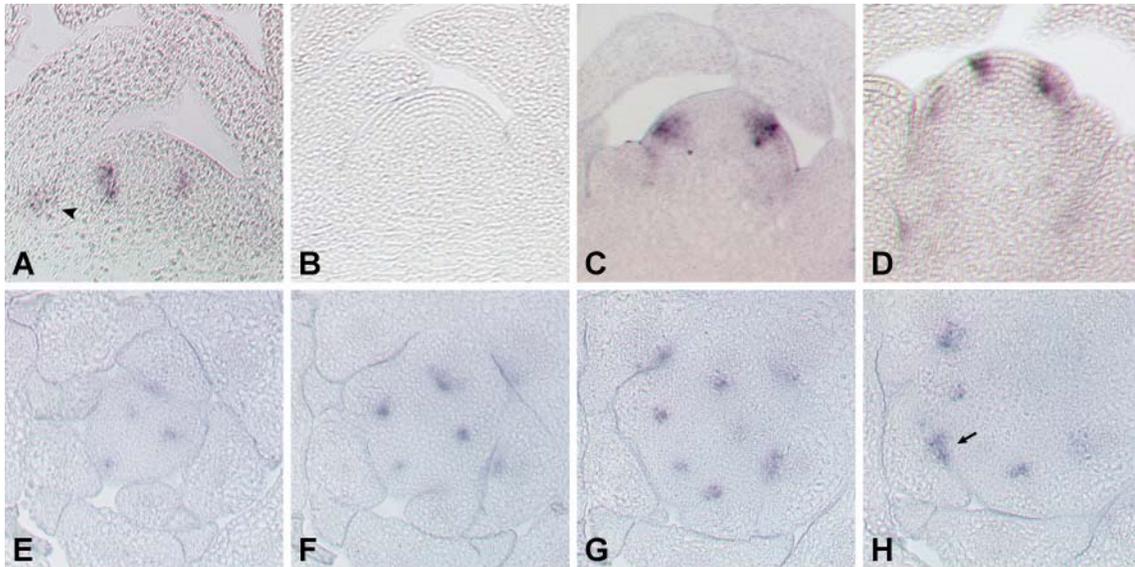


Abb. 3-12: Analyse der Transkription von *MYB37* in *Columbia* Wildtyppflanzen. (A) Längsschnitt durch ein 28 Tage altes vegetatives Meristem, hybridisiert mit einer Gegensinn-Sonde von *MYB37* mRNA. (B) Sinn-Kontrolle von *MYB37*. C-D: *MYB37*-Transkriptnachweis. Längsschnitte durch Meristeme von Pflanzen, die 28d lang im Kurztag angezogen wurden und dann mit zwei (C) oder vier (D) langen Fotoperioden induziert wurden. E-H: Sukzessive Querschnitte durch ein vegetatives Meristem von einer Pflanze, die 28d lang im Kurztag angezogen wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *MYB37*-Gegensinn-Sonde.

Die Transkriptakkumulation von *MYB37* wurde zunächst im Bereich zwischen dem SAM und entstehenden Blattprimordien detektiert. Dabei lässt sich das *MYB37* Transkript von P0 bis P10/11 nachweisen, nicht jedoch in älteren Blattachsen (Abb. 3-12. A, B). P0 ist vollständig im SAM erhalten, während P1 sich bereits als kleine Vorwölbung an der Flanke des Meristems zeigt. Ab P2 bildet sich eine Spalte zwischen dem Primordium und dem SAM. Das *MYB37* Transkript befand sich im Zentrum der Primordiumsachsel in einer kreisförmigen Domäne. Das Signal umfasste in den Achselbereichen von sehr jungen Primordien immer die L3-Schicht, häufig auch die L1- und L2- Schicht. Im Vergleich von Quer- und Längsschnitten (Abb. 3-12. A, E-H) konnte man feststellen, dass die Expressionsdomäne insgesamt in der dreidimensionalen Ebene eine eiförmige Figur darstellt. In der transversen Ebene zeigte sich

das *MYB37*-Signal in einer Breite von 3-5 Zellen. Longitudinal umfasste das Signal ebenfalls 3-5 Zelllagen. Für die Charakterisierung der *MYB37*-Expression wurden ca. 20 Apices untersucht.

3.7.2.2 *Transkriptakkumulation von MYB37 in zwei Wochen alten Sprossapices*

Die Phänotypen der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen *myb*-Mutanten lassen eine funktionelle Redundanz der Gene *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* erkennen. Da Genfamilien bzw. deren Subfamilien häufig durch differentielle Expression gekennzeichnet sind, ist es vorstellbar, dass die *MYB*-Gene sich auch durch eine unterschiedliche zeitliche Expression oder durch die Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze unterscheiden. Die *myb37* Mutante zeichnet sich vor allem durch das Fehlen von Lateralmeristemen in den älteren und ältesten Blattachsen aus (Kap. 3.4.2.1). Da diese Seitentriebe in frühen Entwicklungsstadien der Pflanzen angelegt werden, wurden auch 14d alte vegetative Apices mittels RNA-ISH untersucht, um Aufschluss über die Expression von *MYB37* zu diesem Zeitpunkt zu erhalten. In 14d alten Sprossapices ließ sich das *MYB37*-Transkript jedoch nicht nachweisen (acht Apices in zwei unabhängigen Experimenten wurden untersucht). Da sich der *myb37*-Phänotyp wie erwähnt hauptsächlich in den ältesten Blattachsen zeigt, in denen zu einem frühen Zeitpunkt Achselmeristeme angelegt werden, überrascht dieser Befund. Positivkontrollen mit 28d alten Apices zeigten dagegen das vorher beschriebene *MYB37*-Muster. In einem weiteren Kontrollexperiment wurden Längsschnitte von 14d alte Apices mit einer Gegensinn-Sonde des Gens *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* hybridisiert. Bei dieser Untersuchung wurden die gleiche Transkriptverteilung wie in 28d alten Meristemen (Long und Barton, 2000) gefunden.

3.7.3 Transkriptverteilung von MYB37 in der reproduktiven Phase

3.7.3.1 Untersuchung von reproduktiven Sprossapices

Des Weiteren wurden reproduktive Sprossapices untersucht, da sich in der Doppelmutante *myb37 las-4* eine Funktion für *MYB37* auch in der reproduktiven Phase zeigte. Darüber hinaus verursacht eine Mutation im homologen Gen *Blind* aus Tomate eine starke Reduktion der Verzweigung in der Infloreszenz. Im Gegensatz zum Wildtyp, wo 10-12 Blüten aus einer Infloreszenz hervorgehen, werden in *blind*-Mutanten oft nur 1-2 Blüten gebildet (Schmitz et al., 2002).

Die hier untersuchten Apices stammten von Pflanzen, die 28d unter Kurztagbedingungen kultiviert und anschließend 2, 4 oder 7 Tage lang mittels langer Fotoperioden induziert wurden (Abb. 3-12. C, D). Das *MYB37*-Gen wird in reproduktiven Apices im gleichen Muster exprimiert wie in der vegetativen Phase. Das *MYB37* Signal markiert in Infloreszenzmeristemen ebenfalls ab P0 den Achselbereich von Primordien. Sowohl entlang der longitudinalen als auch der transversalen Achse ist die Expression jeweils 3-5 Zelllagen tief. Das Signal umfasst dabei immer die L3-Schicht, meist auch die L2 und L1. Apices, die 7 Tage lang induziert wurden, wiesen deutlich sichtbare Seitentriebe auf. Die Apikalmeristeme dieser Triebe zeigten die gleiche *MYB37*-Transkriptverteilung wie das primäre Sprossapikalmeristem. Die RNA-ISH-Muster von *MYB37* zeigen, dass sich das primäre und die sekundären SAMs in Bezug auf die Expression von *MYB37* nicht unterscheiden und dass *MYB37* spezifisch im Zentrum von Blattachsen exprimiert wird.

3.7.3.2 Untersuchung von jungen Blütenknospen

Zusätzlich zu den Apices wurden Blütenknospen untersucht, da in der *blind*-Mutante aus Tomate ein stark veränderter Blütenphänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen vorliegt (Schmitz et al., 2002), der in *Arabidopsis* eventuell durch Redundanz verborgen bleibt. Außerdem ging aus den RT-PCR Daten hervor, dass *MYB37* in Blütenknospen exprimiert ist,

so dass durch eine genauere Analyse der Expressionsdomänen hier Aufschluss über die Genfunktion erlangt werden könnte.

In jungen Blütenknospen war keine *MYB37*-mRNA nachzuweisen. Dies bedeutet entweder, dass das Transkript mit der hier angewandten Methode nicht nachzuweisen ist, obwohl anhand der RT-PCR-Ergebnisse (Kap. 3.1) die Expression im Sprossapex nicht stärker erscheint als die in Blütenknospen. Wahrscheinlicher ist, dass *MYB37* in dem hier analysierten Entwicklungsstadium der Knospen noch nicht exprimiert wird, in älteren Stadien hingegen schon, da bei den RT-PCR-Analysen ein Gemisch von Blütenknospen in verschiedenen Entwicklungsstadien vorlag.

3.7.4 *Transkriptakkumulation von MYB37 in myb37 Pflanzen*

Die Transkription von *MYB37* wurde auch in der *myb37* Mutante untersucht, um festzustellen, ob das *MYB37*-Protein selbst einen Einfluss auf die Transkription des *MYB37*-Gens hat. Hierfür wurden 28d alte vegetative Apices verwendet. Dabei wurde kein Unterschied in der Verteilung der verkürzten mRNA in der *myb37* Mutante gegenüber dem Muster in Wildtyp-Pflanzen gefunden. Ebenso ließ sich auch quantitativ kein Unterschied im Vergleich zur Wildtypexpression feststellen. In der Mutante können also höchstens geringe, mit dieser Methode ebenso wenig wie durch RT-PCR (Kap. 3.1) nachweisbare Unterschiede in der Transkriptionsintensität vorliegen. Daher legt das erhaltene Muster der Transkriptverteilung nahe, dass das Wildtypprotein nicht für eine positive oder negative Rückkopplung zur Regulation von *MYB37* benötigt wird. Da es sich bei dem hier beschriebenen mutanten *MYB37*-Allel nicht eindeutig um ein Null-Allel handelt, kann man eine Rückkopplung durch ein verkürztes aber möglicherweise noch funktionsfähiges Protein nicht ausschließen.

3.7.5 *Transkriptverteilung von MYB38*

Die *MYB38*-Transkriptverteilung wurde an 28d alten vegetativen Apices untersucht. Das *MYB38*-Transkript wurde in allen untersuchten Zellen gefunden, das Gen wird also ubiquitär

transkribiert (Abb. 3-13 A). Parallel durchgeführte Hybridisierungen mit Sinn-Sonden zeigten kein Signal (Abb. 3-13 B). Für *MYB38* wurde eine spezifische Funktion in der Anlage von Achselmeristemen nachgewiesen (Kap. 3.4). Daher überrascht dieses Ergebnis zunächst, da die Einzelmutante außerdem keinen abweichenden Phänotyp zum Wildtyp (*Wassilewskija*) aufweist. Aus diesem Grund wurde das RNA-ISH Experiment mit einer anderen *MYB38*-Sonde wiederholt. Die Ergebnisse waren deckungsgleich mit den Daten, die mit Hilfe der ersten verwendeten Sonde erzielt wurden. Die gefundene ubiquitäre Expression von *MYB38* stimmt mit den RT-PCR Daten überein, soweit diese vergleichbar sind (Vgl. Kap. 3.1). Erstens ist *MYB38* das Gen, welches die quantitativ stärkste Transkriptakkumulation aufweist. Zweitens wurde das *MYB38*-Transkript im Gegensatz zu den mRNAs aller anderen *Blind*-homologen Gene durch RT-PCR-Analyse in allen untersuchten Organen nachgewiesen.

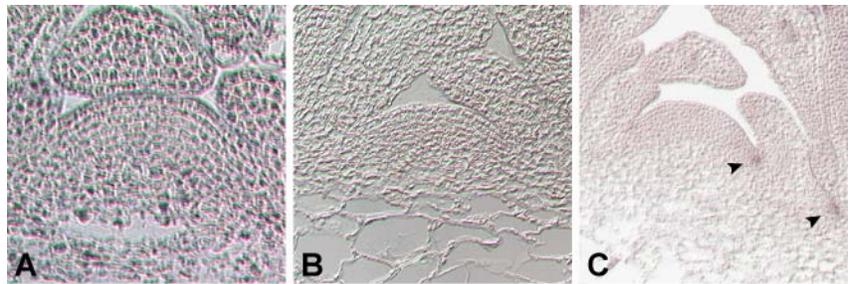


Abb. 3-13: Analyse der Transkription von *MYB38* und *MYB84*: (A) Längsschnitt durch ein 28d altes Meristem. Nach der Hybridisierung mit einer *MYB38*-Gegensinn-Sonde wird das Transkript in allen Zellen detektiert. (B) Nach der Hybridisierung eines 28d alten Apex mit einer *MYB38*-Sinn-Sonde lässt sich kein Signal nachweisen. (C) 28d altes Meristem (Längsschnitt), das mit einer *MYB84*-Gegensinn-Sonde hybridisiert wurde. Das *MYB84*-Transkript akkumuliert in Blattachseln.

3.7.6 Transkriptverteilung von *MYB84*

In 28d alten Sprossapices findet sich die *MYB84*-mRNA im Achselbereich von jungen Blattprimordien. Das Transkript wurde ab P2 nachgewiesen, wenn sich schon deutlich eine Spalte zwischen dem Primordium und dem SAM erkennen lässt (Abb. 3-13 C). Sowohl in

Längs- als auch in Querschnitten umfasste das Signal 3-5 Zelllagen und markierte eine kreisförmige Domäne in der Primordiumsachsel. Das MYB84-Transkript war von P2-P10/P11 nachweisbar. Die Transkriptverteilung folgt einem sehr ähnlichen Muster wie die von MYB37. Im Unterschied dazu wird MYB84 etwas später exprimiert. Für das Experiment wurden ca. 12 Apices untersucht (Längs- und Querschnitte). In induzierten Sprossapices (4 Langtagperioden nach 28-tägiger Kultivierung unter Kurztagbedingungen) fand sich die MYB84-Transkriptakkumulation ebenfalls in kreisförmigen Domänen in Achseln von jungen Stängelblattprimordien, ähnlich wie in vegetativen Apices.

3.8 Integration der MYB37-Funktion in den Prozess der Achselmeristembildung

3.8.1 LAS-Expression und MYB37-Expression sind nicht voneinander abhängig

Eine Mutante, die einen spezifischen Defekt in der Anlage von lateralen Meristemen aufweist, ist die *lateral suppressor (las)* Mutante. In *las-4* Pflanzen werden in der vegetativen Phase kaum Achselmeristeme angelegt, so dass meist keine oder nur wenige Seitentriebe gebildet werden. Werden diese Triebe gebildet, so finden sie sich immer in Achseln der jüngsten Rosettenblätter. Ferner ist auch die sekundäre Verzweigung betroffen. Im Gegensatz zum Wildtyp bleiben die ersten zwei bis drei Blattachseln der sekundären Triebe leer. Neben dem Seitentriebphänotyp weisen *las-4* Pflanzen eine Tendenz zur Konkauleszenz auf und die Abszission der Petalen scheint verzögert stattzufinden (Greb et al., 2003).

Das LAS-Gen kann als Marker von Zellen betrachtet werden, die die Kompetenz zur Bildung eines Achselmeristems besitzen, da gezeigt wurde, dass Achselmeristeme aus LAS-positiven Zellen hervorgehen (Greb et al., 2003). Hier sollte die LAS-Expression in Tripelmutanten untersucht werden, um zu klären, ob die Expression von MYB37 eine Voraussetzung der LAS-Expression ist, zumal MYB37 früher als LAS aktiviert wird.

Im Wildtyp (*Columbia*) wurde *LAS*-mRNA von P1 an in der Grenzregion zwischen dem Primordium und dem SAM bzw. zwischen Blattprimordien und dem Stamm nachgewiesen. *LAS*-positive Zellen umfassten dabei die L1-, L2- und L3-Schicht. Die Expressionsdomäne war in Richtung der longitudinalen Achse ca. fünf Zelllagen tief. In der adaxialen-abaxialen Richtung war die Domäne schmaler, ca. 2 Zelllagen. In älteren Blattachsen fokussierte sich die Transkriptverteilung auch entlang der longitudinalen Achse auf ca. 2-3 Zelllagen, so dass *LAS* spezifisch die Achsen von Blättern, also die Schnittstelle zwischen Blattprimordium und Stamm, markierte. Diese Befunde bestätigen die Untersuchungen von Greb et al. 2003. In der Tripelmutante weicht die *LAS*-Transkriptverteilung nicht vom Wildtyp ab (Abb. 3-15 G). *LAS* markiert hier ebenfalls den Übergang von Blattprimordium zum SAM (P1) bzw. die Blattachsen älterer Primordien (P2-P10). Es ist an dieser Stelle zu bemerken, dass hier Blattprimordien, die älter als P10 waren, nicht untersucht wurden, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob dort die *LAS*-Transkription verändert ist. Die *LAS*-Expression wurde für *Columbia* bis P20/22 beobachtet, wobei sich ein morphologisch sichtbares Lateralmeristem (LM) ab P21 zeigt (Greb et al., 2003). Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass für die Expression von *LAS* in den Primordien 1-10 *MYB37*-, *MYB38*- und *MYB84*- Aktivität nicht notwendig ist. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass in der Tripelmutante die Zellen in den Blattachsen meristematischen Charakter besitzen, der sowohl durch *LAS*- als auch durch *STM*-Expression (siehe unten) gekennzeichnet ist. Wahrscheinlich haben die *MYB*-Gene also bei der Achselmeristembildung eine Funktion, die von *LAS* unabhängig ist.

Neben dem oben beschriebenen Experiment wurde die *MYB37*-Expression in *las-4*-Pflanzen untersucht. Hierdurch sollte die Frage geklärt werden, ob die *MYB37*-Expression von *LAS* abhängig ist. Obwohl *MYB37* früher als *LAS* aktiviert wird, P0 respektive P1, ist es theoretisch möglich, dass die weitere oder spätere Expression von *MYB37* durch *LAS* kontrolliert wird. Man kann sich zum einen eine Aufrechterhaltung der Expression durch positive Rückkopplung vorstellen und zum anderen eine spezifische Inhibition von *MYB37*. Für das Experiment wurden anhand von Längsschnitten die Primordien P0- P6/7 von 28d alten vegetativen Apices untersucht. In diesen Primordien weicht die Transkriptverteilung von *MYB37* nicht von der oben beschriebenen ab (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die *MYB37*-Transkription nicht von *LAS* kontrolliert, sondern unabhängig etabliert wird.

3.8.2 In der *myb37 myb38 myb84*-Tripelmutante unterbleibt die Anlage von Achselmeristemen

Das Gen *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* wird zum einen dafür benötigt, das SAM zu etablieren und zum anderen für seine Aufrechterhaltung. Es handelt sich um einen zur *KNOTTED1*-Klasse gehörenden Homeodomänen-Transkriptionsfaktor (Long et al., 1996). *STM* wird sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Zone des Meristems transkribiert. Die *STM*-Transkription wird während des gesamten Lebens der Pflanze aufrechterhalten. *STM*-Transkriptakkumulation findet sich in allen Arten von Meristemen, wie dem primären, dem lateralen und dem floralen Meristem. Daher kann *STM* auch als Marker für den meristematischen Zustand von Zellen im oberirdischen Teil von Pflanzen dienen (Long und Barton, 2000).

In der *myb37 myb38 myb84* Tripelmutante ist die Bildung von Seitentrieben weitgehend unterdrückt (Kap. 3.4.3.3). Die Expressionsdomänen von *STM* und *MYB37* bzw. *MYB84* in den Zentren von Blattachsen sind überlappend, was eine Voraussetzung dafür ist, dass eines der beiden Gene das andere regulieren könnte. Hier wurde die *STM*-Expression in der Tripelmutante untersucht, um die Frage zu klären, ob die *MYB*-Gene eine Voraussetzung zur Etablierung des meristematischen Charakters von Achselzellen sind, oder ob sie für einen nachfolgenden Schritt der Entwicklung von Achselmeristemen verantwortlich sind.

Im Wildtyp wurde *STM*-Transkriptakkumulation, außer im SAM, auch in den interprimordialen Bereichen zwischen den jungen Blattprimordien P1-P16 detektiert. Ab dem Primordium P16 konnte im zentralen Bereich der Blattachsel eine fokussierte *STM*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden, die die Organisation des neuen Achselmeristems anzeigt (Abb. 3-14 B, D, Pfeilspitzen). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Untersuchungen von Greb et al. (2003) an *Columbia*-Pflanzen sowie die von Long und Barton (2000) an *Landsberg erecta*. In jungen Blattachsen überlappen die Expressionsareale von *MYB37* und *MYB84* mit dem von *STM*. Darüber hinaus schließt die ubiquitäre Expression von *MYB38* die Domänen von *STM* in den interprimordiären Regionen ein. Die *STM*-Expression in jungen Entwicklungsstadien (P1-P15) der Tripelmutante lässt sich nicht vom Wildtyp unterscheiden (Abb. 3-14 A, C). Dagegen ist in fast keiner Achsel ab dem Primordium P16 eine fokussierte Transkriptakkumulation des *STM*-Gens zu erkennen (Abb. 3-14 C, E,

Pfeilspitzen). Die ermittelten Expressionsdaten lassen den Schluss zu, dass die Funktionen der Gene *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* nicht essentiell sind für die Etablierung des meristematischen Charakters von Achselzellen, was durch die in der Tripelmutante vorhandene *STM*-Expression nachgewiesen wird. Dagegen ist die Aktivität von einem oder mehreren dieser Gene zur Etablierung der fokussierten *STM*-Expression ab P16 notwendig, die der Bildung von Seitenknospen vorausgeht. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass in den meisten Blattachsen der *myb37 myb38 myb84*-Mutanten keine Lateralmeristeme angelegt werden.

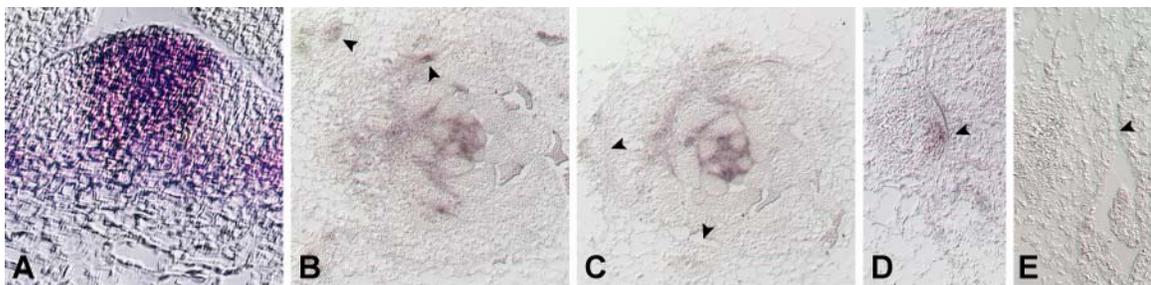


Abb. 3-14: Detektion des *STM*-Transkripts im Wildtyp und der *myb*-Tripelmutante. (A, C, E) Hybridisierung der *myb*-Tripelmutante mit einer *STM*-Gegensinn-Sonde. (A) Längsschnitt durch ein 28d altes vegetatives Meristem. Die *STM*-Transkriptakkumulation gleicht der in Wildtyppflanzen. (C) Querschnitt durch ein 28d altes Meristem. In älteren Blattachsen findet sich keine fokussierte *STM*-Transkription (Pfeilspitzen). (E) Ausschnitt einer älteren Blattachsel, in der sich kein *STM*-Transkript nachweisen lässt (Pfeilspitze). Kleinere, cytoplasmareiche Zellen fehlen hier. (B, D) Hybridisierung von Wildtyp-Apices (28d alt) mit einer *STM*-Gegensinn-Sonde. (B) Querschnitt. *STM*-Transkriptakkumulation findet sich sowohl in jüngeren als auch in älteren Blattachsen (Pfeilspitzen). (D) Ausschnitt mit einer älteren Blattachsel, in der *STM* in einer fokussierten Domäne in kleinen Zellen exprimiert wird (Pfeilspitze).

3.8.3 Charakterisierung der *las-4 myb37* Doppelmutante

Eine Möglichkeit, um die Beziehung zu testen, in der zwei Gene zueinander stehen, besteht in der Herstellung von Doppelmutanten. Um zu untersuchen, ob bei der Regulation von *MYB37* oder *LAS* in der einen oder anderen Richtung eine Abhängigkeit voneinander besteht, wurde die Doppelmutante *myb37 las-4* generiert. Homozygote Pflanzen wurden mittels PCR-Analyse identifiziert. Die Pflanzen wurden zur Phänotypanalyse unter Kurztagbedingungen kultiviert, um eine Vergleichbarkeit zu den vorangegangenen Analysen zu gewährleisten. Als Kontrollpflanzen dienen *las-4* Mutanten.

Die Doppelmutanten wiesen einen deutlich verstärkten Verzweigungsphänotyp auf. Während *las-4* Pflanzen in Rosettenblattachsen null bis fünf Seitentriebe bildeten, hatten *myb37 las-4* Doppelmutanten keinerlei Seitentriebe (Abb. 3-15 A,B). In der reproduktiven Phase verstärkte *myb37* ebenfalls den *las-4* Phänotyp. Die Bildung von Meristemen in den Achseln der nach der Blühinduktion zuerst angelegten zwei Stängelblättern ist hier stark betroffen (Abb. 3-15 C, Pfeile). So wird die Meristembildung im ältesten Stängelblatt weitgehend unterdrückt. Des Weiteren ist die Seitentriebbildung in den jüngeren Stängelblättern erheblich verändert. In einigen Fällen wurde beobachtet, dass vorhandene Seitentriebe verkürzt waren, d.h. z.B. nur zwei bis drei cm lang (Abb. 3-15 D, Pfeile). Dies ist auf eine frühzeitige Termination der Seitentriebe zurückzuführen, die zu einem hohen Prozentsatz gefunden wurde. Im Bereich der jüngsten Stängelblätter der Infloreszenz wurde oft die Bildung einer Blüte anstelle eines Seitentriebs in einer Stängelblattachsel beobachtet (Abb. 3-15 H). Dabei fällt auf, dass dies bei den Doppelmutanten *las-4 myb37* und *las-4 myb84* (Kap. 7.3.2) vor allem im oberen Bereich der Sprossachse der Fall ist, während in Stängelblattachsen von *las-4* Pflanzen kaum Anlagen mit veränderter Identität in Achseln zu finden waren. Die Blüten von Doppelmutanten wiesen eine weitere phänotypische Veränderung auf, da der Fruchtknoten häufig nach unten hin gekrümmt war (Abb. 3-15 E, Pfeil). Außerdem zeigten die *las-4 myb37* Pflanzen zum Teil fusionierte Stängelblätter (Abb. 3-15 F). Der Phänotyp der Doppelmutante legt nahe, dass *MYB37* und *LAS* sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Phase eine Funktion bei der Bildung von Seitentrieben innehaben. Im Falle von *LAS* wurde für die reproduktive Phase bisher nur eine Notwendigkeit bei der Bildung von akzessorischen Seitentrieben beschrieben (Greb et al., 2003).

Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass beide Gene neben der Funktion bei der Anlage von Achselmeristemen auch eine Funktion bei der Erhaltung von lateralen Meristemen besitzen. Während eine Termination des primären SAM nur selten beobachtet wurde, terminierten fast alle Parakladien frühzeitig. Manchmal wurde in *las-4 myb37*-Pflanzen, wie zuvor bei der *myb37 myb38*-Doppelmutante, auch die Bildung von nadel- und blattartigen Strukturen anstelle eines Seitentriebs beobachtet. Keines der erwähnten Merkmale wurde in *las-4* beobachtet. Die Termination der sekundären Triebe und die abnormen Strukturen in den Stängelblattachsen zeigen, dass *MYB37* und *LAS* für die Aufrechterhaltung von

Achselmeristemen notwendig sind. Des Weiteren spielen beide Gene auch eine Rolle bei der Festlegung der Meristemidentität, wie die Bildung von Blüten anstelle von Seitentrieben zeigt.

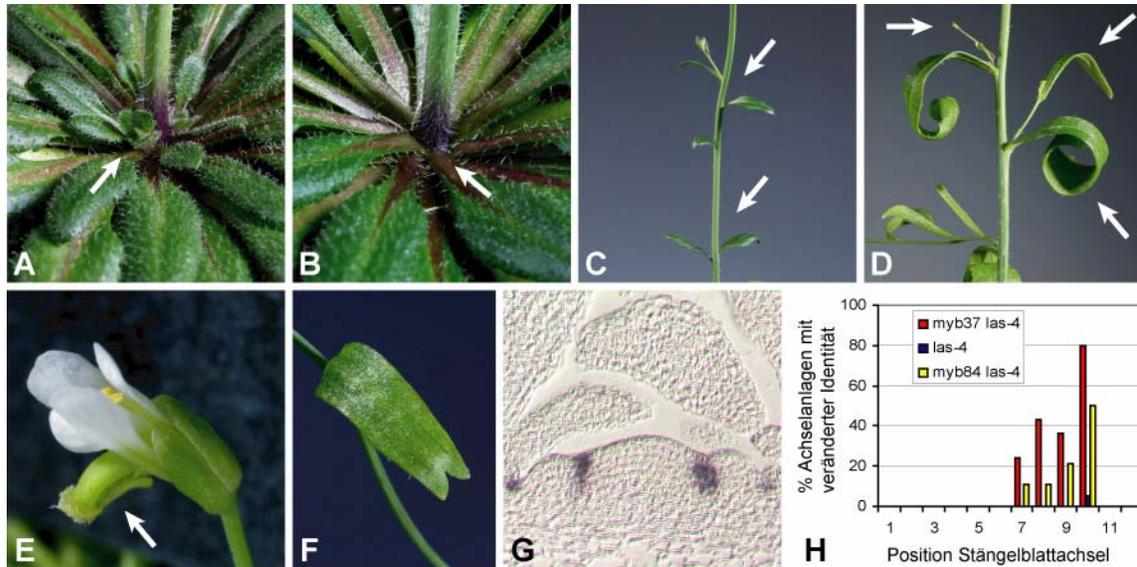


Abb. 3-15: Phänotyp der *las-4 myb37* Doppelmutanten und Expressionsanalyse von *LAS* in *myb37 myb38 myb84* Tripelmutanten. (A) In der vegetativen Phase bildeten *las-4* Pflanzen in den jüngsten Rosettenblattachsen 0-5 Seitentriebe. (B) In *las-4 myb37* Pflanzen war die Anlage von Achselmeristemen in der Rosette gänzlich unterdrückt. (C) In der generativen Phase blieb die Bildung von Seitentrieben vor allem in den Achseln der unteren Stängelblätter aus. (D) Häufig waren die Stängelblätter der Doppelmutanten aufgerollt (Pfeilspitze). Bei sehr vielen Seitentrieben wurde eine frühe Termination beobachtet, was dazu führt, dass die Entwicklung nach einer Länge von wenigen Zentimetern eingestellt wird (Pfeile). (E) Ferner wies die Doppelmutante nach unten gekrümmte Fruchtknoten auf (Pfeil). Abb. (F) zeigt ein fusioniertes Stängelblatt in der Doppelmutante. (G) Die Expression von *LAS* war in der *myb37 myb38 myb84* Tripelmutante im Vergleich zum *Columbia*-Wildtyp unverändert. (H) Im Diagramm dargestellt ist der Anteil sowie die Position von Stängelblattachsen, in denen Blüten anstatt Seitentriebe gebildet wurden (n=20). 1 ältestes Stängelblatt, 11 jüngstes Stängelblatt.

3.8.4 Charakterisierung der *las-4 myb84* Doppelmutante

Die *myb84 las-4* Doppelmutante zeigte alle Eigenschaften der oben beschriebenen *myb37 las-4* Doppelmutante. *myb84* wirkt im Gegensatz zu *myb37* jedoch nur als schwacher Verstärker des *las-4* Phänotyps (Abb. 3-15 H). Daraus kann man schließen, dass *MYB84* die gleichen

redundanten Funktionen wie *MYB37* ausübt, jedoch eine untergeordnete schwächere Rolle spielt als *MYB37* (Daten nicht gezeigt).

3.9 Untersuchungen zu möglichen Interaktionspartnern von MYB37, MYB38 und MYB84

3.9.1 Mutationen in bHLH-Genen verursachen Defekte bei der Anlage von Achselmeristemen

Die *lax panicle*-Mutante (*lax*) aus Reis weist einen Defekt in der Initiation von allen Arten von Achselmeristemen auf. Dabei ist die reproduktive Phase wesentlich stärker betroffen als die vegetative. Dieser Verzweigungsdefekt wird durch eine Mutation in einem *bHLH*-Transkriptionsfaktor verursacht. RNA-ISH-Daten von Komatsu et al. (2003) zeigen, dass das *LAX*-Transkript die Grenze zwischen dem primären Apikalmeristem und entstehenden Achselmeristemen markiert. Die Überexpression von *LAX PANICLE* erzeugt Pflanzen mit pleiotropen Defekten, darunter einen zwergförmigen Wuchs, nach unten gerollte Blattgründe sowie Sterilität. Mutationen in einem zu *LAX* homologen *bHLH*-Gen aus Mais, *BARREN STALK (BAI)*, führen, wie bei *lax*, zu Störungen in der Anlage von allen Lateralmeristemen im oberirdischen Teil der Pflanze. In dieser Maismutante sind jedoch die vegetative und die reproduktive Entwicklungsphase gleichermaßen betroffen. In Pflanzen, die homozygot für das starke *bal-ref*-Allel sind, werden die lateralen Meristeme, aus denen in der vegetativen Phase Tiller hervorgehen, nicht gebildet. In der reproduktiven Phase werden nur Infloreszenzmeristeme angelegt, die für die Blütenentwicklung notwendige Anlage weiterer lateraler Meristeme ist jedoch blockiert. Aus diesem Grund sind *bal*-Pflanzen steril. *BAI*-Transkripte akkumulieren spezifisch in allen Zellgruppen, aus denen Achselmeristeme entstehen (Gallavotti et al., 2004).

Die Phänotypen von *lax panicle* und *barren stalk1* weisen Parallelen zu den Phänotypen der *myb*-Insertionslinien aus Arabidopsis und zu *blind* aus Tomate auf, da die Anlage von

Achselmeristemen sowohl in der vegetativen als auch in der reproduktiven Phase unterdrückt ist. Auch die Merkmale von Reispflanzen, die *LAX* überexprimieren, erinnern an den Phänotyp von *MYB38*-Überexpressionspflanzen. Im Falle einer Interaktion von *MYB*- und *bHLH*-Proteinen, die gemeinsam den Prozess der Achselmeristembildung kontrollieren, würde man, wie es hier der Fall ist, bei entsprechenden *bHLH*- und *MYB*-Einzelmutanten einen ähnlichen Phänotyp erwarten. Eine Interaktion von *MYB*- und *bHLH*-Transkriptionsfaktoren ist bei mehreren Entwicklungsprozessen, wie zum Beispiel der Regulation der Anthozyaninbiosynthese (Goff et al., 1992) und der Spezifizierung von Trichomzellen (Payne et al., 2000), nachgewiesen worden. Für *LAX* und *BA1* wurde gezeigt, dass beide Gene in Lateralmeristemvorläuferzellen transkribiert werden. Nimmt man an, dass ein homologes *bHLH*-Gen in *Arabidopsis thaliana* entsprechend exprimiert wird, würde diese Expressionsdomäne mit der von *MYB37* und *MYB84* überlappen. Dies ist eine Voraussetzung für die Interaktion der jeweiligen *MYB*- und *bHLH*-Proteine in der Pflanze. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-System gezielt getestet werden, ob die *LAX*-homologen *bHLH*-Gene aus *Arabidopsis* mit *Blind*-homologen *MYB*-Genen interagieren können. Sequenzanalysen zeigten, dass *LAX* und *BA1* homolog zu den *Arabidopsis*-*bHLH*-Genen der Untergruppe VIIIb (Einteilung nach Heim et al., 2003) sind. Diese Untergruppe beinhaltet sechs Gene (Abb. 3-16), von denen *AtbHLH137* innerhalb der *bHLH*-Domäne die ähnlichste Sequenz zu *LAX* aufweist.

AtbHLH037	91	NMAAMREMI FRIAVMQPIHIDPE SVKPPKRRKNVRISKDPQSVAAARHRRERISERIRILQR
AtbHLH088	94	NMAAMREMI FRIAVMQPIHIDPEAVKPPKRRNVRIKDPQSVAAARHRRERISERIRILQR
AtbHLH040	85	MDAMKEMQYMIAVMQPVDIDPATVKKPNRRNVRIKDPQVVAARRRERISEIRILQR
AtbHLH043	91	ELGAMKEMMYKIAAMQSVDDIDPATVKKPKRRNVRIKDPQSVAAARHRRERISERIRILQR
AtbHLH087	241	ATAQMKEMIYRAAAFRRPVNFGLEIVKPKRRNVRIKDPQVVAARRRRERISEIRILQR
AtbHLH137	10	NPNSSSTTSSSSSFRHRKSETGNTKR.SRSTSTLSDPQSVAAARRRRERISERIRILQR
AtbHLH037	151	LVPGGTKMDTASMLDEAIIHYVKFLKKQVQSLEE.HAVV....NGGCMATAVAGGALAGTV
AtbHLH088	154	LVPGGTKMDTASMLDEAIIHYVKFLKKQVQSLEE.QAVVTGGGGGGGGRVLI GGGGMTAAS
AtbHLH040	144	LVPGGTKMDTASMLDEAIRYTKFLKRQVRILQP.HSQIGAP...MANPNSYLCYHNSQP
AtbHLH043	151	LVPGGTKMDTASMLDEAIIHYVKFLKRQIRLLNN.NTGYTPPPPQDQASQAWTTSWVSPPP
AtbHLH087	301	LVPGGTKMDTASMLDEAIIHYVKFLKRAQVKALENLRPKLDQTNLSFSSAPISFPPLFHPSPFL
AtbHLH137	69	LVPGGTKMDTASMLDEAIIHYVKFLKRAQIWIYHONMLLFINDHETTSSCTYSFPGAGEFGPKL

Abb. 3-16: Ausschnitt der ORFs der *LAX*- und *BA1*-homologen *bHLH*-Gene aus *Arabidopsis* mit den *bHLH*-Domänen. In den *bHLH*-Domänen ist der basische Bereich in blau, die Helices gelb und das Loop-Motiv grün dargestellt.

3.9.2 Allgemeine Bemerkungen zum Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System dient zur *in vivo*-Analyse von Proteininteraktionen in Hefezellen. Dabei macht man sich das *GAL4*-Protein aus Hefe zu nutze, das an den *GALI*-Promotor bindet und die Transkription aktiviert. Die beiden Domänen des *GAL4*-Transkriptionsfaktors aus Hefe üben ihre Funktionen in modularer Weise aus, d.h. die DNA-Bindung funktioniert unabhängig von der Aktivierung der Transkription. In der Zelle können weder die DNA-bindende Domäne, noch die Aktivierungsdomäne alleine die Transkription am *GALI*-Promotor aktivieren (Keegan et al. 1986, Brent und Ptashne, 1985). Um auf eine mögliche Interaktion von zwei Proteinen zu testen, wird das eine an die DNA-bindende Domäne (DB) und das andere an die transkriptionsaktivierende Domäne (AD) des *GAL4*-Proteins fusioniert (Fields und Song, 1989). Wenn nun ein AD-Fusionsprotein (prey; engl: Beute) mit einem Protein interagiert, das an die DNA-bindende Domäne fusioniert ist (bait; engl: Köder), werden die beiden *GAL4*-Domänen in räumliche Nähe zueinander gebracht. So kann die Transkription eines Reportergens aktiviert werden, das in seinen regulatorischen Sequenzen Bindestellen für den *GAL4*-Transkriptionsfaktor enthält. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System beruht darauf, dass bei den Experimenten Hefestämme verwendet werden, die für bestimmte essentielle Aminosäuren, z.B. *HIS3*, auxotroph sind. Durch eine Proteininteraktion wird ein Reportergen aktiviert, das für eine essentielle Aminosäure kodiert, so dass die Hefezellen prototroph auf entsprechendem Selektionsmedium wachsen können. Dadurch wird eine Selektion von Hefekolonien erreicht, die Proteine exprimieren, die miteinander interagieren.

Bei der Analyse von Proteinen, die selbst eine DNA-bindende-Domäne oder eine Aktivierungsdomäne besitzen, kann es zu Problemen mit unspezifischer Aktivierung des Reportergens kommen. Deshalb muss vor dem eigentlichen Experiment getestet werden, ob eines der zu untersuchenden Proteine Autoaktivierung vermittelt. Zu diesem Zweck werden die Proteine, fusioniert an die DB des *GAL4*-Proteins, zusammen mit der AD-Domäne des *GAL4*-Proteins (ohne Fusionierung) in Hefezellen exprimiert. Tritt dann Aktivierung des Reportergens auf, kann entweder die Stringenz der Selektion durch steigende Konzentrationen des kompetitiven Inhibitors 3-AT erhöht werden, oder die entscheidenden Aminosäuren des

Proteins, die die Autoaktivierung vermitteln, müssen identifiziert und entfernt werden. Mit Hilfe von Deletionskonstrukten lassen sich die Bereiche eines Proteins identifizieren, die eine Interaktion mit einem anderen Protein vermitteln. Eine Limitierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems besteht darin, dass die Interaktionen in einem heterologen System untersucht werden. So kann man z.B. aufgrund von fehlenden Proteinmodifikationen, die für eine Interaktion notwendig wären, falsche negative Ergebnisse erhalten. Ebenso können mit diesem System in der Regel keine Interaktionen nachgewiesen werden, für die ein drittes Protein benötigt wird. Zudem könnte sich in einigen Fällen die Konformation der Proteine in Hefezellen im Vergleich zu Pflanzenzellen, z.B. infolge eines unterschiedlichen pH-Werts, ändern. Dies könnte zur Folge haben, dass eine Interaktion, die normalerweise stattfinden würde, ausbleibt. Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System lässt sich zum einen gezielt testen, ob zwei bestimmte Proteine miteinander interagieren können, zum anderen lassen sich Hefe-Zwei-Hybrid-Banken screenen, um auf diese Weise unbekannte Interaktionspartner eines ausgewählten Proteins zu identifizieren.

3.9.3 Konstrukte für die Analyse von Interaktionen zwischen MYB- und bHLH-Proteinen

Für Mitglieder der *MYB*-Untergruppe (Abb. 1-2) und der *bHLH*-Untergruppe (Abb. 3-16) wurden Konstrukte für das Hefe-Zwei-Hybrid-System erstellt (Abb. 3-17).

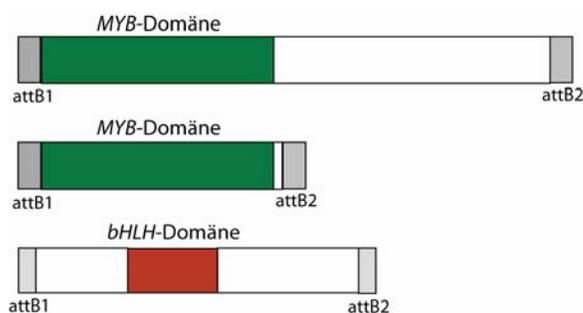


Abb. 3-17: Schematische Darstellung der Konstrukte für das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Das offene Leseraster aller untersuchten Gene wurde jeweils vor die DNA-bindende- und die aktivierende Domäne von *GAL4* kloniert. Für die *MYB*-Gene wurde jeweils ein zusätzliches Konstrukt erstellt, in dem die *MYB*-Domäne vor die DNA-bindende Domäne von *GAL4* kloniert wurde. *MYB*-Domänen sind grün dargestellt, *bHLH*-Domänen sind rot. Die restlichen Teile der ORFs sind weiß. attB1 und attB2 bezeichnen die Erkennungssequenzen für das Rekombinationsenzym der Klonierungsreaktion.

Die Konstrukte wurden angefertigt, indem die Bereiche der Gene, die kloniert werden sollten, ausgehend von cDNA aus *Arabidopsis*-Blättern, -Wurzeln oder –Blütenknospen, amplifiziert wurden. Die Primer zur Amplifikation wurden dabei so gewählt, dass das resultierende Produkt in einer translationalen Fusion an die DB oder vor die AD des *GAL4*-Gens in den Expressionsvektoren vorliegt. Für einige MYB-Proteine wurde gezeigt, dass Aminosäuren aus der MYB-Domäne wichtig sind für die Fähigkeit der Proteine zu interagieren (Grotewold et al., 2000). Darüber hinaus enthalten MYB-Proteine häufig eine Aktivierungsdomäne am C-Terminus. Aus diesen Gründen wurde für alle untersuchten *MYB*-Gene auch je ein Amplifikationsprodukt hergestellt, welches nur die MYB-Domäne umfasst. Diese Sequenzen wurden an die DB fusioniert und mit einem Stopkodon zur Termination des ORFs versehen. Alle erhaltenen PCR-Produkte, die auch Erkennungssequenzen für eine Rekombination enthielten, wurden zunächst mittels Rekombination in den Vektor pDONR201 integriert. Die entstandenen Plasmide wurden sequenziert, um die Sequenz der inserierten Fragmente zu überprüfen. In einem weiteren Rekombinationsschritt wurden die Genfragmente in die Vektoren pACT-attR (AD) und pAS-attR-new (BD) zur Expression in Hefe kloniert.

3.9.4 Untersuchungen zu Proteinwechselwirkungen zwischen MYB- und bHLH-Proteinen

3.9.4.1 Untersuchungen von MYB- und bHLH-Proteinen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System

3.9.4.1.1 Analyse der autoaktivierenden Wirkung von MYB- und bHLH-Proteinen

Um zu analysieren, ob die einzelnen Proteine autoaktivierend wirken, wurden die Plasmide jeweils einzeln in Hefezellen transformiert. Die transformierten Hefen wurden auf Selektionsmedien mit 5 mM 3-AT ausgestrichen und 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Experimente wurden mit einem Hefestamm (AH109) durchgeführt, der auxotroph für Tryptophan, Leucin, Uracil und Histidin ist. Der Vektor pAS-attR-new (BD) enthält das *TRP1*-

Gen, das den Zellen die Fähigkeit zur Tryptophan-Synthese vermittelt. pACT-attR (AD) besitzt dagegen ein Reporter-gen (*LEU2*), was den Hefezellen die Synthese von Leucin erlaubt. Zunächst wurden Hefezellen mit den DB-Fusionsplasmiden transformiert (Tab. 3-1). Diese Zellen wurden zunächst auf Medium ohne Tryptophan (SD-W) ausgestrichen, um die Anwesenheit des Plasmids nach der Transformation zu kontrollieren. Außerdem wurden die Zellen auf Medium ohne Tryptophan und Histidin (SD-WH) plattiert. Wachstum auf diesem Medium kann nur stattfinden, wenn das Fusionsprotein in der Hefe den *HIS3*-Repreter aktiviert und die Zellen dadurch Histidin produzieren können. Wachstum auf diesem Selektionsmedium zeigt also an, dass ein Gen autoaktivierend ist, wie es der Fall für *MYB36*, *MYB84*, *bHLH87* und *bHLH137* ist (Tab. 3-1).

DB-Plasmid (full length)	SD-W	SD-WH	Auto-aktivierung
Myb36	+	+	+
Myb37	+	-	-
Myb38	+	-	-
Myb84	+	+	+
bHLH-087	+	+	+
bHLH-088	+	-	-
bHLH-137	+	+	+

Tab. 3-1: Analyse der Autoaktivierung von Konstrukt mit Fusionen an die DB von *GAL4*. Die gesamten cDNA-Sequenzen der Gene wurden an die DB-Domäne fusioniert. Ein (-) bedeutet, dass keine Hefezellen gewachsen sind, während (+) Wachstum symbolisiert. Weitere Erklärungen im Text.

Zellen, die mit Plasmiden transformiert worden waren, die ein AD-Fusionsfragment enthielten, wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD-L) bzw. ohne Leucin und Histidin (SD-LH) ausplattiert. Hier bedeutet Wachstum auf SD-LH, dass das jeweilige Protein unspezifisch an die *GAL4*-Bindestelle im *GALI*-Promotor binden kann und die Transkription des *HIS3*-Reporters aktiviert. Bei den hier untersuchten Proteinen wurde in keinem Fall eine unspezifische Bindung an *GAL4*-Bindestellen gefunden (Tab. 3-2). Beide Experimente wurden mit einer 3-AT-Konzentration von 10 mM wiederholt. Dabei wurden jeweils Ergebnisse des ersten Experiment bestätigt.

AD-Plasmid	SD-L	SD-LH	Auto-aktivierung
Myb36 (ORF)	+	-	-
Myb37 (ORF)	+	-	-
Myb38 (ORF)	+	-	-
Myb36 (<i>MYB</i> -Domäne)	+	-	-
Myb37 (<i>MYB</i> -Domäne)	+	-	-
Myb38 (<i>MYB</i> -Domäne)	+	-	-
Myb68 (<i>MYB</i> -Domäne)	+	-	-
Myb84 (<i>MYB</i> -Domäne)	+	-	-

Tab. 3-2: Analyse der Autoaktivierung von Konstrukten mit Fusionen an die AD von *GAL4*. (-) bedeutet, dass keine Hefezellen gewachsen sind, während (+) Wachstum symbolisiert. Genauere Beschreibung der Konstrukte in Abb. 3-17. Weitere Erklärungen im Text.

3.9.4.1.2 Untersuchungen zu Interaktionen zwischen *MYB*- und *bHLH*-Proteinen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System

Um zu testen, ob zwei Proteine miteinander interagieren können, wurden die Hefen jeweils gleichzeitig mit zwei Plasmiden transformiert, von denen eins eine DB-Proteinfusion und das andere eine AD-Fusion enthielt. Zunächst wurde die Anwesenheit beider Plasmide in den Zellen durch Wachstum auf Selektionsmedium, das weder Leucin noch Tryptophan enthielt, sichergestellt. Danach wurden die entsprechenden Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausgestrichen und 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Wachstum wurde hier als Nachweis für eine Interaktion gewertet. In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob Proteine homodimerisieren können. Dazu wurden die vorhandenen DB-ORF-Klone, die keine Autoaktivierung zeigten (*MYB37* und *MYB38*) mit den vorhandenen *MYB*-Gen AD-ORF-Klonen (Tab. 3-2) in Hefezellen transformiert. Bei diesem Test zeigten *MYB37* und *MYB38* eine Interaktion (Abb. 3-17). Des Weiteren wurde das DB-ORF Plasmid mit den cDNA-Sequenzen von *bHLH88*, das keine Autoaktivierung gezeigt hatte, in Analysen zur Proteinwechselwirkung eingesetzt. Dazu wurde dieses Konstrukt zusammen mit je einem AD-ORF-Konstrukt der zu untersuchenden *MYB*-Gene (*MYB36*, *MYB37*, *MYB38*) in Hefezellen exprimiert. Von diesen Kombinationen zeigten *bHLH88* und *MYB37* eine Interaktion (Abb. 3-

18). Dieses Experiment wurde wiederholt, dabei wurden die gleichen Ergebnisse wie beim ersten erhalten. Nach einem positiven Ergebnis im Hefe-Zwei-Hybrid-System können *in vitro* Analysen der Proteininteraktionen, wie z.B. „pull down“ Experimente (Melcher und Johnsston, 1995), Aufschluss darüber geben, ob zwei Proteine tatsächlich miteinander agieren können. Diese Experimente konnten wegen der zeitlichen Limitierung im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

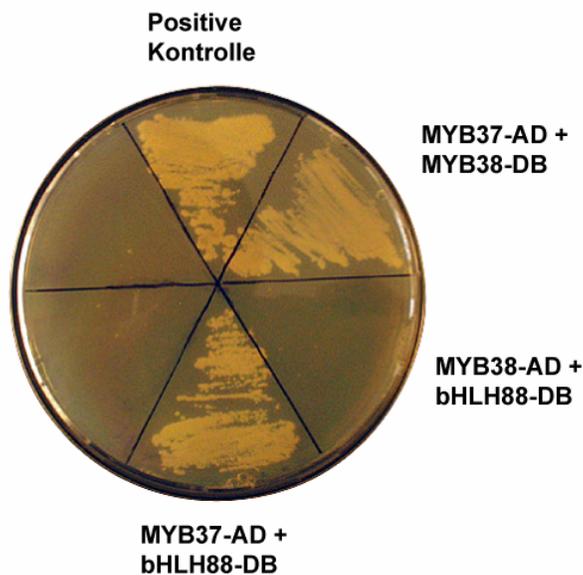


Abb. 3-18: Test auf Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Das Wachstum von Hefe-Kolonien zeigt Interaktionen der Proteine *MYB37* und *MYB38* sowie der Proteine *MYB37* und *bHLH88* an.

3.9.4.2 Charakterisierung des Verzweigungsphänotyps von *bhlh*-Mutanten

Wenn eine Interaktion zwischen *MYB37* und *bHLH88* eine biologische Funktion bei der Regulation der Sprossverzweigung hat, sollten Mutanten von *bHLH88* einen ähnlichen Phänotyp wie *myb37* zeigen, da *MYB37* seine Funktion dann ohne ein aktives *bHLH88*-Protein vermutlich nicht ausüben könnte. Um dies zu überprüfen, wurde eine GABI-Kat-Linie (Kap. 3-2) mit einer T-DNA-Insertion 561 bp hinter dem Startkodon identifiziert und durch Sequenzierung bestätigt. Die Insertion befindet sich 3' von der *bHLH*-Domäne. Homozygote Pflanzen wurden makroskopisch auf die Bildung von Seitentrieben hin analysiert, wie in Kap. 3.3.2 beschrieben. Dabei wurde im Vergleich zu Wildtypkontrollen (*Columbia*) kein

Unterschied in der Sprossverzweigung festgestellt. Es konnte also kein weiterer Hinweis für eine biologische Bedeutung der Interaktion zwischen bHLH88 und MYB37 erbracht werden. *bHLH88* besitzt jedoch im *Arabidopsis*-Genom ein eng verwandtes, homologes Gen (*bHLH37*); beide sind aus einer Genduplikation hervorgegangen (Heim et al., 2003). Aus diesem Grund könnte eine Funktion von *bHLH88* bei der Anlage von Achselmeristemen durch das Vorhandensein einer redundanten Genfunktion verborgen geblieben sein. Ebenso könnte funktionelle Redundanz zu anderen Mitgliedern der *bHLH*-Unterfamilie (Abb. 3-16) vorliegen. Weiterhin wurden zwei SALK-Insertionslinien (Kap. 3-2) identifiziert, bei denen eine T-DNA im Gen *bHLH137* inseriert ist, welches innerhalb der *bHLH*-Domäne die größte Sequenzähnlichkeit zu *LAX* aus Reis aufweist. Die Insertionen befinden sich jeweils 155 bp bzw. 396 bp hinter dem Startkodon und liegen 3' von der *bHLH*-Domäne, was durch Sequenzierung bestätigt wurde. Eine Analyse der Verzweigung von homozygoten Pflanzen der *bhlh137*-Linie mit der T-DNA-Insertion 396 bp hinter dem Startkodon zeigte keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyppflanzen (*Columbia*). Die identifizierten Verlustallele der verschiedenen *bHLH*-Gene sollen in Doppelmutanten kombiniert werden, um zu prüfen, ob eine funktionelle Redundanz vorliegt.

4 Diskussion

4.1 *Blind-homologe MYB-Gene aus Arabidopsis thaliana kontrollieren differenziell die Verzweigung entlang der Sprossachse*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen einer Gruppe von *R2R3-MYB*-Genen aus *Arabidopsis*, welche die größte Sequenzähnlichkeit zum *Blind*-Gen der Tomate besitzen, untersucht. Die Analysen der identifizierten *myb*-Insertionslinien (*myb37*, *myb38*, *myb84*) und ihrer Kombinationen in diversen Doppelmutanten und der Tripelmutante offenbarten eine Funktion der homologen Gene bei der Anlage von Achselmeristemen. Dies trifft vor allem auf die vegetative, aber in eingeschränktem Umfang auch auf die reproduktive Phase der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen der Ökotypen *Columbia* und *Wassilewskija* zu. Offensichtlich üben die drei Transkriptionsfaktoren, die von *MYB37*, *MYB38* bzw. *MYB84* kodiert werden, ähnliche Funktionen aus. Die Redundanz der genannten Faktoren wird zum einen daraus ersichtlich, dass alle drei Proteine die Bildung von Achselmeristemen regulieren. Zum anderen ist die Sprossverzweigung in den *myb84*- und *myb38*-Linien nicht gestört, während die entsprechende Doppelmutante einen starken Verzweigungsdefekt aufweist. Des Weiteren verstärkt das *myb38*-Allel erheblich den Defekt, der von *myb37* allein verursacht wird. Schließlich zeigt die Tripelmutante, wie erwartet, die stärkste Unterdrückung der Seitentriebbildung (Kap. 3.4). Da die *myb37 myb38*-Linie bereits einen erheblichen Verzweigungsdefekt aufweist, scheinen *MYB37* und *MYB38* den größten Einfluss auf die Anlage von Lateralmeristemen (LM) zu haben, während *MYB84* offenbar eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 4-1).

Die Analyse der Verzweigung in den mutanten Linien ergab jedoch auch, dass die Funktionen der Gene nicht identisch sind. Die Phänotypen der Insertionslinien lassen entlang der Sprossachse bestimmte Zonen erkennen, in denen die drei Proteine die Seitentriebbildung unterschiedlich regulieren (Abb. 4-2). In der *myb37*-Linie werden einem akropetalen Gradienten folgend zunehmend Seitentriebe gebildet, wobei in den ältesten Rosettenblattachsen gar keine Meristeme angelegt werden, in den jüngsten dagegen zu 100

Prozent (Abb. 3-4 F). *MYB37* scheint die Anlage von Achselmeristemen also vor allem in der frühen vegetativen Phase in den unteren beiden Dritteln der Sprossachse zu kontrollieren (Fig. 4-1, 4-2). Im Gegensatz zu *myb37* verläuft der Gradient der Seitentriebbildung in der *myb38 myb84* Linie komplementär. Während eine Sprossverzweigung nur in 30 bis 60 Prozent der jüngsten Rosettenblattachsen auftritt, werden in einem basipetalen Gradienten zunehmend mehr Seitentriebe gebildet. Die ältesten Blattachsen bilden dabei zu 100 Prozent Seitentriebe aus (Abb. 3-7 D). In der *myb38 myb84*-Linie ist im Vergleich zu der *myb38*-Einzelmutante die Verzweigung also vor allem im oberen Bereich der vegetativen Sprossachse reduziert (Abb. 3-6 A). Ein ähnlicher Verstärkungseffekt wurde beim Vergleich der *myb37 myb84*-Linie mit der *myb37*-Einzelmutante beobachtet. Diese Befunde unterstreichen die Rolle von *MYB84* bei der Kontrolle der Lateralmeristemanlage in der späten vegetativen Phase, während *MYB37* die beiden unteren Drittel der vegetativen Sprossachse kontrolliert (Fig. 4-1). Kombiniert man dagegen *myb38* mit *myb37*, so ist die Anlage von Lateralmeristemen entlang der gesamten Sprossachse erheblich gestört (Abb. 3-5 G und 4-2). Die Inhibition der Sprossverzweigung ist am ausgeprägtesten bei einer Kombination aller mutanten *myb*-Allele. In der Tripelmutante werden entlang der ganzen Achse kaum noch Seitentriebe gebildet (Abb. 3-8 D). *myb37 myb38* und die Tripelmutante offenbaren eine Kontrolle der Achselmeristembildung der ganzen vegetativen Sprossachse durch *MYB38*. Die Bereiche, in denen jeweils *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* notwendig für die Bildung von Seitentrieben sind, sind in Abb. 4-1 dargestellt.

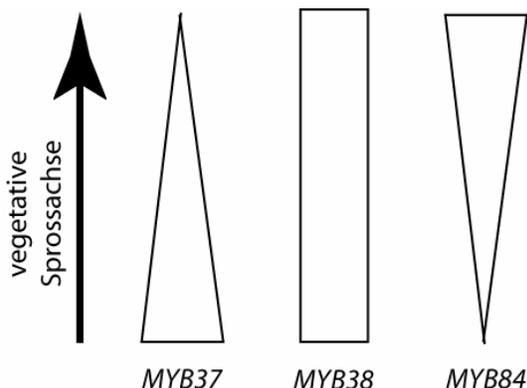


Abb. 4-1: Vereinfachte schematische Darstellung der unterschiedlichen Zonen, in denen *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* regulatorischen Einfluss ausüben. Die *MYB*-Gene 37, 38 und 84 kontrollieren in bestimmten Bereichen der vegetativen Sprossachse in unterschiedlichem Maß die Anlage von Achselmeristemen, was hier entsprechend durch die Breite der Formen dargestellt ist.

Unterschiede im Ausmaß der Verzweigungsdefekte und der Ausdehnung ihrer Ausprägungszonen entlang der Sprossachse lassen erkennen, dass die beteiligten Genfunktionen nur partiell redundant sind. Im Zusammenspiel erlauben die untersuchten *MYB*-Gene also eine Feinregulation der Seitentriebbildung in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanze (Abb. 4-2).

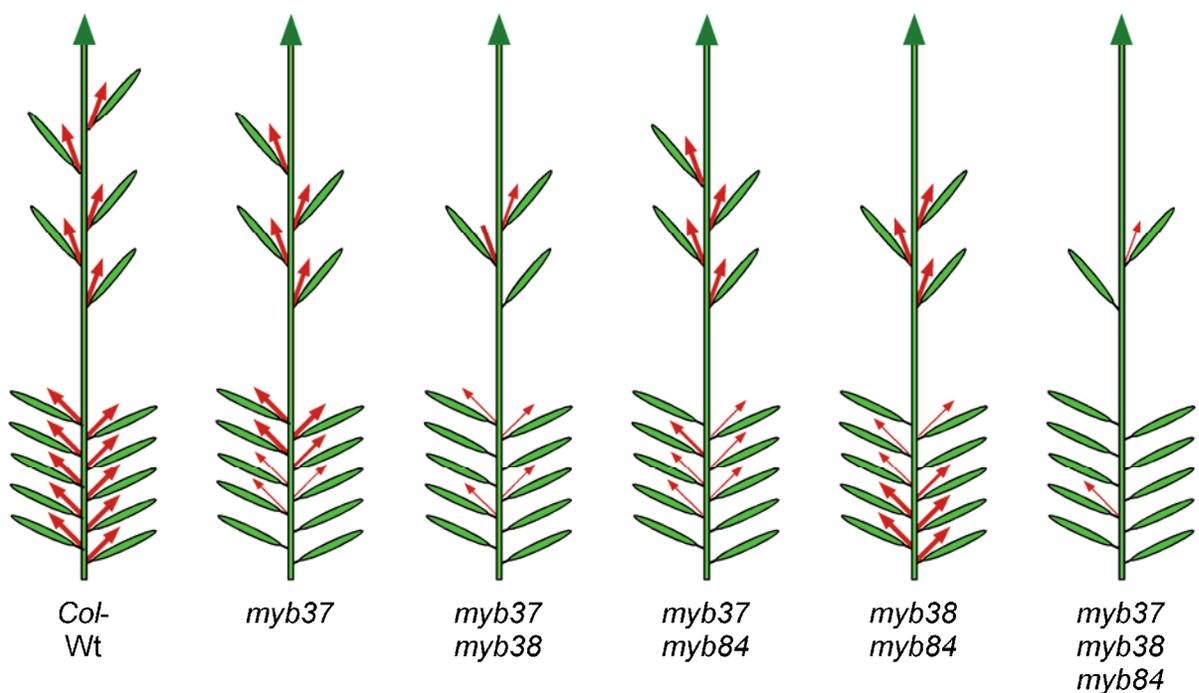


Abb. 4-2: Schematische Darstellung der Feinregulation der Verzweigung durch *Blind*-homologe *MYB*-Gene. Die Abbildung zeigt jeweils das Muster der Sprossverzweigung in *Arabidopsis thaliana*, das durch die Insertionsallele *myb37*, *myb38* und *myb84*, sowie deren Kombinationen, verursacht wird. Dargestellt ist die Seitentriebbildung anhand von Pflanzen, die bis zur Blüte unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Pfeilspitzen repräsentieren undeterminierte Wachstumszonen. Die Dicke der roten Pfeile (Seitentriebe) ist proportional zu dem Prozentsatz der Seitentriebe, der in einer bestimmten Zone in Blattachsen gebildet wurde.

Die Defekte, die Mutationen in *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* verursachen, lassen sich mit denen der *blind*-Mutante aus Tomate vergleichen. In der vegetativen Phase bildet *blind* nur in 10 bis 60 Prozent der Blattachsen Achselknospen, während Wildtypen in mehr als 99 Prozent ihrer Achseln Knospen anlegen. Bei *blind*-Pflanzen werden Seitentriebe meist im mittleren Bereich der vegetativen Sprossachse und im Bereich unterhalb der Infloreszenzen beobachtet, was an den Phänotyp der *myb37 myb38*-Linie erinnert (Abb. 3-5 G). Darüber hinaus

entwickeln sich in Blattachsen von *blind*-Mutanten manchmal kleinere Blätter oder nadelförmige Strukturen anstelle von Seitentrieben (Schmitz et al., 2002). Die Funktionen von *Blind* einerseits und von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* andererseits sind also zu einem beträchtlichen Grad konserviert, was die Kontrolle der Initiation, der Erhaltung und der Identität der Achselmeristeme betrifft (Vgl. Phänotyp der *myb37 myb38* Linie, Abb. 3-5 D). Ein auffälliger Unterschied besteht jedoch darin, dass die Infloreszenzverzweigung in *blind* wesentlich stärker betroffen ist als die in der *Arabidopsis*-Tripelmutante. Außerdem wurde in den *MYB*-Insertionslinien weder ein Defekt in der Blütenmorphologie noch eine veränderte Blütenanzahl oder Organidentität festgestellt, wie es bei *blind* der Fall ist (Schmitz et al., 2002). Diese Funktionen könnten in *Arabidopsis* auch von einem der noch nicht untersuchten Gene der *Blind*-verwandten Untergruppe (*MYB36*, *MYB68*, *MYB87*) übernommen worden sein. Außerdem könnten diese Gene auch eine Rolle bei der Anlage der Lateralmeristeme spielen. Möglicherweise würden Quadrupel- oder Quintupelmutanten gar keine Verzweigung in der Rosette mehr aufweisen. Um genaueren Aufschluss darüber zu erlangen, welches der *Arabidopsis*-Proteine *Blind* funktionell am nächsten kommt, bieten sich Komplementationsexperimente an. Dabei könnten die ORFs der *Arabidopsis*-Gene unter der Kontrolle der regulatorischen *Blind*-Sequenzen im *blind*-Hintergrund exprimiert werden. *MYB38* besitzt die größte Sequenzähnlichkeit zu *Blind* und hat auch gemäß der RT-PCR-Daten ein ähnliches Expressionmuster zu *Blind* (s. u.). *MYB68* und *MYB84* bilden auf Sequenzebene innerhalb der Gruppe das am engsten verwandte Paar, welches wiederum zu *MYB36* die größte Sequenzähnlichkeit besitzt (Stracke et al., 2001, Blanc et al., 2003, Feng et al., 2004). Für *MYB68* wurde eine starke Transkriptakkumulation in Perizykelzellen und eine Funktion bei der Regulation der Lignifizierung von Wurzeln beschrieben (Feng et al., 2004). Ob die Gene *MYB36* und *MYB84* auch eine ähnliche Funktion ausüben, bleibt zu untersuchen. Generell wurde bei Analysen von Genfamilien des öfteren gefunden, dass die Mitglieder einer Untergruppe ähnliche, aber nicht identische Funktionen in einem bestimmten biologischen Prozess übernehmen. So regulieren zum Beispiel die Gene *MYB66* (*WEREWOLF*), *MYB0* (*GLABRA-1*) und *MYB23* die Trichomininitiation in unterschiedlichen Teilen der Pflanzen (Larkin et al., 1993, Lee und Schiefelbein, 2001, Kirik et al., 2005).

Eine Frage, die sich aufgrund der beobachteten Phänotypen stellt, ist, wie die für die verschiedenen Mutanten beschriebenen Muster der Seitentriebbildung zustande kommen. Wie oben beschrieben, folgt die Achselmeristemanlage in *myb37*-Mutanten einem akropetalen Gradienten, während bei *myb38 myb84* Doppelmutanten ein basipetaler Gradient beobachtet wurde. Dies könnte bedeuten, dass *MYB37* nur in der frühen vegetativen Phase notwendig ist, *MYB84* dagegen ausschließlich in der späten vegetativen Phase. Alternativ dazu könnten die Aktivitätsprofile aber auch einen graduellen Abfall (*MYB37*) bzw. einen graduellen Anstieg (*MYB84*) entlang der vegetativen Sprossachse zeigen. Eine graduelle Zunahme oder Abnahme der Transkriptakkumulation im Verlauf der vegetativen Phase konnte allerdings durch RNA-ISH für *MYB37* nicht nachgewiesen werden (s. u.). Bei *MYB38* spricht der Phänotyp der *myb37 myb38*-Doppelmutante für eine Expression in allen Stadien der Entwicklung, was durch die RT-PCR und RNA-ISH-Analysen bestätigt wird. Darüber hinaus könnten die beobachteten Muster der Achselmeristembildung auch durch Modifikation der Proteinaktivität der beteiligten *MYB*-Gene zustande kommen und somit vom Muster der Transkriptakkumulation weitgehend unabhängig sein.

Die hier beschriebenen Veränderungen in den Verzweigungsmustern treten nicht nur nach Mutagenesen auf, sondern wurden auch in natürlich vorkommenden Ökotypen beobachtet. Ein Beispiel für ein nicht einheitliches Sprossverzweigungsmuster in der vegetativen Phase ist beim *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Zürich-0* zu finden. Pflanzen dieses Ökotyps bilden in der basalen Zone der Rosette in jeder Achsel einen Seitentrieb, während in der oberen Zone der Rosette keine Seitentriebe gebildet werden. Achseln, die keine Seitentriebe generieren, enthalten dennoch Zellen mit meristematischem Charakter, was sich in einer charakteristischen *STM*-Expression äußert (Kalinina et al., 2002). Die Meristemorganisation scheint jedoch gestört zu sein, da in diesen Achseln keine Zellproliferation zu beobachten ist. Diese Annahme wird bestätigt durch das Ausbleiben von *STM*-mRNA freien Zonen innerhalb der meristematischen Areale, die die Bildung von sehr jungen Blattprimordien anzeigen würden. Zudem bilden *Zürich-0*-Pflanzen kaum Seitentriebe in Stängelblattachsen (Kalinina et al., 2002). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass *Arabidopsis*-Accessionen mit reduzierter Sprossverzweigung in einer natürlichen Umgebung überlebensfähig sind und unter bestimmten Standortbedingungen möglicherweise einen Selektionsvorteil besitzen. Um zu untersuchen, ob

Veränderungen in der Struktur oder Expression der *Blind*-homologen *MYB*-Gene an der Etablierung des Verzweigungsmusters in *Zürich-0*-Pflanzen beteiligt sind, bietet sich zunächst eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR oder RNA-ISH in *Zürich-0*-Pflanzen an.

4.2 Die Bildung von Achselmeristemen in *Arabidopsis* wird durch zwei verschiedene Regulationswege kontrolliert

Das Gen *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* hat entscheidenden Einfluss auf die Anlage von Achselmeristemen. In *Arabidopsis* weist die *las-4*-Mutante während der vegetativen Phase einen Defekt bei der Anlage von Lateralmeristemen auf (Greb et al. 2003). Die Bildung von Seitentrieben in der Rosette ist weitgehend unterdrückt, nur in den jüngsten Rosettenblattachsen werden bis zu fünf Seitentriebe gebildet. In der Infloreszenz zeigt *las-4* keinen Verzweigungsdefekt, was darauf hindeutet, dass das Gen eine spezifische Rolle in der vegetativen Entwicklung spielt, in der reproduktiven Phase jedoch nicht benötigt wird (Kap. 3.7.3). Das Gen *MYB37* wird ebenfalls in der vegetativen Phase zur Bildung von Lateralmeristemen benötigt. Die Charakterisierung der *myb37*-Linie ergab, dass die Abhängigkeit der Achselmeristembildung von *MYB37* von den ältesten Blättern zu den jüngsten hin ständig abnimmt (Kap. 3.4.2.1). Die *myb37 las-4*-Doppelmutante bildete in der Rosette gar keine Seitentriebe mehr. *myb37* verstärkt also den Verzweigungsdefekt von *las-4* (Kap. 3.7.3). Außerdem wiesen die zuerst angelegten Stängelblätter der Doppelmutanten häufig leere Achseln auf (Abb. 3-15 C). Darüber hinaus war die sekundäre Verzweigung erheblich reduziert. Beides verdeutlicht eine Funktion der Gene *LAS* und *MYB37* in der reproduktiven Phase. Dieser neue Phänotyp der Doppelmutante deutet auf zwei verschiedene Reaktionswege hin, über die *LAS* und *MYB37* die Bildung von Seitentrieben regulieren. Eine Charakterisierung der *bl ls*-Doppelmutante in Tomate brachte ähnliche Ergebnisse (Schmitz et al., 2002).

Die Seitentriebe, die in der *Arabidopsis myb37 las-4*-Doppelmutante während der reproduktiven Phase gebildet wurden, terminierten oft frühzeitig, und manchmal entwickelten

sich in den Achseln anstelle von Seitentrieben blattartige Strukturen. In den Achseln der jüngeren Stängelblätter erfolgte oft die Bildung von Blüten anstelle von Seitentrieben (Abb. 3-15 H). Diese Befunde zeigen, dass die beiden Gene neben ihrer Funktion bei der Initiation von Achselmeristemen auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung dieser Meristeme und bei der Festlegung der Meristemidentität spielen.

RNA-ISH-Experimente bestätigten die Annahme, dass zwei Regulationsmechanismen existieren. Die Expressionsmuster von *MYB37* und *LAS* in *las-4* oder *myb37 myb38 myb84* wurden mit denen in *Columbia*-Wildtyppflanzen verglichen. Dabei waren die Muster der Transkriptakkumulation von *MYB37* in *las-4* und von *LAS* in der Tripelmutante nicht von denen in Wildtyppflanzen zu unterscheiden (Kap. 3.7.1). *MYB37* und *LAS* stehen also nicht in einer regulatorischen Beziehung zueinander. Die Ergebnisse bestärken daher die Hypothese, dass zwei Regulationsmechanismen die Bildung von Achselmeristemen kontrollieren.

Die Verzweigungsdefekte von *myb37* und der Kombinationen der anderen in dieser Arbeit charakterisierten *myb*-Allele wurden nur beobachtet, wenn die Pflanzen in kurzen Fotoperioden kultiviert wurden. Unter Langtagbedingungen waren die beschriebenen Defekte nicht festzustellen. Offensichtlich können also in langen Fotoperioden die Funktionen von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* hinsichtlich der Anlage von Achselmeristemen entbehrt werden. Unter diesen Bedingungen muss also eine andere Funktion die der drei *MYB*-Gene ersetzen. Möglicherweise könnte diese Funktion durch andere *MYB*-Gene erbracht werden, die ebenfalls zur Unterfamilie der *Blind*-homologen Gene gehören, und die in Bezug auf die Initiation von Achselmeristemen bisher noch nicht analysiert worden sind. Andererseits könnte ein weiterer, von den *MYB*-Genen unabhängiger Reaktionsweg existieren. Ein sehr wahrscheinliches Merkmal dieser Funktion ist ihre Regulierung in Abhängigkeit von der Tageslänge, wobei anzunehmen ist, dass diese Funktion im Langtag aktiv ist und im Kurztag reprimiert wird.

4.3 *MYB37- und MYB84-Transkripte akkumulieren in Achselmeristem-gründerzellen*

Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass die *Blind*-homologen *MYB*-Gene in *Arabidopsis* unterschiedlich reguliert werden. Sowohl die Gewebe, in denen die Transkripte der einzelnen Gene nachgewiesen wurden, als auch die Expressionsintensitäten unterscheiden sich (Abb. 3-1). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Untergruppen von Genfamilien berichtet (Lee und Schiefelbein, 2001, Prigge et al., 2005). Demzufolge könnten die hier untersuchten *MYB*-Gene sehr ähnliche Funktionen in unterschiedlichen Geweben ausüben, wie es z.B. für *WEREWOLF* und *GLABRA-1* bei der Wurzelhaar- und Trichomentwicklung nachgewiesen wurde (Lee und Schiefelbein, 2001). Dafür spricht auch die funktionelle Redundanz, die für *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* bei der Anlage von Achselmeristemen nachgewiesen wurde. Eine Diversifikation der *MYB*-Protein-Funktionen ist jedoch nicht auszuschließen; so sind die Proteinsequenzen im C-terminalen Bereich nicht konserviert, wodurch unterschiedliche Funktionen realisiert werden könnten.

Auffällig ist, dass alle *Blind*-homologen *MYB*-Gene aus *Arabidopsis* auch in der Wurzel exprimiert werden und dort die höchsten mRNA-Level zeigen (Abb. 3-1). Bei Untersuchungen zur lateralen Verzweigung der Wurzeln in den *myb37*-, *myb38*- und *myb84*-Insertionslinien sowie in den Doppel- und Tripelmutanten wurde jedoch kein Defekt beobachtet. Die Charakterisierung einer *myb68*-Mutante hat ebenfalls ergeben, dass die Verzweigung der Wurzeln nicht verändert war. *myb68*-Pflanzen wiesen jedoch einen erhöhten Ligningehalt auf (Feng et al., 2004). Hinsichtlich einer Funktion der *Blind*-homologen *MYB*-Gene in der Wurzel ist besonders auf *MYB36* hinzuweisen, da eine Transkriptakkumulation dieses Gens ausschließlich in der Wurzel nachgewiesen wurde. Da *MYB36*, *MYB68*, und *MYB84* die größten Sequenzähnlichkeiten unter einander aufweisen und aus rezenten Duplikationen hervorgegangen sind (Blanc et al., 2001), ist hier hinsichtlich der Wurzelfunktion eine ähnliche funktionelle Redundanz zu erwarten, wie es für *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* in Bezug auf die Bildung von Seitentrieben nachgewiesen wurde. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass sowohl für *MYB68* als auch für *MYB84* eine spezifische Expression in Perizykelzellen nachgewiesen wurde (Feng et al., 2004). Insofern ist eine Funktion der *Blind*-homologen *MYB*-

Gene bei der Verzweigung in der Wurzel naheliegend, auch wenn dies für *myb37*, *myb38* und *myb84* und deren Kombinationen (diese Arbeit), sowie für *myb68* (Feng et al., 2004) noch nicht gezeigt worden ist.

Neben der Expression in Wurzeln und Sprossspitzen, wo für *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* eine Funktion nachgewiesen wurde, offenbarte die RT-PCR-Analyse für die *Blind*-homologen *MYB*-Gene aus *Arabidopsis* zum Teil auch eine Transkriptakkumulation in Blütenknospen, offenen Blüten, Blättern und Internodien. Dabei fallen neben den schon erwähnten Gewebespezifitäten auch deutliche Unterschiede in den mRNA-Leveln auf (Abb. 3-1). Insgesamt besitzen die Transkriptionsmuster von *MYB37* und *MYB87* hinsichtlich der Gewebespezifität die größte Ähnlichkeit mit dem Expressionsmuster des *Blind*-Gens aus Tomate. Ausgehend vom Transkriptlevel kommt *MYB38* dem *Blind*-Gen am nächsten. Die Funktion der *MYB*-Gene in Blüten, Blättern und Internodien, die durch Redundanz der Gene verborgen geblieben sein könnte, bleibt zu analysieren.

Detailliertere Informationen über die Transkriptakkumulation von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* wurden durch RNA-ISH-Experimente gewonnen (Kap. 3.6). Dabei zeigte sich zunächst, dass *MYB37* und *MYB84* sehr ähnliche Expressionsdomänen aufweisen, *MYB84* jedoch schwächer exprimiert wird. Transkripte beider Gene markieren spezifisch die Zentren von jungen Blattachsen, wo zu einem späteren Zeitpunkt Achselmeristeme entstehen. Somit markieren die *MYB37*- und *MYB84*-Transkripte zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Zellgruppen, die die Kompetenz zur Meristemanlage besitzen. Die Expression dieser Gene in den Zellgruppen, aus denen die neuen Meristeme entstehen, lässt auf eine zellautonome Funktion der Proteine schließen.

Da die Anlage von Achselmeristemen in der frühen Phase der vegetativen Entwicklung am stärksten von *MYB37* abhängt, wurden auch junge, zwei Wochen alte Sprossspitzen untersucht. In diesen Apices konnte entgegen der Erwartung keine *MYB37*-mRNA nachgewiesen werden. Da in den Experimenten Gewebeschnitte aus vier Wochen alten Apices mit derselben *MYB37*-Sonde hybridisiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Hybridisierungen erfolgreich waren. Außerdem zeigten Kontrollexperimente mit den zwei Wochen alten Apices

ein unverändertes Muster der *STM*-Transkriptakkumulation. Der fehlende Nachweis des *MYB37*-Transkripts in sehr jungen Apices steht im Widerspruch zu der durch den Phänotyp von *myb37*-Pflanzen nahegelegten Funktion in der frühen vegetativen Entwicklung. Ein möglicher Grund für den fehlenden Nachweis der *MYB37*-mRNA könnte in der geringen Größe der jungen *Arabidopsis*-Meristeme liegen. In vier Wochen alten Apices umfasst das *MYB37*-Signal 3-5 Zellen sowohl in der longitudinalen als auch in der transversen Ebene. Da das zwei Wochen alte Meristem in *Arabidopsis* nur etwa ein Viertel des Umfangs eines vier Wochen alten Meristems besitzt, ist die Domäne, die das *MYB37*-Transkript markiert, vermutlich sehr klein. Erwartet man proportionsgemäß ein Viertel der Expressionsdomänengröße, so ist leicht vorstellbar, dass ein Signal, was vielleicht nur eine einzelne Zelle markieren würde, in den Schnitten „verpasst“ wird oder unterhalb der Nachweisgrenze liegt, die mit dieser Methode erfasst werden kann. Ein zweiter Erklärungsversuch für das Ausbleiben des *MYB37*-Signals in sehr jungen Apices geht von einer nicht zellautonomen *MYB37*-Funktion aus. In diesem Fall ist vorstellbar, dass in der Wurzel oder in anderen Organen, die *MYB37* exprimieren, ein Signal generiert wird, welches in den jungen Blattachsen die Anlage von Meristemen positiv beeinflusst. Pfropfungsexperimente könnten klären, ob *MYB37* eine Fernwirkung auf die Anlage von Lateralmeristemen hat.

In Analysen von jungen Blütenknospen wurde ebenfalls keine *MYB37*-mRNA nachgewiesen, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse steht. Ein Grund hierfür könnte darin bestehen, dass in den RNA-ISH-Experimenten sehr frühe Entwicklungsstadien von Blütenknospen untersucht wurden, während bei den RT-PCR-Experimenten ein Gemisch verschiedener Stadien vorlag. Die in der RT-PCR-Analyse nachgewiesene *MYB37*-Transkriptakkumulation könnte somit ausschließlich auf Transkription von *MYB37* in späteren Entwicklungsstadien von Knospen beruhen. Um diese Frage eindeutig zu klären, müssten Blütenknospen aller Entwicklungsstadien mittels RNA-ISH analysiert werden.

Die RNA-ISH-Experimente zeigten, dass *MYB38* ubiquitär exprimiert wird. Dieses zunächst überraschende Ergebnis wurde durch Hybridisierung mit einer zweiten, kürzeren Sonde bestätigt. Beide Sonden zeigten bei Sequenzvergleichen mit dem gesamten *Arabidopsis thaliana*-Genom keine Homologien zu anderen Sequenzabschnitten, was eine unspezifische

Hybridisierung zur Folge gehabt haben könnte. Des Weiteren wurde die *MYB38*-Transkriptakkumulation in Experimenten parallel zu anderen Genen untersucht, die eine spezifische Expression zeigten, wie z.B. *MYB37*. Daher kann von einer korrekten Durchführung der Experimente, in denen die *MYB38*-Expression analysiert wurde, ausgegangen werden. Die ubiquitäre Expression, die durch RNA-ISH-Experimente nachgewiesen wurde, stimmt mit der in RT-PCR-Experimenten nachgewiesenen Gewebeverteilung und der relativen Expressionsstärke von *MYB38* überein. Die Verteilung der *MYB38*-mRNA bringt die Frage mit sich, wie dieses Gen eine spezifische Funktion ausüben kann. Zum einen ist vorstellbar, dass die *MYB38*-Aktivität von einem Interaktionspartner abhängt, der spezifisch exprimiert wird. Zum anderen könnte die Spezifität der *MYB38*-Aktivität durch posttranskriptionale oder posttranslationale Modifizierung erfolgen. So könnte das *MYB38*-Protein nur in bestimmten Zellen aktiviert werden oder in genau festgelegten Domänen reprimiert werden.

Die Analyse der *STM*-Expression in der *myb*-Tripelmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp (*Columbia*) eine unveränderte Transkriptakkumulation in den Achseln der sehr jungen Blattprimordien, aber Unterschiede in älteren Blattachsen (Kap. 3.7.2). Obwohl in der Tripelmutante die Seitentriebbildung weitgehend unterdrückt ist, wird *STM* im SAM und in interprimordialen Regionen exprimiert. Da *STM* als Marker für den meristematischen Zustand von Zellen dient (Long und Barton, 2000), könnte die frühe *STM*-Expression in den Blattachsen eine Voraussetzung für die spätere Anlage von Achselmeristemen darstellen. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *STM* zwischen den sehr jungen Blattprimordien (ca. P1-P15) von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* unabhängig ist. Dagegen bleibt die im Wildtyp beobachtete fokussierte *STM*-Expression in älteren Blattachsen der Tripelmutante aus. Diese Befunde zeigen, dass die Aktivität der Gene *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* eine Voraussetzung für die Fokussierung der *STM*-Transkriptakkumulation darstellt und somit notwendig ist für die Initiation von Achselmeristemen.

Im zentralen Bereich der Blattachsen überlappen sich die Expressionsdomänen von *LAS* und *MYB37*. Da beide Gene eine Funktion bei der Anlage von Lateralmeristemen haben, war es naheliegend zu untersuchen, ob sie sich gegenseitig regulieren. Die Analyse zeigte jedoch, dass

dies nicht der Fall ist (Vgl. Kap. 4.1). Damit ergibt sich die Frage nach anderen Genen, die in die Initiation oder Organisation von Achselmeristemen involviert sind und mit den *MYB*-Genen zusammen wirken oder mit diesen in einer regulatorischen Beziehung stehen könnten. Zwei Gene, die wichtig für die Initiation des SAM sind, für die aber außerdem eine Funktion bei der Anlage von Lateralmeristemen nachgewiesen wurde, sind *CUC1* und *CUC2* (Aida et al., 1997). Während der Embryonalentwicklung werden die beiden *CUC*-Gene in den Achseln von Keimblättern exprimiert (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001). RNA-ISH-Analysen von Greb (2002) an vier Wochen alten vegetativen Apices zeigten, dass *CUC1* und *CUC2* in diesem Entwicklungsstadium sehr ähnlich wie *MYB37* und *MYB84* transkribiert werden. *CUC1*-mRNA wurde von P0 bis P6/7 nachgewiesen und dann wieder ab P22. Die frühe *CUC1*-Expression entspricht also in etwa der Transkriptionsphase von *MYB37*. *CUC2* wird dagegen von P0 bis P17 durchgehend transkribiert. Die beiden *CUC*-Gene markieren die Basis von Blattachseln, während *MYB37* und *MYB84* nur den zentralen Bereich an der Basis von Blattachseln markieren. Aufgrund der Parallelen in der Funktion der erwähnten *CUC*- und *MYB*-Gene sowie aufgrund der überlappenden Expressionsdomänen wäre es interessant zu untersuchen, ob die Regulation der erwähnten Gene in einer hierarchischen Abhängigkeit voneinander steht. Generell ist die Analyse der *MYB*-Gene in Bezug auf andere Mutanten interessant, die eine Störung bei der Anlage von Seitentrieben haben und eine überlappende Transkriptionsdomäne mit den *MYB*-Genen aufweisen.

4.4 Regulation des Blühzeitpunkts durch MYB37

Die *myb37*-Insertionslinie sowie die *myb37 myb38*-Doppelmutante und die Tripelmutante blühten in kurzen Fotoperioden früher als entsprechende Wildtypkontrollen. Unter Langtagbedingungen dagegen ist dieser Effekt aufgehoben. Pflanzen, die in Bezug auf den Blühzeitpunkt von Wildtypen abweichen, haben häufig einen veränderten Spiegel an Gibberellinsäure (GA; engl: gibberelic acid). Unter Kurztagbedingungen ist GA der limitierende Faktor, der die Blühinduktion von Pflanzen auslöst. Neben dem früheren

Blühzeitpunkt ist die längere Infloreszenz von *myb37* ein weiteres Merkmal, das man bei Mutanten mit erhöhter GA-Konzentration beobachten kann. Pflanzen, die *MYB38* überexprimieren (Kap. 3.7), weisen im Gegensatz dazu Merkmale auf, die auf niedrigere GA-Level hinweisen könnten. Erstens haben *35S::MYB38*-Pflanzen einen kleineren, gestauchten Habitus, wie dies bei GA-Biosynthesemutanten und GA-Signaltransduktionsmutanten, wie z.B. *gai*, beobachtet wird. Zweitens blühen diese Pflanzen im Gegensatz zu *myb37* später als der Wildtyp. Drittens produzieren *35S::MYB38*-Pflanzen oft keinen Pollen mehr. Die Pollenbildung in *Arabidopsis* ist ebenfalls durch GA reguliert. Die Expression der Gene *GAMYB33* und *GAMYB65* wird über eine miRNA reguliert, deren Transkription selbst durch GA kontrolliert wird. In *myb33 myb65* Doppelmutanten wird kein Pollen mehr produziert (Achard et al, 2004, Millar und Gubler, 2005). Zudem bilden die *MYB38*-Überexpressionspflanzen mehr akzessorische Seitentriebe als der Wildtyp. Insofern stellt sich die Frage, ob die veränderten Phänotypen der *myb*-Insertionslinien und der Pflanzen, die *MYB38* überexprimieren, auf Veränderungen in den GA-Konzentrationen zurückzuführen sein könnten. Dies könnte bedeuten, dass die Seitentriebbildung in *Arabidopsis* ebenfalls durch Gibberellinsäure reguliert wird. Die Phänotypen der *myb37*- und *35S::MYB38*-Pflanzen würden somit nahe legen, dass erhöhte GA-Level die Bildung von Achselmeristemen inhibieren, während erniedrigte GA-Level die Bildung von Seitentrieben fördern. Sakamoto et al. (2001) konnten zeigen, dass in Tabak eine Unterdrückung der Aktivität des GA-Biosyntheseogens *GA 20-Oxidase* durch das Homeodomänenprotein NTH15 eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des nicht determinierten Zustands der SAM-Zellen darstellt. In der Tat wurden bei exogener Applikation von GA Veränderungen im Sprossverzweigungsmuster beobachtet. Pflanzen, die mit GA gesprüht wurden, wiesen weniger Seitentriebe auf als nicht gesprühte Kontrollpflanzen (Napp-Zinn, 1967). Aufgrund dieser Hinweise wäre es interessant, die *myb*-Insertionslinien auf veränderte GA-Konzentrationen hin zu untersuchen. Da die frühblühenden Pflanzen in den vorliegenden Analysen jedoch gegenüber Kontrollen keine veränderte Rosettenblattanzahl aufwiesen, muss auch in Betracht gezogen werden, dass das frühere Blühen auf einer schnelleren Entwicklung der Pflanzen beruht und nicht durch erhöhte GA-Konzentrationen verursacht wird. Ebenso könnten die anderen Defekte auf einer spezifischen Funktion der *Blind*-homologen *MYB*-Gene beruhen, die nicht über GA vermittelt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Aida, M, Ishida, T, Fukaki, H, Fujisawa, H, Tasaka, M (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* 9:841-57.
- Aida, M, Ishida, T, 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.
- Alonso, JM, Stepanova, AN, Leisse, TJ, Kim, CJ, Chen, H, Shinn, P, Stevenson, DK, Zimmerman, J, Barajas, P, Cheuk, R, Gadrinab, C, Heller, C, Jeske, A, Koesema, E, Meyers, CC, Parker, H, Prednis, L, Ansari, Y, Choy, N, Deen, H, Geralt, M, Hazari, N, Hom, E, Karnes, M, Mulholland, C, Ndubaku, R, Schmidt, I, Guzman, P, Aguilar-Henonin, L, Schmid, M, Weigel, D, Carter, DE, Marchand, T, Risseeuw, E, Brogden, D, Zeko, A, Crosby, WL, Berry, CC, Ecker, JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
- Archard, P, Herr, A, Baulcombe, DC, Harberd, NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated micro-RNA. *Development* 131:3357-3365.
- Barton, MK, Poethig, RS (1993) Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and *SHOOT MERISTEMLESS* mutant. *Development* 119:823-831.
- Baumann, E, Lewald, J, Saedler, H, Schulz, B, Wisman, E (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an *En-1*-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theoret. Appl. Genet.* 97:729-734.
- Blanc, G, Wolfe, KH (2004) Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *Plant Cell* 16:1647-1649.
- Borevitz, JO, Xia, Y, Blount, J, Dixon, RA, Lamb, C (2000) Activation tagging identifies a conserved *MYB* regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12:2383-2394.
- Brand, U, Fletcher, JC, Hobe, M, Meyerowitz, EM, Simon, R (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* 289:617-619.
- Brent, R, Ptashne, M (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43:729-736.
- Byrne, ME, Barley, R, Curtis, M, Arroyo, JM, Dunham, M, Hudson, A, Martienssen, RA (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408:967-971.

- Byrne, M, Simorowski, J, Martienssen, RA (2002) *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* 129:1957-1965.
- Chuck, G, Lincoln, C, Hake, S. (1996) *KNATI* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8:1277-1289.
- Clark, SE, Running, MP, Meyerowitz, EM (1993) *CLAVATA1*, a negative regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119:397-418.
- Clark, SE, Jacobsen, SE, Levin, JZ, Meyerowitz, EM (1996) The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122:1567-1575.
- Clough, SJ, Bent, AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16:735-743.
- 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* 63:1311-1322.
- Debeaujon, I, Leon-Kloosterziel, KM, Koornneef, M (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122:403-414.
- Feng, C, Andreasson, E, Maslak, A, Mock, HP (2004) *Arabidopsis MYB68* in development and responses to environmental cues. *Plant Science* 167:1099-1107
- Fields, S, Song, O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Fletcher, JC, Brand, U, Running, MP, Simon, R, Meyerowitz, EM (1999) Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristem. *Science* 283:1911-1914.
- Foo, E, Bullier, E, Goussot, M, Foucher, F, Rameau, C, Beveridge, CA (2005) The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* 17:464-474.
- Freeling, M, Hake, S (1985) Developmental genetics of mutants that specify *Knotted* leaves in maize. *Genetics* 8:27-36.
- Gallavotti, A, Zhao, Q, Kyozyuka, J, Meeley, RB, Ritter, MK, Doebley, JF, Pè, ME, Schmidt, RJ (2004) The role of *barren stalk1* in the architecture of maize. *Nature* 432:630-635.
- Goff, SA, Cone, KC, Chandler, VL. (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Dev.* 6:864-875.
- Grbic, V, Bleecker, A (2000) Axillary meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 21:215-223.

- Greb, T (2002) Untersuchungen zur Rolle des Gens *LATERAL SUPPRESSOR* in der Seitentriebentwicklung von *Arabidopsis thaliana* H. und der Tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Dissertation, Universität zu Köln.
- Greb, T, Clarenz, O, Schäfer, E, Müller, 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.* 17:1175-1187.
- Groot, SPC, Keizer, LCP, De Ruiter, W, Dons, JJM (1994) Seed and fruit set of the *lateral suppressor* mutant of tomato. *Sci. Horti.* 59:157-162.
- Grotewold, E, Sainz, MB, Tagliani, L, Hernandez, JM, Bowen, B, Chandler, VL (2000) Identification of the residues in the Myb domain of maize *CI* that specify the interaction with the *bHLH* cofactor *R*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:13579-13584.
- Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Harper, JW, Adami, GR, Wei, N, Keyomarsi, K, Elledge, SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
- Hay, A, Kaur, H, Phillips, A, Hedden, P, Hake, S, Tsiantis, M. (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* 12:1557-1565.
- Hempel, FD, Feldman, LJ (1994) Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* 192:276-286.
- Horvath, DP, Anderson, JV, Chao, WS, Foley, ME (2003) Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8:534-540.
- Huala, E, Dickerman, AW, Garcia-Hernandez, M, Weems D, Reiser, L, LaFond, F, Hanley, D, Kiphart, D, Zhuang, M, Huang, W, Mueller, LA, Bhattacharyya, D, Bhaya, D, Sobral, BW, Beavis, W, Meinke, DW, Town, CD, Somerville, C, Rhee, SY (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* 29:102-105.
- Jackson, DP (1991) *In situ* hybridization in plants. In: *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*, DJ Bowles, SJ Gurr, M McPherson, eds. Oxford University Press, England.
- James, P, Halladay, J, Craig, EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
- Jeong, S, Trotochaud, AE, Clark, SE (1999) The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* 11:1925-1934.

- Kalinina, A, Mihajlovic, N, Grbic, V (2002) Axillary meristem development in the branchless Zu-0 ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215:699-707.
- Keegan, L, Gill, G, Ptashne, M (1986) Separation of DNA binding from the transcription activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 23:699-704.
- Kirik, V, Lee, MM, Wester, K, Herrmann, U, Zheng, Z, Oppenheimer, D, Schiefelbein, J, Hülskamp, M (2005) Functional diversification of *MYB23* and *GLI* genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development* 132:1477-1485.
- Komatsu, K, Maekawa, M, Ujiie, S, Satake, Y, Furutani, I, Okamoto, H, Shinamoto, K, Kyojuka, J (2003) *LAX* and *SPA*: Major regulators of shoot branching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:11765-11770.
- Koncz, C, Schell, J (1986) The promoter of T_L-DNS gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396.
- Krysan, PJ, Young, JC, Sussman, MR (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11:2283-2290.
- Prigge, MJ, Otsuga, D, Alonso, JM, Ecker, JR, Drews, GN, Clark, SE (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*. 17:61-76.
- Laufs, P, Peaucelle, A, Morin, H, Traas, J (2004) MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* 131:4311-4322.
- Larkin, JC, Oppenheimer, DG, Pollock, S, Marks, MD (1993) *Arabidopsis GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell* 5:1739-1748.
- Laux, T, Mayer, KF, Berger, J, Jürgens, G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122:87-96.
- Lee, MM, Schiefelbein, J (2001) Developmentally distinct *MYB* genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development* 128:1539-1546.
- Li, X, Qian, Q, Fu, Z, Wang, Y, Xiong, G, Zeng, D, Wang, X, Liu, X, Teng, S, Hiroshi, F, Yuan, M, Luo, D, Han, B, Li, J (2003) Control of tillering in rice. *Nature* 422:618-621.
- Lincoln, C, Long, J, Yamaguchi, J, Serikawa, K, Hake, S (1994) A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6:1859-1876.
- Long, JA, Moan, EI, Medford, JI, Barton, MK (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379:66-69.

- Long, J, Barton, MK (2000) Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 218:341-353.
- Mapelli, S, Lombardi, L (1982) A comparative auxin and cytokinin study in normal and *to-2* mutant tomato plants. *Plant & Cell Physiol.* 23:751-757.
- Mapelli, S, Kinet, JM (1992) Plant growth regulator and graft control of axillary bud formation and development in the *to-2* mutant tomato. *J. Plant Growth Regul.* 11:385-390.
- McConnell, JR, Barton, MK (1998) Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125:2935-2942.
- Melcher, K, Johnston, SA (1995) *GAL4* interacts with TAT-binding protein and coactivators. *Mol. Cell Biol.* 15:2839-2848.
- Millar, AA, Gubler, F (2005) The *Arabidopsis* *GAMYB*-like genes, *MYB33* and *MYB65*, are micro-RNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* 17:705-721.
- Napoli, CA, Beveridge, CA, Snowden, KC (1999) Reevaluation concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* 4:127-169.
- Napp-Zinn, K. (1967) Zur Physiologie der Verzweigung krautiger Pflanzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 80:218-226.
- Otsuga, D, DeGuzman, B, Prigge, MJ, Drews, GN, Clark, SE (2000) *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* 25:223-236.
- Payne, CT, Zhang, F, Lloyd GM (2000) *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics* 153:1349-1362.
- Pluthero, FG (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 21:4850-4851.
- Pysh, LD, Wysocka-Diller, JW, Camilleri, C, Bouchez, D, Benfey, PN (1999) The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW*-LIKE genes. *Plant J.* 18:111-119.
- Rojo, E, Sharma, VK, Kovaleva, V, Raikhel, NV, Fletcher, JC (2002) *CLV3* is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* *CLAVATA* stem cell signalling pathway. *Plant Cell* 14:969-977.
- Rosso, MG, Li, Y, Strizhov, N, Reiss, B, Dekker, K, Weisshaar, B (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53:247-59.

- Sakamoto, T, Kamiya, N, Ueguchi-Tanaka, M, Iwahori, S, Matsuoka, M (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes & Dev.* 15:581-590.
- Sambrook, J, Russell, DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schiefelbein, J (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:74-78.
- Schmitt, T (1999) *Isolierung und Charakterisierung des Lateral suppressor Gens aus Lycopodium obscurum* M. Dissertation, Universität zu Köln.
- Schmitz, G, Tillmann, E, Carriero, F, Fiore, C, Cellini, F, Theres, K (2002) The tomato *Blind* gene encodes a *MYB* transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1064-1069.
- 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* 96:290-295.
- 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.* 7:787-795.
- Smith, LG, Greene, B, Veit, B, Hake, S (1992) A dominant mutation in the maize homeobox gene *Knotted-1* causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* 116:21-30.
- Snow, M, Snow, R (1942) The determination of axillary buds. *New Phytol.* 41:13-22.
- Sorefan, K, Brooker, J, Haurogné, K, Goussot, M, Bainbridge, K, Foo, E, Chatfield, S, Ward, S, Beveridge, C, Rameau, C, Leyser, O (2003) *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes & Dev.* 17:1469-1474.
- Steeves, TA, Sussex, IM (1989) *Patterns in Plant Development*. 2nd edn., Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Steiner-Lange, S, Gremse, M, Kuckenberger, M, Nissing, E, Schächtele, D, Spenrath, N, Wolff, M, Saedler, H, Dekker, K (2001) Efficient identification of *Arabidopsis* knock-out mutants using DNA-arrays of transposon flanking sequences. *Plant Biol.* 3:391-397.
- Stirnberg, P, van de Sande, K, Leyser, HMO (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129:1131-1141.
- Stracke, R, Werber, M, Weisshaar, B (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:447-456.

-
- Stubbe, H (1959) Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller III. Kulturpflanze 7:82-112.
- Stubbe, H (1964) Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller V. Kulturpflanze 12:121-152.
- Sussex, IM (1989) Developmental programming of the shoot meristem. Cell 56:225–229.
- Takada, S, Hibara, K, Ishida, T, Tasaka, M (2001) The *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. Development 128:1127-1135.
- Talbert, PB, Adler, HT, Paris, DW, Comai, L (1995) The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. Development 121:2723-2735.
- Vollbrecht, E, Veit, B, Sinha, N, Hake S (1991) The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. Nature 350:241-243.
- Williams, W (1960) The effect of selection on the manifold expression of the "suppressed lateral" gene in the tomato. Heredity 14:285-296.
- Wisman, E, Cardon, GH, Fransz, P, Saedler, H (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. Plant Mol. Biol. 37:989–999.
- Zhong, R, Ye, ZH (1999) *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. Plant Cell 11:2139-2152.
- Zhong, R, Ye, ZH (2004) *amphivasal vascular bundle 1*, a gain-of-function mutation of the *IFL1/REV* gene, is associated with alterations in the polarity of leaves, stems and carpels. Plant Cell Physiol. 45:369-385.

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

6 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. Klaus Theres betreut worden.

Köln, den 30.05.05

Dörte Müller

Greb T, Clarenz O, Müller D, Herrero R, Schäfer E, Schmitz G, Theres K (2003) Mutations in the *Arabidopsis* and tomato *Lateral suppressor* genes reveal a conserved control mechanism for lateral meristem formation in higher plants. *Genes & Dev.* 17: 1175-1187

7 Zusammenfassung

Mit dem *R2R3-MYB*-Gen *Blind* aus Tomate wurde ein Faktor beschrieben, der die Anlage von Achselmeristemen reguliert (Schmitz et al, 2002). Im *Arabidopsis thaliana*-Genom gibt es eine Untergruppe von sechs *R2R3-MYB*-Genen, die homolog zu *Blind* sind und die innerhalb der *MYB*-Domäne 76% bis 86% Identität in der Aminosäuresequenz aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es, eine dem *Blind*-Faktor aus Tomate entsprechende Funktion in *Arabidopsis* zu identifizieren. In mehreren Screenings von Insertions-Populationen wurden für die Hälfte der Mitglieder der *Blind*-homologen Untergruppe – *MYB37*, *MYB38* sowie *MYB84* – Knock-out-Linien identifiziert. Diese mutanten Allele wurden sowohl einzeln als auch in jeder möglichen Kombination in Doppel- und Tripelmutanten unter Kurztagbedingungen charakterisiert. *myb37* und verschiedene Doppelmutanten sowie die Tripelmutante zeigen unterschiedliche Defekte in der Sprossverzweigung. In der Tripelmutante war die Expression des *STM*-Gens, das als Marker für die meristematische Identität von Zellen gilt, in älteren Blattachsen nicht mehr nachzuweisen. Dies ist ein Beleg dafür, dass in den *myb*-Mutanten keine lateralen Meristeme angelegt werden. Folglich sind *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* an einem frühen Schritt der Etablierung von lateralen Meristemen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde damit erstmals in *Arabidopsis thaliana* eine Funktion von *MYB*-Transkriptionsfaktoren bei der Anlage von Achselmeristemen sowohl in der vegetativen als auch der reproduktiven Phase nachgewiesen. Die Kombination der mutierten *MYB*-Gene zeigte, dass die Funktionen der einzelnen Proteine zum einen redundant und zum anderen komplementär zueinander sind. Damit ermöglichen *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* in ihrer Kombination eine Feinregulation der Verzweigung entlang der Sprossachse, indem sie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanzen auf die Initiation von lateralen Meristemen Einfluss nehmen.

Knock-out-Linien, die ausschließlich in langen Fotoperioden kultiviert wurden, wiesen in den Analysen ihrer Verzweigungsphänotypen keinen der oben beschriebenen Verzweigungsdefekte auf. Unter diesen Bedingungen war lediglich die Bildung von akzessorischen Seitentrieben aus Stängelblättern reduziert. Die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps der *myb*-Mutanten offenbarte somit eine Abhängigkeit der Initiation von Achselmeristemen von der Tageslänge.

Untersuchungen zur Transkriptakkumulation von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* mittels RT-PCR und RNA-*in-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass *MYB38* ubiquitär exprimiert wird, während *MYB37* und *MYB84* in der vegetativen und reproduktiven Phase spezifisch in den Zentren von Blattachsen, den Orten der Entstehung von lateralen Meristemen, exprimiert werden. *MYB37*- und *MYB84*-Transkripte markieren daher wahrscheinlich in einem sehr frühen Stadium Achselmeristemgründerzellen.

Analysen von *myb37 las-4*- bzw. *myb84 las-4*-Doppelmutanten ergaben, dass in *Arabidopsis* mindestens zwei unabhängige Regulationswege existieren, die die Anlage von Achselmeristemen kontrollieren. Expressionsstudien mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierungen bestätigten diese Hypothese, da die Gene *MYB37* und *LAS* nicht in einer regulatorischen Abhängigkeit zu einander stehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die beiden Regulationswege während der reproduktiven Phase in redundanter Weise neben der Initiation auch die Aufrechterhaltung und Identität von Achselmeristemen kontrollieren. Bisher waren diese Funktionen von *LAS* noch nicht bekannt.

Untersuchungen zur Proteinfunktion von *MYB37*, *MYB38* und *MYB84* mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems deuten auf eine Proteininteraktion zwischen *MYB37* und *bHLH88* hin.

8 Abstract

The tomato *Blind* gene encodes a *MYB* transcription factor that controls the formation of lateral meristems (Schmitz et al, 2002). The *Arabidopsis thaliana* genome contains a subgroup of six *R2R3-MYB* genes, which are homologous to *Blind* and show 76% to 86% sequence identity within their *MYB*-domains. The aim of this work was to identify a *Blind*-corresponding function in *Arabidopsis*. Several insertion line populations were screened for knock-outs in the *Blind*-homologous genes from *Arabidopsis*. For the genes *MYB37*, *MYB38*, and *MYB84* insertion lines were identified. These mutants were characterized under short day conditions one by one as well as in all possible combinations of double mutants and a triple mutant. *myb37*, the double mutants and the triple mutant showed different defects in shoot branching. In the triple mutant, expression of *STM*, which is referred to as a meristem identity marker, was no longer detectable in older leaf axils. This demonstrates that lateral meristems are not initiated in the triple mutant and suggests that *MYB37*, *MYB38* and *MYB84* are involved in an early step of axillary meristem formation. Therefore, this study demonstrates for the first time that in *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors play a role in the regulation of lateral meristem formation during the vegetative phase and the reproductive phase of development. Combinations of the mutated *MYB*-genes revealed, that the respective proteins function both in a redundant and a complementary manner. This mechanism leads to a fine tuning of shoot branching along the shoot axis and may be instrumental to adapt the process of shoot branching to environmental conditions.

Knock-out lines which were cultivated under long day conditions did not show any of the branching defects observed in short photoperiods. In long days, only the formation of accessory side shoots from cauline leaf axils was reduced. Thus the different phenotypes of the *myb* mutants also revealed a dependence of axillary meristem initiation on day length.

Studies on transcript accumulation of *MYB37*, *MYB38*, and *MYB84* by RNA *in situ* hybridizations showed a ubiquitous expression of *MYB38*, whereas both, *MYB37* and *MYB84*, were found to be transcribed specifically in the centers of leaf axils, where lateral meristems

are formed. These findings indicate that *MYB37* and *MYB84* transcripts mark axillary meristem founder cells at a very early stage.

Analyses of *myb37 las-4* and *myb84 las-4* double mutants suggested that two pathways regulate the formation of lateral meristems in *Arabidopsis*. Expression studies of *LAS* and *MYB37* by RNA *in situ* hybridizations confirmed this hypothesis. In addition to these findings it was shown that both pathways act redundantly during the reproductive phase of development controlling not only the initiation of lateral meristems but also their maintenance and their identity. Until now this function was not known for *LAS*.

Studies on protein function of *MYB37*, *MYB38* and *MYB84* using the yeast two hybrid system indicate an interaction between *MYB37* and *bHLH88*.

Danksagung

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre und für Hilfsbereitschaft im Labor, außerdem für die Bereitschaft zur Diskussion. Insbesondere gilt dies für Dr. Gregor Schmitz, der stets offen für Fragen und Diskussionen war und zahlreiche Anregungen zu dieser Arbeit gegeben hat. Prof. Dr. Klaus Theres danke ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich ihm ebenfalls für viele freundliche und konstruktive Diskussionen.

Rüdiger Simon danke ich für fachlich exzellente Unterstützung bei der Etablierung der RNA-*in-situ*-Hybridisierungen.

Außerdem danke ich Peter Huijser und Coral Vincent für ihre Hilfsbereitschaft.

Bei Karin Klein möchte ich mich bedanken für die Hilfe bei der Bildbearbeitung.

Prof. Dr. Wolfgang Werr danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und Prof. Dr. Martin Hülskamp für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.