

**Trichom-Entwicklung in *Arabidopsis thaliana* als
Modellsystem für *de novo* Musterbildungsprozesse**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Katja Wester
aus Bergisch Gladbach**

Köln, 2009

**Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Hülskamp
Prof. Dr. Ute Höcker**

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Werr

Tag der mündlichen Prüfung: 28-04-2009

DANKE!

Ich möchte mich bei der Prüfungskommission bedanken, die es mir ermöglichen, die Doktorarbeit abzuschließen. Besonderen Dank an Prof. Dr. Martin Hülskamp, der mich während meiner Arbeit begleitet hat. Prof. Dr. Ute Höcker danke ich für die Übernahme des Korreferats. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhl III, die eine großartige Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Uschi und den TA's spreche ich ein Lob aus für die Selbstverständlichkeit, dass alles, was man zum Arbeiten braucht, immer da ist. Ich danke Martina, Philipp und besonders Frank für ihre Zeit, die sie mit Lesen und Ratschlägen für meine Arbeit verbracht haben. Rachappa, "thanks for switching off the cooling system". Großen Dank dem Plautzen-Office für viele lustige und leckere Stunden. Bei Moritz Pähler möchte ich mich für seine Unterstützung bei den Laser-Ablationen bedanken und bei Florian Geier für seine mathematischen Modellierungen.

I. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung / Abstract	VII-VIII
Publikationen	IX
1. Einleitung	1-13
1.1 Epidermale Musterbildungsprozesse in <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2 Zelluläre Betrachtung von Musterbildungsprozessen	3
A) Zellabstammung	3
B) Zell-Zell Kommunikation	3
1.3 Aktivator-Inhibitor Modell	5
1.4 Interzelluläre Wanderung von Proteinen	6
1.5 Trichom-Entwicklung	6
1.6 Genetische Betrachtung der Trichom-Entwicklung	8
A) Trichom-Aktivatoren	8
B) Trichom-Inhibitoren	9
1.7 Funktion der Trichom-Regulatorgene in der Wurzel	10
1.8 Modell für die Trichom-Musterbildung	11
1.9 Ziel dieser Arbeit	12
2. Ergebnisse	14-58
2.1 Charakterisierung von <i>ETC3</i> als Trichom-Regulatorgen	14
2.1.1 Molekulare Analyse von <i>ETC3</i>	15
A) Protein-Sequenzvergleich der Trichom-Inhibitoren	15
B) Analyse der <i>etc3</i> Mutante (Salk_094027)	15
2.1.2 Phänotypische Analyse der <i>etc3</i> Mutante	17
A) Trichom-Phänotyp von <i>etc3</i>	17
B) Blattphänotyp der <i>etc3</i> Mutante	19
2.1.3 <i>ETC3</i> Expression <i>in planta</i>	19
A) Überexpression von <i>ETC3</i>	20
B) GUS Expressionsanalyse von <i>ETC3</i>	20

C) ETC3 Expressionsanalyse in verschiedenen Geweben	22
D) Rettung der <i>etc3</i> Mutante	22
E) Untersuchung der Rosetten-Größe in Abhängigkeit von ETC3	23
F) Protein Lokalisation von ETC3	24
2.1.4 Protein-Protein Interaktionsanalysen mit ETC3	26
2.1.5 Untersuchung möglicher redundanter Funktionen von ETC3	28
2.1.6 Untersuchung der Stomata-Dichte und -Verteilung in Abhängigkeit von ETC3	32
2.2 Untersuchung der Trichom-Inhibitoren auf Protein- und Expressionsebene	34
2.2.1 Protein-Protein Interaktions- und Kompetitionsstärken	34
A) GAL4 Zwei-Hybrid Test	34
B) GAL4 Drei-Hybrid Kompetitionstest	36
2.2.2 Bindungsaffinität <i>versus</i> Mobilität	39
A) Untersuchung der Mobilität und Signalstärke in Abhängigkeit von der Bindungsaffinität	39
B) Zeitliche und zelluläre Untersuchung der Mobilität	43
2.2.3 <i>ETC3</i> Expression unter Kontrolle des <i>TRY</i> und <i>CPC</i> Promotors	45
2.3 <i>CPC</i> und <i>TRY</i> Mutagenese	47
2.4 <i>In vivo</i> Verfolgung der Trichom-Musterbildung	50
2.5 Zell-Ablation: Untersuchung der <i>de novo</i> Trichom-Musterbildung	55
3. Diskussion	59-76
3.1 ETC3 besitzt die Funktion eines Trichom-Inhibitors	59
3.2 Trichom-Inhibitoren besitzen funktionale Unterschiede auf Protein- und Expressionsebene	65
3.3 <i>TRY</i> und <i>CPC</i> Mutagenese	71
3.4 Verfolgung der Trichom-Musterbildung <i>in vivo</i> zeigt charakteristische Merkmale des Aktivator-Inhibitor Modells	73
3.5 Verfolgung der <i>de novo</i> Trichom-Musterbildung	75
4. Material / Methoden	77-99
4.1 Molekularbiologische Arbeiten	77
4.2 Gateway-Klonierungssystem	79
4.3 Arbeiten mit Bakterien	80

4.4 Antibiotika	81
4.5 Arbeiten mit Hefen	82
4.6 Arbeiten mit <i>Arabidopsis</i>	85
4.7 Klonierungsstrategien	88
4.8 Mikroskopie	94
4.9 GUS-Färbung	94
4.10 Propidiumiodid-Färbung	95
4.11 Partikel-Beschuss	95
4.12 Mikroinjektionsanlage	95
4.13. Primer-Sequenzen	96
4.14 Lösungen / Medien	97
5. Literaturverzeichnis	100-107
6. Anhang	108-109
Erklärung	
Lebenslauf	

II. Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1.1: Epidermale Modellsysteme für Musterbildungsprozesse in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
Abb. 1.2: Aktivator-Inhibitor Modell	5
Abb. 1.3: Trichom-Entwicklung auf Rosettenblättern in <i>Arabidopsis</i>	7
Abb. 1.4; Trichom-Musterbildungsmutanten in <i>Arabidopsis</i>	10
Abb. 1.5: Modell für die Trichom-Musterbildung	12

2. Ergebnisse

Abb. 2.1.1: Protein-Sequenzvergleich mit ETC3	15
Abb. 2.1.2: Molekulare Analyse von <i>ETC3/etc3</i>	16
Abb. 2.1.3: Trichom-Phänotyp von <i>etc3</i>	18
Abb. 2.1.4: Epidermale Zellgröße	19
Abb. 2.1.5: Überexpression von ETC3	20
Abb. 2.1.6: GUS Expressionsanalyse von <i>ETC3</i>	21
Abb. 2.1.7: Gewebespezifische <i>ETC3</i> Expressionsanalyse	22
Abb. 2.1.8: Rosetten-Größe	24
Abb. 2.1.9: Lokalisation von ETC3	26
Abb. 2.1.10: GAL4 Zwei-Hybrid Interaktionstest	28
Abb. 2.1.11: Größenunterschied der Pflanzen in Abhängigkeit von <i>etc3</i>	30
Abb. 2.1.12: Trichom-Inhibitor Mehrfachmutanten	31
Abb. 2.2.1: GAL4 Zwei-Hybrid Interaktionstest	35
Abb. 2.2.2: GAL4 Drei-Hybrid Kompetitionstest	38
Abb. 2.2.3: Trichom-Phänotyp in Abhängigkeit von GL3	41
Abb. 2.2.4: Vergleich der Mobilität und Signalstärke in Abhängigkeit von GL3	42
Abb. 2.2.5: Reversible CPC-DRONPA-GFP Fluoreszenz	44
Abb. 2.2.6: Rettung der <i>cpc try etc3</i> Mutante	46
Abb.2.3.1: CPC und TRY Mutagenese	49
Abb. 2.4.1: Verfolgung der Blatt- und Trichom- Entwicklung	51
Abb. 2.4.2: Trichom-Entwicklung <i>in vivo</i>	54

Abb. 2.5.1: Zell-Ablation 58

3. Diskussion

Abb. 3.1. Modell für die Signalreichweiten der Inhibitoren in Abhängigkeit zu GL3 68

Abb. 3.2: Trichom-Musterbildung nach den Regeln des Aktivator-Inhibitor Modells 74

Abb. 3.3: Nachweis-Methode für eine *de novo* Trichom-Musterbildung 76

III. Tabellenverzeichnis

2. Ergebnisse

Tab. 2.1.1: Trichom-Verzweigungsgrad	18
Tab. 2.1.2: Anzahl epidermaler Zellen pro Fläche	19
Tab. 2.1.3: Trichom-Anzahl in Abhängigkeit von ETC3	23
Tab. 2.1.4: Rosetten-Durchmesser in Abhängigkeit von ETC3	24
Tab. 2.1.5: Trichom-Anzahl und Trichom-Nester Frequenz in Trichom-Inhibitor Mutanten	32
Tab. 2.1.6: Stomata-Anzahl pro Fläche	33
Tab. 2.2.1: Trichom-Anzahl in Abhängigkeit von GL3	41
Tab. 2.2.2: Mobilität der Inhibitoren in Abhängigkeit von GL3	42
Tab. 2.2.3: Signalstärken der Inhibitoren in Abhängigkeit von GL3	43
Tab. 2.2.4: Trichom-Anzahl in Abhängigkeit von <i>ETC3</i>	46
Tab. 2.3.1: CPC und TRY Mutagenese	49

Material / Methoden

Tab. 4.1: Bakterien- und Hefestämme	82
Tab. 4.2: Antibiotika	82
Tab.4.3 A: Aminosäure-Selektionsmarker der Hybridplasmide	85
Tab.4.3 B: Verwendete Interaktionsplatten	85
Tab. 4.4: Verwendete Pflanzenlinien	87
Tab. 4.5: Primer für Genotypisierung	87
Tab. 4.6: Klonierungsvektoren	89
Tab. 4.7: Binäre ETC3 Vektoren	91
Tab. 4.8: Hefevektoren	92
Tab. 4.9: Binäre CPC/TRY mutierte Vektoren	93

IV. Zusammenfassung

Die Trichom-Musterbildung in *Arabidopsis thaliana* stellt ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung von Musterbildungsprozessen in Pflanzen dar. Die Trichom-Entwicklung wird von bHLH- und MYB-Transkriptionsfaktoren zusammen mit einem WD-40 Protein reguliert. Zu den MYB-Transkriptionsfaktoren zählen die Trichom-Inhibitoren TRY, CPC, ETC1, ETC2 und TCL1 und die Trichom-Aktivatoren GL1 und MYB23. GL3, EGL3 und TTG1, ebenfalls Trichom-Aktivatoren, kodieren für bHLH-Transkriptionsfaktoren bzw. für das WD-40 Protein. Die Trichom-Inhibitoren, auf die sich diese Arbeit konzentriert, regulieren nach der postulierten *de novo* Trichom-Musterbildung das regelmäßige Abstandsmuster zwischen den Trichomen durch laterale Inhibition, was in dem Aktivator-Inhibitor Modell beschrieben wird. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass ein weiteres Gen, *ETC3* an der Regulation der Trichom-Musterbildung als Trichom-Inhibitor beteiligt ist.

Untersuchungen der Trichom-Inhibitoren auf Proteinebene zeigen neue Aspekte der lateralen Inhibition durch deren Mobilität. Durch Kompetitionsanalysen wird gezeigt, dass die Inhibitoren ETC1, ETC3, CPC und TRY am Mechanismus der lateralen Inhibition durch die Verdrängung von GL1 aus dem Aktivator Komplex beteiligt sind, wohingegen ETC2 keine Kompetitor-Eigenschaft besitzt. Weiterhin wird anhand von CPC und ETC3 gezeigt, dass die Inhibitoren unterschiedliche Signalreichweiten für die laterale Inhibition besitzen, die aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten zu GL3 erklärt werden. Für diese Beobachtung wird ein theoretisches Modell postuliert, nach dem ETC2 die längste Signalreichweite der Inhibitoren besitzt, gefolgt von ETC3 und TRY. CPC und ETC1 haben nach diesem Modell lediglich eine kurze Signalreichweite. Auf Expressionsebene werden Unterschiede zwischen den Promotoren von *CPC*, *TRY* und *ETC3* aufgezeigt. Weiterhin werden die Inhibitoren CPC und TRY auf eine mögliche posttranslationale Phosphorylierung untersucht um eine eventuelle Regulation der inhibitorischen Aktivität und/oder der Mobilität aufzudecken.

Weiterhin wird eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht, die Trichom-Musterbildung in Rosettenblättern von der Entstehung der Trichom-initialzellen bis hin zum adulten Stadium *in vivo* zeitlich zu verfolgen. Daraus ergibt sich einerseits eine neue Möglichkeit, die Musterbildung quantitativ *in silico* zu analysieren. Außerdem dient diese Methode der *in vivo* Verfolgung dazu, die postulierte *de novo* Musterbildung durch Laser-Ablationen zu verifizieren.

V. Abstract

Arabidopsis thaliana trichome pattern formation represents an established model system to analyze plant pattern formation processes. Trichome development is governed by bHLH and MYB transcription factors as well as by a WD-40 protein. MYB transcription factors are represented by the trichome inhibitors TRY, CPC, ETC1, ETC2 and TCL1 and the activators GL1 and MYB23. *GL3*, *EGL3* and *TTG1* encode bHLH transcription factors and a WD-40 protein, respectively, and function as trichome activators as well.

This study is focussed on trichome inhibitors which regulate the regular distance pattern of trichomes – postulated as a *de novo* process – by lateral inhibition described within the activator-inhibitor model. In this study it is shown that one more trichome inhibitor gene, *ETC3*, is involved in the regulation of trichome pattern formation.

Analyses of trichome inhibitor protein mobility reveal new aspects of lateral inhibition. Using competition analyses, the inhibitors ETC1, ETC3, CPC and TRY are shown to be involved in the mechanism of lateral inhibition by displacing GL1 in the activator complex whereas ETC2 shows no competitor characteristics. Furthermore, it is shown that CPC and ETC3 have different signal ranges for lateral inhibition explained by their different binding affinity to GL3. Based on this observation, a theoretical model is proposed in that ETC2 has the longest signal range, followed by ETC3 and TRY. After this model, CPC and ETC1 merely have a short signal range. On the expression level, differences between the *CPC*-, *TRY*- and *ETC3*-promoters are demonstrated. Furthermore, the inhibitors CPC and TRY are analyzed for a possible post-translational phosphorylation to discover a potential regulation of their inhibitory activity and/or mobility.

A method was established to follow trichome pattern formation in rosette leaves *in vivo*, from emerging trichome initials to adult stages. From that a new possibility to quantitatively analyze pattern formation *in silico* arises. This method can also be used to verify trichome pattern formation as a *de novo* process using laser ablation of trichome initials.

VI. Publikationen

Kirik V, Simon M, Wester K, Schiefelbein J, Hülskamp M. (2004): ENHANCER of TRY and CPC 2 (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 55(3):389-98.

Kirik V, Lee MM, Wester K, Herrmann U, Zheng Z, Oppenheimer D, Schiefelbein J, Hülskamp M. (2005): Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development* 132(7):1477-85.

Bouyer D, Geier F, Kragler F, Schnittger A, Pesch M, Wester K, Balkunde R, Timmer J, Fleck C, Hülskamp M. (2008): Two-dimensional patterning by a trapping/depletion mechanism: the role of TTG1 and GL3 in Arabidopsis trichome formation. *PLoS Biol.* 6(6):e141.

Digiuni S, Schellmann S, Geier F, Greese B, Pesch M, Wester K, Dartan B, Mach V, Srinivas BP, Timmer J, Fleck C, Hülskamp M. (2008): A competitive complex formation mechanism underlies trichome patterning on Arabidopsis leaves. *Mol Syst Biol.* 4:217.

Bensch R, Ronneberger O, Greese B, Fleck C, Wester K, Hülskamp M, Burkhardt H. (2009): Image analysis of Arabidopsis pattern in 4D confocal datasets. (submitted)

Wester K, Digiuni S, Geier F, Timmer J, Fleck C and Hülskamp M. (2009): Functional diversity of R3 single repeat genes in trichome development. (in preparation)

1. Einleitung

Die Entstehung vielzelliger Lebewesen wirft immer wieder die Frage auf, wie die Komplexität der Körperstrukturen zustande kommt. Mehrzellige Eukaryoten entstehen aus einer einzelligen Zygote, die während ihrer Entwicklung zum adulten Lebewesen eine Vielfalt von Zelltypen ausbildet. Der Anordnung und Existenz unterschiedlicher Zelltypen liegen verschiedene biologische Prozesse zugrunde. Ein wichtiger Prozess bei der Entwicklung vielzelliger Lebewesen ist die Festlegung unterschiedlicher Zellschicksale zum richtigen Zeitpunkt an der richtigen Position. Denn nur durch die zeitliche und räumliche Festlegung von Zellschicksalen kann eine geordnete Körperstruktur gewährleistet werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Musterbildung.

Um Musterbildungsprozesse untersuchen zu können, bedient man sich in der Entwicklungsbiologie so genannter Modellorganismen, die für die genetischen und biochemischen Fragestellungen an die Entwicklung von Zellmustern geeigneten sind. Für die Untersuchung von Musterbildungsprozessen in Pflanzen hat sich die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) aus der Familie der Brassicaceae etabliert (Meyerowitz, 1989; Meyerowitz and Pruitt, 1985), auf die sich diese Arbeit konzentriert.

1.1 Epidermale Musterbildungsprozesse in *Arabidopsis thaliana*

Aus der epidermalen Zellschicht im Spross und der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* entwickeln sich nur wenige spezialisierte Zelltypen (Esau, 1965) wie Wurzelhaare, Stomata (Spaltöffnungen) und Trichome (Blatthaare) neben den normalen epidermalen Zellen. Die drei Zelltypen bilden stets ein geordnetes räumliches Zellmuster aus (s. Abb. 1.1), was deutlich macht, dass die Verteilung nach definierten Musterbildungsprozessen abläuft. Aufgrund dessen stellen Wurzelhaare, Stomata und Trichome mittlerweile etablierte Modellsysteme zur Analyse epidermaler Musterbildungsprozesse dar (Bünning, 1951; Larkin *et al.*, 1997; Marks *et al.*, 1991; Hülskamp and Schnittger, 1998; Hülskamp *et al.*, 1999).

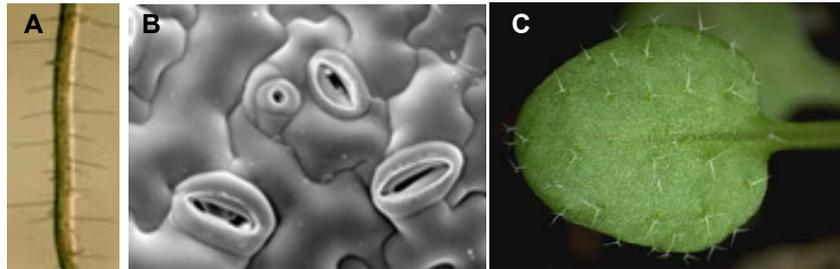


Abb. 1.1: Epidermale Modellsysteme für Musterbildungsprozesse in *Arabidopsis thaliana*. (A) Wurzelhaar-Muster, übernommen von Wada *et al.* (2002). (B) Stomata-Muster im Rosettenblatt, übernommen von Fred Sack, Homepage. (C) Trichom-Muster auf Rosettenblatt.

Stomata (Spaltöffnungen) regulieren den Gasaustausch der Pflanze mit der umgebenden Luft. Sie bestehen aus einem Spaltöffnungsapparat, der sich aus zwei Schließzellen und einem Porus zusammensetzt. Die Schließzellen haften an den Enden aneinander, zwischen ihnen befindet sich der Interzellularspalt (Porus), über den der Gasaustausch stattfindet. Stomata entwickeln sich in epidermalen Schichten aller oberirdischen Organe, am häufigsten in Blättern (Schroeder *et al.*, 2001; Raven, 2002). Wurzelhaare dienen der Oberflächenvergrößerung und damit der effektiven Aufnahme von Nährstoffen und Wasser aus dem Boden, sowie der Befestigung der Pflanze im Boden. Die Haare bestehen aus einzelnen Zellen, die sich in der Wurzel in der Wurzelhaarzone aus Epidermiszellen (Rhizodermiszellen) ausbilden (Dolan *et al.*, 1994).

Trichome in *Arabidopsis* sind ebenfalls einzellig, sie dienen dem Schutz der Pflanze. Durch ihre borstenähnliche Struktur schützen sie die Pflanze vor Tierfraß, Sonnenlicht kann reflektiert werden, die Blatttemperatur verringert und die Transpiration herabgesetzt werden (Maurico and Rausher, 1997; Agrawal, 2002; Agrawal, 2004). Trichomzellen entwickeln sich aus epidermalen Zellen auf Rosettenblättern, Hochblättern, Sepalen und auf dem Spross (Hülkamp *et al.*, 1994).

1.2 Zelluläre Betrachtung von Musterbildungsprozessen

Die Musterbildungsprozesse von Stomata, Wurzelhaaren und Trichomen führen zur Ausbildung räumlicher Zellmuster, die auf zellulärer Ebene unterschiedlich generiert werden, durch Zellabstammung und/oder durch Zell-Zell Kommunikation (Sachs, 1978; Wolpert and Stein, 1984; Larkin *et al.*, 1996).

A) Zellabstammung

Die Zellabstammung beruht auf asymmetrischer Zellteilung, wodurch sich die cytoplasmatischen Faktoren ungleich auf die Tochterzellen verteilen und diese sich zu unterschiedlich Zelltypen entwickeln. Das Zellschicksal ist daher allein von der Abstammung der Zellen und nicht von der Umgebung abhängig (Larkin *et al.*, 1997).

Die Bildung des Spaltöffnungsapparates der Stomata geht aus asymmetrischen Zellteilungen hervor. (Yang and Sack, 1995; Larkin *et al.*, 1997; Nadeau and Sack, 2002).

B) Zell-Zell Kommunikation

Bei der Zell-Zell Kommunikation wird das Zellschicksal der beteiligten Zellen durch Signale aus der Umgebung festgelegt. Die Zellen aus einer Gruppe besitzen für diesen Musterbildungsprozess das gleiche Entwicklungspotential, d.h. sie haben alle das Potential, ein bestimmtes Zellschicksal anzunehmen. Bei der Zell-Zell Kommunikation kann die Determinierung von Zellen positionsabhängig oder *de novo* etabliert werden. Beide Szenarien führen zur Ausbildung eines räumlich geordneten Zellmusters durch laterale Inhibition, wobei determinierte Zellen die Nachbarzellen an der Entwicklung zum gleichen Zellschicksal hindern (Larkin *et al.*, 2003; Pesch and Hülskamp, 2004; Meinhardt and Gierer, 1974; Meinhardt and Gierer, 2000).

Bei der positionsabhängigen Zelldeterminierung wird durch Signale aus bereits differenzierten Zellschichten ein bestimmtes Zellschicksal gefördert, was zur Expression inhibitorischer Signale führt. Durch laterale Inhibition werden die Nachbarzellen an der Determinierung zum gleichen Zellschicksal gehindert (Dolan *et al.*, 1994; Galway *et al.*, 1994).

Bei der Wurzelhaarentwicklung entscheidet die Position der Epidermiszellen über das Zellschicksal zu Wurzelhaarzellen bzw. Nicht-Wurzelhaarzellen. Durch die

positionsabhängige Determinierung entwickeln sich alternierende Zellreihen von Wurzelhaarzellen (Trichoblasten, H-Zellreihen) und Nicht-Wurzelhaarzellen (Atrichoblasten, N-Zellreihen) in longitudinaler Richtung. Die Wurzelhaar-Zellreihen entwickeln sich dabei über den antiklinen Zellwänden der darunter liegenden kortikalen Zellen, wohingegen die Nicht-Wurzelhaar-Zellreihen direkt über den kortikalen Zellen liegen. (Galway *et al.*, 1994; Masucci *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1998; Dolan, 2006).

Bei der *de novo* Zelldeterminierung spielen keine Signale aus anderen Zellschichten eine Rolle. Zellen mit gleichem Entwicklungspotential entwickeln ein räumliches Muster von spezialisierten Zellen, wobei die räumliche Distanz der determinierten Zellen allein durch laterale Inhibition erzeugt wird.

Die Trichom-Musterbildung wird als ein *de novo* Musterbildungsprozess postuliert (Larkin *et al.*, 1996; Schnittger *et al.*, 1999; Schellmann *et al.*, 2002). Für die Entwicklung von Trichomzellen auf Rosettenblättern sind keine positionsabhängigen Signale aus dem darunter liegenden Mesophyll bekannt. Ebenso kann Zellabstammung der Trichomzellen ausgeschlossen werden (Larkin *et al.*, 1996). In jungen Rosettenblättern wird im basalen Blattbereich, in der Trichom-Initiationszone, das Zellschicksal für Trichomzellen festgelegt, wobei stets ein Abstand von drei bis vier Zellen zwischen den Trichomzellen eingehalten wird (Hülkamp *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 1994). Aufgrund der definierten Abstände wird eine zufällige Verteilung der Trichomzellen ausgeschlossen, da bei einer stochastischen Verteilung mehr Trichom-Nester (aneinander grenzende Trichomzellen) zu erwarten wären (Larkin *et al.*, 1996). Bei der Etablierung der Zell-Abstände durch laterale Inhibition unterdrücken die determinierten Trichomzellen die Nachbarzellen, sich ebenfalls zu Trichomzellen zu entwickeln.

Um *de novo* Musterbildung erklären zu können, bedient man sich theoretischer Modelle. Das Aktivator-Inhibitor Modell (Meinhardt and Gierer, 1974; Meinhardt and Gierer, 2000) erklärt die Entwicklung von Zellmustern durch Lateralinhibition (s. unten), weshalb es für die Trichom-Musterbildung eingesetzt wird.

Da sich diese Arbeit auf die Trichom-Musterbildung konzentriert, wird auf die Trichom-Entwicklung und das Modell für die Trichom-Musterbildung detaillierter eingegangen.

1.3 Aktivator-Inhibitor Modell

Das Aktivator-Inhibitor Modell (Meinhardt and Gierer, 1974; Meinhardt and Gierer, 2000) erklärt die Entstehung zwei-dimensionaler Zell-Muster durch Zell-Zell Kommunikation, wobei alle epidermalen Zellen anfangs das gleiche Entwicklungspotential für ein bestimmtes Zellschicksal besitzen. Das Modell setzt für die Entstehung eines räumlichen Musters einen Aktivator und einen Inhibitor voraus (s. Abb. 1.2 A). Der Aktivator fördert ein spezifisches Zellschicksal, wohingegen der Inhibitor dieses reprimiert. Der Aktivator muss die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu verstärken (positive Rückkopplung) und muss in der Lage sein, den Inhibitor zu aktivieren. Der Inhibitor seinerseits muss schneller und über eine längere Distanz als der Aktivator wirken und die Fähigkeit besitzen, den Aktivator zu reprimieren.

Durch stochastische lokale Fluktuationen der Aktivator-Konzentration kann bereits durch geringe Erhöhung der Aktivator-Konzentration in einer Zelle diese Expression durch positive Rückkopplung im Vergleich zu den Nachbarzellen stark erhöht werden. Bei Erreichen einer bestimmten Schwellenwert-Konzentration sind diese Zellen dazu ausselektiert, ein spezifisches Zellschicksal anzunehmen. Die erhöhte Aktivator-Konzentration führt in den selektierten Zellen ebenfalls zu einem Anstieg des Inhibitor-Levels. Der Inhibitor breitet sich in die Nachbarzellen aus, wo er den Aktivator reprimiert. Dadurch können diese Zellen das spezifische Zellschicksal nicht annehmen (laterale Inhibition).

Wendet man dieses Modell auf die Trichom-Musterbildung an, zeigt die *in silico* Darstellung der Verteilung lokaler Aktivator-Maxima auf einer Fläche ein Muster auf, das die räumliche Verteilung von Trichomzellen auf einem Blatt widerspiegelt (s. Abb. 1.2 B).

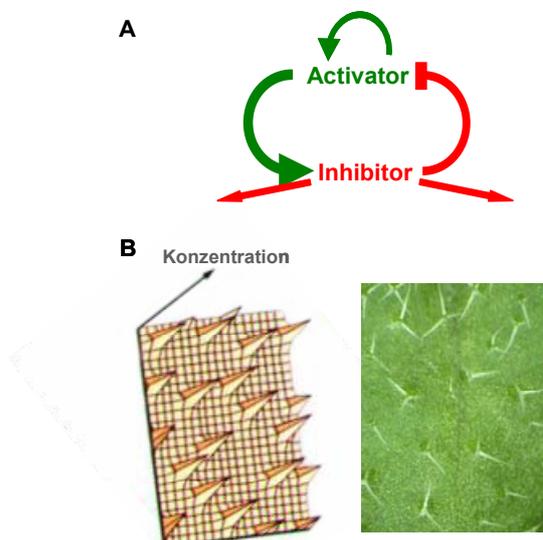


Abb. 1.2: Aktivator-Inhibitor Modell. (A) Modell von Meinhardt & Gierer. Grüne Pfeile markieren Aktivierung, rote Balken markieren Inhibition. Rote Pfeile stehen für laterale Inhibition. (B) Vergleich der Verteilung von Aktivator-Maxima (links) und Trichom-Verteilung (rechts) auf einem Rosettenblatt. Aktivator-Maxima ergeben sich nach dem Aktivator-Inhibitor Modell von Meinhardt & Gierer.

1.4 Interzelluläre Wanderung von Proteinen

Für die Zell-Zell Kommunikation, wie z.B. bei der lateralen Inhibition, müssen Signale von Zelle zu Zelle wandern. Die interzelluläre Wanderung von Proteinen bzw. RNA erfolgt durch Plasmodesmata, Mikro-Kanäle, die benachbarte Zellen symplastisch miteinander verbinden (Waigmann *et al.*, 1994a; Lucas *et al.*, 1995; Perbal *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Zambryski, 2004). Der Austausch von Signalstoffen durch die Plasmodesmata wird durch die Öffnungsweite der Kanäle stark reguliert. Bei der Zell-Zell Wanderung von Proteinen durch die Plasmodesmata (Crawford and Zambryski, 2000; Haywood *et al.*, 2002) unterscheidet man zwei Arten der Wanderung. Einerseits können Proteine, die eine geringere Größe als die Plasmodesmata Porengröße besitzen, passiv durch die Plasmodesmata wandern (Crawford and Zambryski, 2000; Crawford and Zambryski, 2001). Zum anderen gibt es Proteine, die aktiv wandern. Bei der aktiven Wanderung können Proteine die Porengröße der Plasmodesmata anheben, wodurch auch größere Proteine interzellulär wandern (Lucas *et al.*, 1995; Crawford and Zambryski, 2000; Imlau *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003). Die aktive Wanderung wurde z.B. für virale "Movement"-Proteine in Pflanzen (Waigmann *et al.*, 1994b) oder auch für endogene Proteine in *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Lucas *et al.*, 1995; Kragler *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Die Öffnungsweite der Poren variiert in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien (Crawford and Zambryski, 2001; Wu *et al.*, 2003). In jungen Entwicklungsstadien sind die Plasmodesmata weiter geöffnet, und in älteren Entwicklungsstadien wird die Öffnungsweite verkleinert (Crawford and Zambryski, 2001).

1.5 Trichom-Entwicklung

Die Trichom-Entwicklung auf Rosettenblättern ist mit der Blattentwicklung gekoppelt. Sie beginnt an der Blattspitze junger Blattprimordien und setzt sich basipetal fort (Hülkamp *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 1996).

In der Trichom-Initiationszone im basalen Blattbereich wird ein definierter Abstand zwischen den sich entwickelnden Trichomzellen eingehalten, sie liegen zwei bis vier Zellen voneinander entfernt (Hülkamp *et al.*, 1994). Diese regelmäßige Verteilung zeichnet die Musterbildung aus. Während der fortlaufenden Blattentwicklung bleibt die

Trichomzell-Initiation auf einen schmalen Bereich an der Blattbasis beschränkt. Der Abstand adulter Trichome zueinander wird durch weitere mitotische Zellteilungen der epidermalen Zellen, die zwischen den Trichomzellen liegen, erreicht. Die epidermalen Zellen, die im direkten Kontakt mit den sich entwickelnden Trichomzellen stehen, differenzieren sich zu akzessorischen Zellen (Hülskamp and Schnittger, 1998).

Die Differenzierung einer Trichomzelle (s. Abb. 1.3) äußert sich zu Beginn der Entwicklung durch eine Vergrößerung des Zellkerns und eine zunehmende Zellgröße (Hülskamp *et al.*, 1994). Während die epidermalen Zellen weitere mitotische Zellteilungen durchlaufen, findet in den Trichomzellen ein Umschalten von mitotischer Zellteilung zu Endoreduplikation statt. Die wachsende Trichomzelle stülpt sich höckerförmig aus der Zelloberfläche aus und leitet auf Rosettenblättern im Wildtyp zwei Verzweigungen ein (Hülskamp *et al.*, 1994; Marks *et al.*, 1991). Adulte Trichome haben insgesamt vier Endoreduplikations-Zyklen durchlaufen, wodurch ihr DNA-Gehalt von 2C auf 32C ansteigt (Hülskamp *et al.*, 1994).

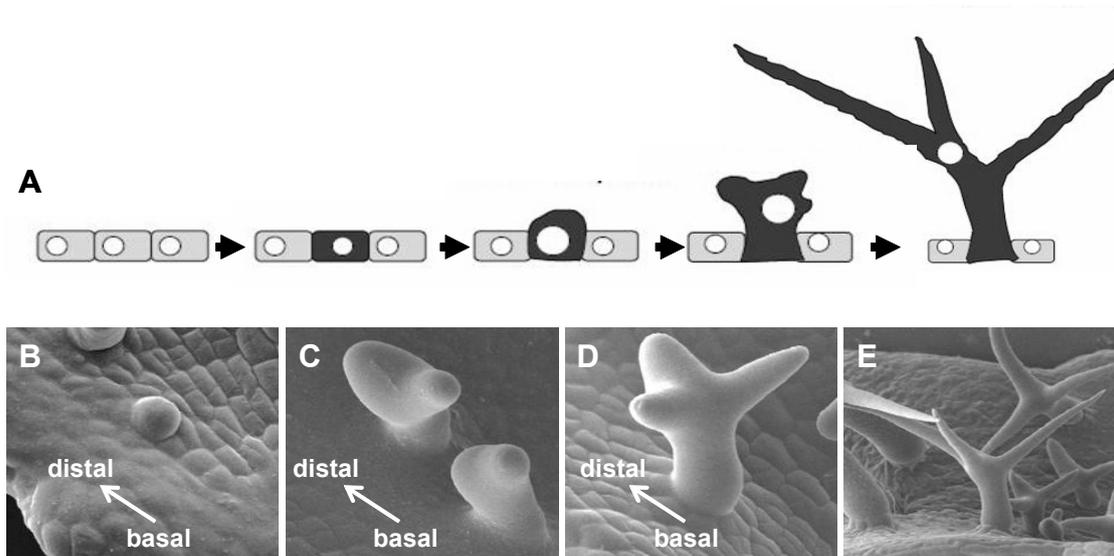


Abb. 1.3: Trichom-Entwicklung auf Rosettenblättern in *Arabidopsis*. (A) Schematische Darstellung der Trichom-Entwicklung. Aus einem Zellverband (links) entwickelt sich eine Trichomzelle (blau markiert). Die Differenzierung der Trichomzelle äußert sich zu Beginn in einer Zellkern-Vergrößerung. Anschließend stülpt sich die Zelle aus und leitet zwei Verzweigungen ein. Übernommen von Schellmann and Hülskamp (2005). (B-E) Raster-elektronenmikroskop-Aufnahmen von verschiedenen Trichomzell-Entwicklungsstadien. Übernommen von Schwab *et al.* (2000). (B) Junge Trichomzelle stülpt sich aus der epidermalen Schicht. (C) Trichomzelle leitet erste Verzweigung ein. (D) Trichomzelle leitet zweite Verzweigung ein. (E) Adultes Trichom.

1.6 Genetische Betrachtung der Trichom-Entwicklung

Die Determinierung von Trichomzellen in der Epidermis wird durch Trichom-Regulatorgene gesteuert, die anhand ihrer mutanten Phänotypen in zwei Klassen eingeteilt werden. Eine Klasse von Genen, die das Trichom-Schicksal fördern, wird als Trichom-Aktivatoren bezeichnet. Die entsprechenden Mutanten besitzen weniger bzw. keine Trichome. Die andere Klasse von Genen, die das Trichom-Schicksal unterdrücken, wird als Trichom-Inhibitoren bezeichnet, bei denen die entsprechenden Mutanten mehr Trichome entwickeln bzw. Nester von Trichomen aufweisen (Schellmann and Hülskamp, 2005). Trichomzellen, die direkt aneinander grenzen, werden als Trichom-Nest bezeichnet. Bei allen bekannten Trichom-Regulatorgenen außer *TTG1* handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, und bei den Mutanten handelt es sich um Funktionsverlustmutanten.

A) Trichom-Aktivatoren

Als Trichom-Aktivatoren sind die Gene *GLABRA1* (*GL1*), *GLABRA2* (*GL2*), *GLABRA3* (*GL3*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA2* (*TTG2*), *MYB23* und *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) charakterisiert.

GL1 (Oppenheimer *et al.*, 1991) kodiert für einen R2R3 MYB-Transkriptionsfaktor. In *gl1* mutanten Pflanzen entwickeln sich keine Trichome auf Rosettenblättern. Lediglich in älteren Rosettenblättern werden am Blattrand einzelne Trichome gebildet. (Esch *et al.* 1994; Larkin *et al.*, 1994) (s. Abb. 1.4 A). Das Gen *MYB23* (Kirik *et al.*, 2001; Kirik *et al.*, 2005) wurde als redundantes Gen zu *GL1* charakterisiert. Die *myb23* Einzelmutante zeigt mehr unterverzweigte Trichome, die Trichom-Dichte ist jedoch gleich hoch wie im Wildtyp. Die Doppelmutante *gl1 myb23* (Kirik *et al.*, 2005) zeigt hingegen einen synergistischen Effekt, die Pflanzen entwickeln hier auch keine Rand-Trichome mehr (s. Abb. 1.4 A). *GL3* (Payne *et al.*, 2000) und *EGL3* (Zhang *et al.*, 2003) kodieren für basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. In der *gl3* Mutante (Hülskamp *et al.*, 1994) entwickeln sich nur wenige Trichome, die häufig unterverzweigt sind (s. Abb. 1.4 A). Die *egl3* Mutante zeigt keinen Trichom-Phänotyp, jedoch werden in der *gl3 egl3* Doppelmutante (Zhang *et al.*, 2003) keine Trichome mehr gebildet (s. Abb. 1.4 A), weshalb *EGL3* eine redundante Funktion zu *GL3* in der Trichom-Entwicklung zugesprochen wird. *TTG1* (Koorneef, 1981; Galway *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1999) ist ein WD-40 Protein. Es wird angenommen, dass die WD-40 Domäne Protein-Protein

Interaktionen vermittelt bzw. stabilisiert (Walker *et al.*, 1999; Larkin *et al.*, 2003). Starke *ttg1* Allele entwickeln (s. Abb. 1.4 A) wie *gl1* Mutanten keine Trichome mehr auf allen Organen (Larkin *et al.*, 1994). Schwächere *ttg1* Mutanten (Larkin *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 1999; Schnittger *et al.*, 1999) entwickeln hingegen Nester von Trichomen, weshalb *TTG1* auch eine Rolle als Trichom-Inhibitor zugesprochen wird (Bouyer *et al.*, 2008). *GL2* kodiert für einen Homöobox-Transkriptionsfaktor der HD-Zip IV Klasse (Koornneef *et al.*, 1982; Rerie *et al.*, 1994; Masucci *et al.*, 1996) und *TTG2* kodiert für ein WRKY Transkriptionsfaktor (Johnson *et al.*, 2002). In *gl2* Mutanten (s. Abb. 1.4 A) kommt die Trichom-Entwicklung während der Ausstülpung der Trichomzellen zum Erliegen (Hülkamp *et al.*, 1994). *ttg2* Mutanten entwickeln weniger unterverzweigte Trichome (Johnson *et al.*, 2002). *GL2* und *TTG2* sind den Trichom-Aktivatorgenen *GL1*, *GL3* und *TTG1* untergeordnet und sind für die Trichom-Differenzierung verantwortlich (Hülkamp *et al.*, 1994; Di Christina *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2002; Morohashi *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2007).

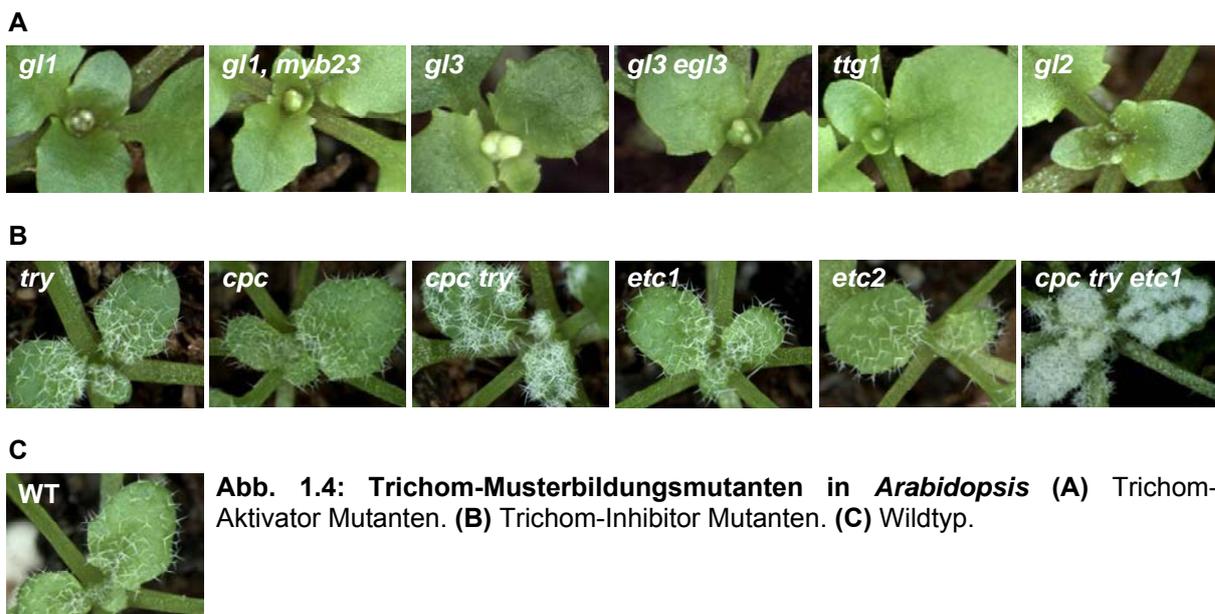
B) Trichom-Inhibitoren

Als Trichom-Inhibitoren sind die Gene *CAPRICE* (*CPC*) (Wada *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 2002), *TRIPTYCHON* (*TRY*) (Schnittger *et al.*, 1999; Schellmann *et al.*, 2002), *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1* (*ETC1*) (Kirik *et al.*, 2004a), *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE2* (*ETC2*) (Kirik *et al.*, 2004b) und *TRICHOMELESS1* (*TCL1*) (Wang *et al.*, 2007) charakterisiert. Das Gen *CAPRICE LIKE MYB3* (Tominaga *et al.*, 2008) wurde zum Ende dieser Doktorarbeit als Trichom-Inhibitor charakterisiert. Da die Charakterisierung dieses Gens auch Bestandteil dieser Arbeit ist, werden die Ergebnisse der Publikationen mit den Ergebnissen dieser Arbeit in der Diskussion verglichen.

Alle sechs Gene kodieren für R3 MYB Transkriptionsfaktoren, denen die transkriptionale Aktivierungsdomäne fehlt.

Die Trichom-Inhibitor Mutanten zeigen Defekte in der Trichom-Verteilung und/oder Trichom-Dichte. In der *try* Mutante (s. Abb. 1.4 B) entwickeln sich Nester von Trichomen (Schnittger *et al.*, 1999), die aus bis zu vier Trichomen bestehen, die Trichome sind häufig überverzweigt. In *cpc* (s. Abb. 1.4 B) ist die Trichom-Dichte im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Schellmann *et al.*, 2002). *ETC1*, *ETC2* und *TCL1* wurden durch ihre starke Homologie zu *CPC* und *TRY* identifiziert. In *etc1* (s. Abb. 1.4 B) wurde kein

auffälliger Trichom-Phänotyp charakterisiert (Kirik *et al.*, 2004a). In *etc2* (s. Abb. 1.4 B) ist die Trichom-Dichte erhöht (Kirik *et al.*, 2004b). Die *tc1* Mutante zeigt ektopische Trichome auf dem Spross der Infloreszenz und auf den Pediceln (Wang *et al.*, 2007). Durch Etablierung von Doppel-, Tripel- und Quadrupelmutanten konnten redundante Funktionen innerhalb der Trichom-Inhibitoren gezeigt werden. So zeigt die *cpc try* Doppelmutante (s. Abb. 1.4 B) sowohl eine erhöhte Trichom-Dichte als auch größere Trichom-Nester (Schellmann *et al.*, 2002). In den Tripelmutanten *cpc try etc1* (s. Abb. 1.4 B) und *cpc try etc2*, wie in der Quadrupelmutante *cpc try etc1 etc2* (von Daniel Bouyer hergestellt, nicht publiziert) zeigt sich die redundante Funktion von ETC1 und ETC2 zu CPC und TRY. Die Trichom-Dichte wie auch die Größe der Trichom-Nester ist verglichen mit *cpc try* stark erhöht, was von den Tripelmutanten zur Quadrupelmutante weiter zunimmt.



1.7 Funktion der Trichom-Regulatorgene in der Wurzel

Die oben aufgeführten Trichom-Aktivatoren und -Inhibitoren regulieren neben der Trichom-Musterbildung auch die Entwicklung und Musterbildung der Wurzelhaare. In der Wurzel haben die Musterbildungsgene jedoch im Vergleich zum Spross eine umgekehrte Funktion. Die Trichom-Aktivatorgene inhibieren in der Wurzel das Wurzelhaar-Zellschicksal, die Trichom-Inhibitoren fördern es. Ein genetischer

Unterschied zwischen der Trichom- und Wurzelhaar-Entwicklung ist, dass der Trichom-Aktivator *GL1* in der Wurzel durch das homologe Gen *WERWOLF* ersetzt wird (Lee and Schiefelbein, 2001).

1.8 Modell für die Trichom-Musterbildung

Für das oben beschriebene Aktivator-Inhibitor Modell reicht ein Aktivator und ein Inhibitor für die Etablierung eines zwei-dimensionalen Zellmusters aus. Bei der Trichom-Musterbildung sind jedoch mehrere Aktivatoren und Inhibitoren notwendig. Protein-Protein Interaktionsanalysen zeigen, dass GL3 mit allen MYB Transkriptionsfaktoren interagiert, was alle Inhibitoren und GL1/MYB23 einschließt, und dass GL3 mit TTG1 interagiert (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Esch *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004; Kirik *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2008). Weiterhin zeigen Drei-Hybrid Wettbewerbsanalysen, dass die Inhibitoren TRY und CPC mit GL1 um die Bindung an GL3 kompetieren (Esch *et al.*, 2003).

Für die Trichom-Musterbildung wird anhand der charakterisierten Trichom-Regulatorgene ein Modell postuliert, das auf dem Aktivator-Inhibitor Modell von Meinhardt und Gierer (1974) und dem Trapping/Depletion Modell von Bouyer *et al.* (2008) basiert. Das Trapping/Depletion Modell stellt dabei eine mögliche Erweiterung des Aktivator-Inhibitor Modells zur Trichom-Musterbildung dar.

Bei dem Trapping/Depletion Modell wird TTG1, das ubiquitär in allen epidermalen Zellen exprimiert wird, durch seine starke Bindungsaffinität zu GL3 in den Zellkern von Trichom-Initiationszellen gezogen. Durch die Verarmung an TTG1 in den Nachbarzellen wird das Trichom-Schicksal in den Trichom-Initiationszellen gefördert und durch Prozesse, die mit dem Aktivator-Inhibitor Modell beschrieben werden, stabilisiert. Zu welchem Zeitpunkt Prozesse, die mit dem Trapping/Depletion Modell in der Trichom-Musterbildung formuliert werden, ablaufen, also vor, während oder nach Prozessen, die mit dem Aktivator-Inhibitor Modell erklärt werden, ist bislang nicht geklärt.

Mit dem Aktivator-Inhibitor Modell (s. Abb. 1.5) wird die Trichom-Musterbildung wie folgt postuliert. In Trichom-Initialzellen kommt es zur Bildung eines trimeren Protein-Komplexes, bestehend aus TTG1, GL3/EGL3 und GL1 (Zhao *et al.*, 2008). Dieser Aktivator-Komplex fördert die Expression von *TTG2* und *GL2*, wodurch die Trichom-

Entwicklung eingeleitet wird (Payne *et al.*, 2000; Schiefelbein, 2003; Pesch and Hülkamp, 2004; Morohashi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). Durch den Aktivator-Komplex wird ebenfalls die Expression der Inhibitoren in den Trichom-Initialzellen aktiviert (Wang *et al.*, 2008; Morohashi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). Die Inhibitoren wandern in die Nachbarzellen, wo sie entweder GL1 direkt reprimieren, wie es für den Trichom-Inhibitor TCL1 gezeigt wurde (Wang *et al.*, 2007), oder aber die Inhibitoren binden an den Komplex, indem sie GL1 aus dem Komplex verdrängen (laterale Inhibition) (Esch *et al.*, 2003). Wird der inhibitorische Komplex gebildet, bestehend aus Inhibitor, GL3 und TTG1, kann GL2 nicht exprimiert werden, wodurch das Trichom-Schicksal in den Nachbarzellen unterdrückt wird und diese Zellen sich zu epidermalen Zellen entwickeln.

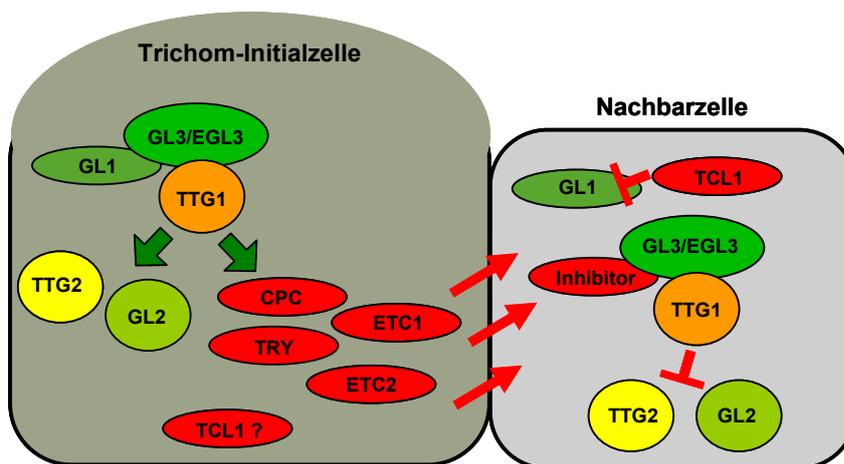


Abb. 1.5: Modell für die Trichom-Musterbildung. In der Trichom-Initialzelle ist der trimere Trichom-Aktivator Komplex formiert. Der Komplex aktiviert GL2, TTTG2. Gleichzeitig aktiviert der Komplex die Inhibitoren, die die Nachbarzellen durch laterale Inhibition hindern, das Trichom-Schicksal anzunehmen. Die Inhibitoren verdrängen GL1 aus dem Komplex und/oder reprimieren GL1 direkt. Grüne Pfeile markieren Aktivierung, rote Pfeile stehen für laterale Inhibition, rote Balken zeigen Reprimierung.

1.9 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit konzentriert sich auf fünf offene Fragen in der Trichom-Musterbildung.

1) Zum einen sollte untersucht werden, ob es neben den bekannten Trichom-Regulatorgenen noch weitere Gene gibt, die für die Trichom-Musterbildung verantwortlich sind. Die *cpc try etc1* und *cpc try etc2* Tripelmutanten sowie die *cpc try etc1 etc2* Quadrupelmutante zeigen eine drastische Erhöhung der Trichom-Dichte, was durch eine nicht mehr stattfindende laterale Inhibition erklärt werden kann. Jedoch

besitzen alle Mehrfachmutanten immer noch epidermale Zellen, die sich nicht zu Trichomzellen entwickeln, was zeigt, dass immer noch laterale Inhibition stattfindet. Auf dieser Tatsache basierend sollte ein weiteres Gen charakterisiert werden, das die Funktion eines Trichom-Inhibitors besitzt.

2) Das Vorhandensein von fünf Trichom-Inhibitoren (*CPC*, *TRY*, *ETC1*, *ETC2* und *TCL1*) und die Annahme, dass eventuell noch ein weiterer Trichom-Inhibitor existiert, brachte die Frage auf, ob die Trichom-Inhibitoren redundante oder partiell unterschiedliche Funktionen haben. Es sollten eventuelle Unterschiede herausgearbeitet werden.

3) Die Trichom-Inhibitoren werden in Trichom-Initialzellen exprimiert und wandern in die Nachbarzellen, wo sie die Zellen an der Entwicklung zu Trichomzellen unterdrücken. Es wurde bislang noch nicht geklärt, warum die Aktivität der Inhibitoren erst in den Nachbarzellen einsetzt und in den Zellen, in denen sie exprimiert werden, keinen Einfluss nimmt. Durch Mutagenesen der Inhibitoren sollte untersucht werden, ob eventuelle posttranslationale Modifikationen die Aktivität bzw. Mobilität der Inhibitoren regulieren.

4) Die Trichom-Musterbildung in *Arabidopsis thaliana* ist ein etabliertes Modellsystem für die Untersuchung von Musterbildungsprozessen. Analysen, die es ermöglichen, die Trichom-Musterbildung *in silico* zu rekonstruieren, fehlen bis jetzt. Es sollte versucht werden, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, die Trichom-Musterbildung auf einem Blatt *in vivo* zu verfolgen, um die Bilddaten quantitativ *in silico* bearbeiten zu können.

5) Die Trichom-Musterbildung wird als *de novo* Musterbildung erklärt. Durch Ablationen von Trichom-Initialzellen sollte versucht werden, eine *de novo* Musterbildung *in vivo* zu verfolgen.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung von *ETC3* als Trichom-Regulatorgen

Als Trichom-Inhibitoren sind die Gene *CAPRICE* (*CPC*), *TRIPTYCHON* (*TRY*), *TRICHOMELESS1* (*TCL1*) und *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1* und *2* (*ETC1* und *ETC2*) charakterisiert, die durch laterale Inhibition die Trichom-Dichte und Trichom-Verteilung auf Rosettenblättern regulieren (Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2007).

In Mehrfachmutanten der Trichom-Inhibitoren kommt die laterale Inhibition mehr und mehr zum Erliegen, wodurch z.B. die Tripel- und Quadrupelmutanten *cpc try etc1*, *cpc try etc2* (Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b) und *cpc try etc1 etc2* (von Daniel Bouyer hergestellt, nicht publiziert) eine drastisch erhöhte Trichom-Dichte und Größe der Trichom-Nester aufweisen. Jedoch findet in allen Mehrfachmutanten noch laterale Inhibition statt, da sich auf den Rosettenblättern nicht alle epidermalen Zellen zu Trichomzellen entwickeln. Danach müssen noch weitere Trichom-Inhibitoren zur Bildung des Trichom-Musters existieren. Basierend auf dieser Vermutung wurde nach einem weiteren inhibitorischen Trichom-Regulator gesucht.

Das Gen AT4G01060 wurde mit Hilfe der BLAST Suchmaschine von NCBI als homologes Gen zu *CPC*, *TRY*, *ETC1* und *ETC2* identifiziert. Das Gen wurde daher *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE3* (*ETC3*) benannt. Es handelt sich, wie auch bei allen anderen bekannten inhibitorischen Trichom-Regulatorgenen um einen MYB-Transkriptionsfaktor, dem die transkriptionelle Aktivierungsdomäne fehlt. Die putative Funktion von *ETC3* als Trichom-Inhibitor wurde mittels der entsprechenden Mutante und Klonierung des Gens in genetischen und biochemischen Ansätzen näher untersucht.

Die *tcl1* Mutante (Wang *et al.*, 2007) war zum Zeitpunkt der Charakterisierung von *ETC3* noch nicht bekannt und konnte daher in die Analysen nicht mit einbezogen werden. Am Ende der hier vorgestellten Experimente wurde *ETC3* von Simon *et al.* (2007) in der Wurzelhaarentwicklung vorgestellt und Wang *et al.* (2008) und Tominaga *et al.* (2008) publizierten das Gen als Trichom-Inhibitor. Die Ergebnisse aus den

Publikationen werden in der Diskussion den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt.

2.1.1 Molekulare Analyse von ETC3

A) Protein-Sequenzvergleich der Trichom-Inhibitoren

Der Proteinvergleich von ETC3 mit ETC1, ETC2, CPC und TRY (s. Abb. 2.1.1) zeigte, dass alle Proteine zu 28,5% identisch zueinander sind. ETC3 besitzt zu CPC 50% und zu TRY 38% Identität. Das ETC3 Protein ist mit 75 Aminosäuren im Vergleich zu den anderen vier Trichom-Regulatorproteinen das kleinste Protein (s. Abb. 2.1.1). Der Protein-Sequenzvergleich wurde mit der Vektor NTI Software (Invitrogen) angefertigt.

	10	20	30	40	50	60	
ETC1	---MNTQRKSKHL---	KTNPTIVASS	SEEVSS	LEWEEIAMAQE	EEDLICRM	YKLVGER	WDLIA
ETC3	---MDNHRRTKQP---	KIN-SIVTSS	SEEVSS	LEWEVVNMSQE	EEDLVSRM	HKLVGDR	WELIA
CPC	MFRSDKAEKMDKRR---	RRQSKAKASC	SEEVSS	IWEAVKMSEE	EEDLISR	MYKLVGDR	WELIA
TRY	---MDNIDRRRRRK---	QHKIA--LHD	SEEVSS	IWEFINMTEQ	EEDLIFR	MYRVLGDR	WDLIA
ETC2	---MDNTNRLRLRRG	PSLRQTKFTR	SEEVSS	IWEFISMTEQ	EEDLISR	MYRVLGNR	VDLIA
	70	80	90	100	110		
ETC1	GRIPGR	TAEIER	FWMK	-----	NHRRSQLR	-----	
ETC3	GRIPGR	TAGEIER	FWMK	-----	N-----	-----	
CPC	GRIPGR	TPEIER	YWLK	HGVVFANRRR	DFFRK	-----	
TRY	GRVPGR	QPEIER	YWIM	RNSEGFADKRR	QLHSSSHKHT	KPHRPRFSI	YPS
ETC2	GRVVGR	KANEIER	YWIM	RNSDYFSHKRRRL	NNSPFFST	SPLNLQENL	KL-

Abb. 2.1.1: Protein-Sequenzvergleich mit ETC3. Links, die Namen der analysierten Proteine. In orange sind die identischen Aminosäure-Bereiche innerhalb der Proteine markiert.

B) Analyse der *etc3* Mutante (Salk_094027)

Die genomische *ETC3* DNA ist 434bp lang und besteht aus drei Exons und zwei Introns (s. Abb. 2.1.2 A). Für das *ETC3* Gen war die Salk Linie 094027 von NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) mit einer annotierten T-DNA Insertion im zweiten Intron verfügbar. Die Salk Linie wurde auf die *etc3* Mutation mittels RT-PCRs überprüft, wobei Columbia Wildtyp cDNA als Kontrolle diente. Die cDNA wurde aus zwei Wochen alten Keimlingen hergestellt. Es wurden drei verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt. Mit der ersten RT-PCR wurde die Expression der *ETC3* cDNA Volllänge von 225bp mit den genspezifischen Primern ETC3-forw. und ETC3-rev. getestet. Die Hybridisierungsstellen des Primerpaars sind in Abb. 2.1.2 A mit lila Balken (*ETC3*) gekennzeichnet.

Da die T-DNA im zweiten Intron von *ETC3* inseriert sein soll (s. Abb. 2.1.2 A), wurde mit einer zweiten PCR analysiert, ob ein verkürztes *ETC3* Fragment vor der T-DNA Insertion exprimiert werden kann. Hierfür wurden die Primer ETC3-1.-Exon-forw. und ETC3-2.-Exon-rev. eingesetzt, die spezifisch für die Amplifikation der ersten beiden Exons von *ETC3* sind. Die Hybridisierungsstellen des Primerpaars sind in Abb. 2.1.2 A mit blauen Balken (ETC3.1/2) gekennzeichnet.

Die dritte PCR diente als Expressionskontrolle. Hierfür wurde die Aktin-Expression mit den spezifischen Primern Aktin-forw. und Aktin-rev. analysiert. Mit cDNA der Salk Linie konnte weder nach 25 noch nach 40 Zyklen ein Amplifikat für die volle *ETC3* cDNA Länge von 225bp amplifiziert werden (s. Abb. 2.1.2 B). Ebenso konnte das 5' cDNA Fragment, das die ersten beiden Exons von 115bp beinhaltet, nicht amplifiziert werden. Mit der Wildtyp cDNA konnte hingegen für beide RT-PCRs die angenommene Amplifikatlänge synthetisiert werden. Die Expressionslevel von Aktin in der Salk Linie und im Wildtyp zeigen, dass die eingesetzten cDNA Konzentrationen annähernd gleich waren.

Die T-DNA Insertion wurde zusätzlich durch Sequenzierung der genomischen *etc3* DNA mit dem Primer ETC3 (1.Exon)-forw. bestätigt. Die T-DNA Insertion ist nach 354bp im zweiten Intron lokalisiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Salk Linie als *etc3* Funktionsverlust-Mutante für weitere Experimente verwendet.

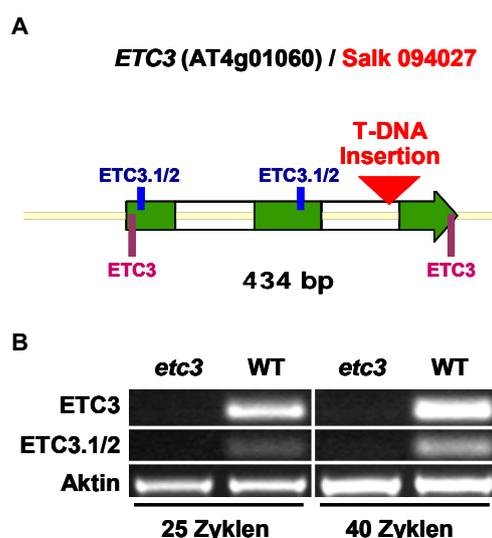


Abb. 2.1.2: Molekulare Analyse von *ETC3/etc3*. (A) Genomische *ETC3* DNA, in grün die Exons, in weiß die Introns. Roter Pfeil markiert die T-DNA Insertion in der Salk Linie. Die lila Balken markieren die Hybridisierungsstellen des Primerpaars ETC3. In blau sind die Hybridisierungsstellen des Primerpaars ETC3.1/2 markiert. (B) RT-PCRs mit *etc3* und Wildtyp (WT) cDNA. ETC3 steht für die Expression der gesamten *ETC3* cDNA mit den ETC3 Primern. ETC3.1/2 steht für die Expression von Exon eins und zwei der *ETC3* cDNA mit den ETC3.1/2 Primern. Die Hybridisierungsstellen der Primer sind in A markiert. Aktin steht für die Expression von Aktin. Die Zyklen geben die PCR-Zyklen an, nach denen die Expression analysiert wurde.

2.1.2 Phänotypische Analyse der *etc3* Mutante

Bei den Trichom-Inhibitoren *CPC* und *TRY* wurde gezeigt, dass in den Mutanten die Trichom-Dichte auf den Rosettenblättern erhöht ist bzw. sich Nester von Trichomen bilden. In *try* Mutanten treten zusätzlich noch überverzweigte Trichome auf (Schellmann *et al.*, 2002). Daher wurden *etc3* Pflanzen darauf untersucht, ob sich ein für Trichom-Inhibitor-Mutanten typischer Trichom-Phänotyp nachweisen lässt.

A) Trichom-Phänotyp von *etc3*

Columbia Wildtyp Pflanzen und *etc3* Pflanzen (s. Abb. 2.1.3) wurden für die phänotypische Analyse unter Langtagbedingungen bei 21°C angezogen. Die Trichome von *etc3* und WT Columbia Pflanzen wurden auf den ersten beiden Blattpaaren von je 50 Pflanzen gezählt. Dabei zeigte sich, dass die *etc3* Pflanzen eine höhere Trichom-Dichte im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, die Trichom-Anzahl ist in *etc3* um mehr als 50% höher als im Wildtyp (s. Tab. 2.1.3).

Die Größe der Trichome und die Verzweigung der Trichome von *etc3* und Wildtyp wurden ebenfalls miteinander verglichen. Für die Größenbestimmung wurden je zehn Rosettenblätter (Blatt drei von zwei Wochen alten Keimlingen) mit Propidiumiodid angefärbt und mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Es konnte kein Unterschied der Trichom-Größe zwischen *etc3* Mutante und Wildtyp festgestellt werden (s. Abb. 2.1.3 E/F).

Bei der Bestimmung der Trichom-Verzweigung wurden die Trichome auf dem ersten Blattpaar von zehn *etc3* und Wildtyp Pflanzen analysiert (s. Tab. 2.1.1). In *etc3* zeigten 89,3% der Trichome eine Dreifach-Verzweigung, im Wildtyp nur 81,8%. Diese Zunahme an Dreifach-Verzweigungen in *etc3* ist vornehmlich darauf zurückzuführen, dass die Mutante deutlich weniger vierfach verzweigte Trichome aufweist.

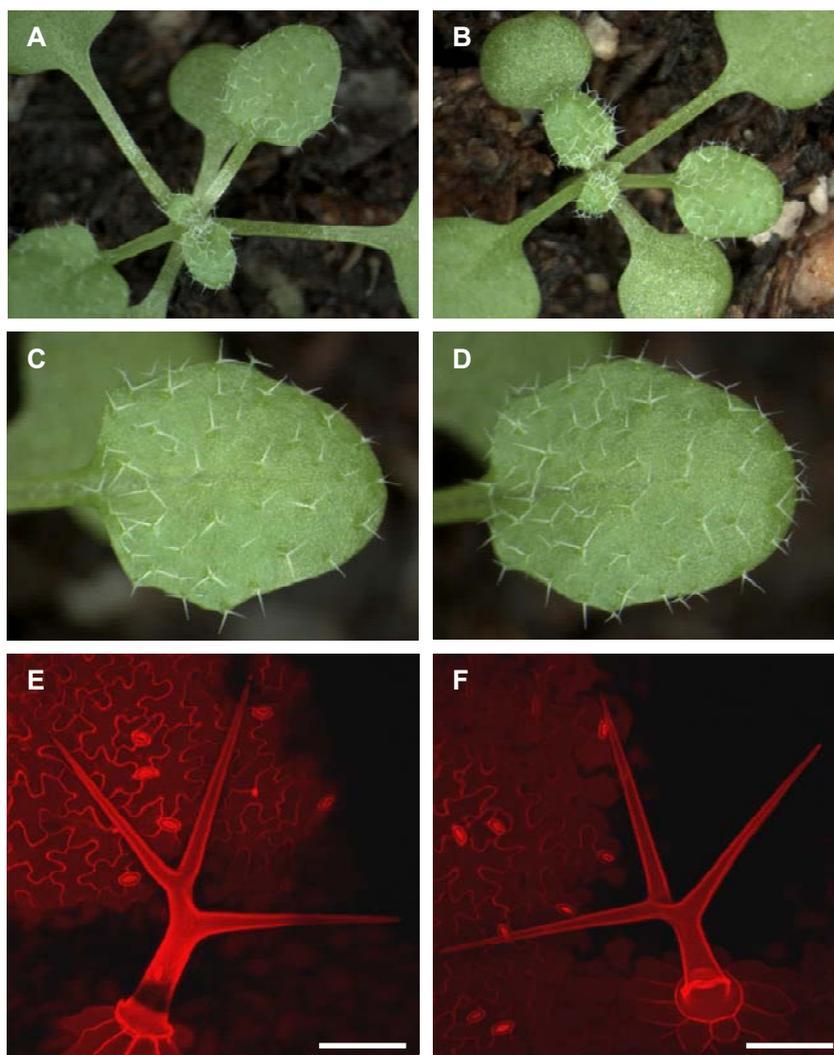


Abb. 2.1.3: Trichom-Phänotyp von *etc3*. (A-D) Rosettenblätter von *Arabidopsis*. (A/C) Wildtyp Columbia. (B/D) *etc3*. (E-F) Konfokale Bilder von Propidiumiodid-gefärbten Rosettenblättern. (E) Ausschnitt vom WT. (F) Ausschnitt von *etc3*.

Tab. 2.1.1: Trichom-Verzweigungsgrad.

	2x Verzweigung	3x Verzweigung	4x Verzweigung
WT	9,5%	81,9%	8,6%
<i>etc3</i>	9,0%	89,3%	1,8%

Trichom-Verzweigungsgrad auf den ersten beiden Rosettenblättern (n=10) von *etc3* und WT. Von allen Trichomen wurden die zweifach (2x), dreifach (3x) und vierfach (4x) verzweigten Trichome ausgezählt. In der Tabelle sind die für jeden Verzweigungstyp berechneten Mittelwerte prozentual angegeben.

B) Blattphänotyp der *etc3* Mutante

Die *etc3* Rosettenblätter von adulten Pflanzen hatten im Vergleich zum Wildtyp eine größere Blattfläche (s. Abb. 2.1.3; 2.1.8), daher wurde getestet, ob dieser Phänotyp aufgrund größerer epidermaler Zellen zu erklären ist, oder ob die Blätter mehr Epidermiszellen besitzen als der Wildtyp. Hierfür wurden 20 Blätter (jeweils Blatt drei von drei Wochen alten Pflanzen) von Wildtyp und *etc3* mit Propidiumiodid angefärbt. Von den Blättern wurde an der Blattspitze ein Bereich von $375\mu\text{m}^2$ mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop ausgewählt und die epidermalen Zellen in diesem Bereich gezählt (s. Tab. 2.1.2, Abb. 2.1.4). Die Rosettenblätter von *etc3* zeigten eine signifikant geringere Anzahl von Zellen ($p < 0,0005$) als der Wildtyp, es wurden 36 im Vergleich zu 42 Epidermiszellen in dem definierten Bereich ausgezählt.

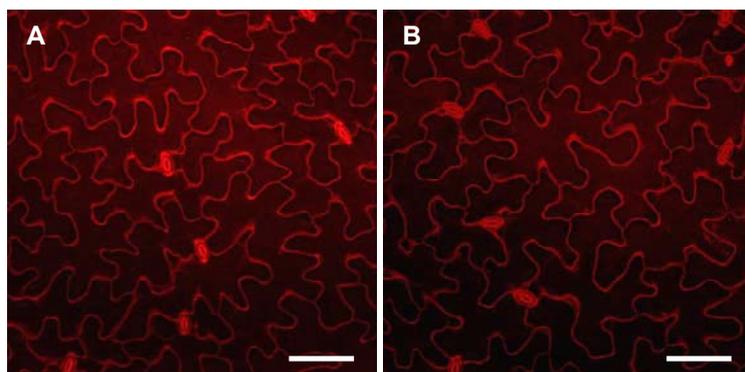


Abb. 2.1.4: Epidermale Zellgröße.
(A-B) Konfokale Bilder Propidiumiodid-gefärbter Rosettenblätter. Die Bilder zeigen Blattausschnitte der Epidermis. (A) WT. (B) *etc3*.

Tab. 2.1.2: Anzahl epidermaler Zellen pro Fläche.

Anzahl epidermaler Zellen im WT	Anzahl epidermaler Zellen in <i>etc3</i>
$41,7 \pm 3,9$	$35,7 \pm 3,1$

Auszählung epidermaler Zellen in Rosettenblättern. Die Zellen wurden in einem Blattausschnitt von $375\mu\text{m}^2$ im dritten Blatt ($n=20$) ausgezählt. In der Tabelle sind die Mittelwerte an Zellen (\pm Standardabweichung) in dem definierten Bereich angegeben.

2.1.3 ETC3 Expression *in planta*

Um den Nachweis zu erbringen, dass der *etc3* Phänotyp allein durch die Mutation in *ETC3* hervorgerufen wird, und um die Funktion von ETC3 in der Trichom-Musterbildung genauer zu analysieren, wurde die *ETC3* cDNA wie auch ein *ETC3* Promotorfragment

aus Columbia Wildtyp synthetisiert (Klonierung s. 4.7). Mittels der Expression in *Arabidopsis thaliana* wurde die Funktion von ETC3 *in vivo* überprüft.

A) Überexpression von ETC3

Zur Überexpression von ETC3 wurde der Blumenkohl Mosaik Virus Promotor (p35S) verwendet. ETC3 Überexpressionspflanzen (p35S::ETC3) sollten keine Trichome auf Rosettenblättern entwickeln, wenn ETC3 die Funktion eines Trichom-Inhibitors hat. Für CPC und TRY wurde dieser Phänotyp durch deren Expression unter Kontrolle des p35S Promotors gezeigt (Wada *et al.*, 1997; Schellmann *et al.*, 2002).

In der T1 Generation wurden 50 selektierte Pflanzen auf ihren Trichom-Phänotyp überprüft. 60% der Pflanzen hatten keine Trichome (s. Abb. 2.1.5). Bei den restlichen 40% schwankte die Anzahl an Trichomen zwischen zwei bis zehn Trichomen auf dem ersten Blatt, Wildtyp Pflanzen entwickeln etwa 17 Trichome auf dem ersten Blatt.

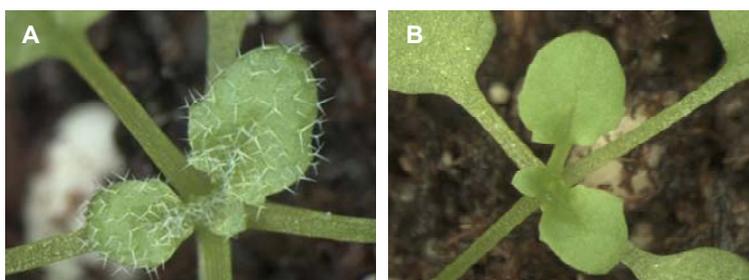


Abb. 2.1.5: Überexpression von ETC3. (A-B) Rosettenblätter von *Arabidopsis*. (A) Wildtyp Columbia. (B) T1: p35S::ETC3 in Columbia WT.

B) *GUS* Expressionsanalyse von *ETC3*

Für die Trichom-Inhibitoren CPC, TRY, ETC1 und ETC2 wurde ein übereinstimmendes Expressionsmuster festgestellt. Alle vier Gene werden in Trichomzellen exprimiert (Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004a, Kirik *et al.*, 2004b). Für die Expressionsanalyse von *ETC3* wurde als Promotor ein 2023bp Fragment vor dem Start-Kodon von *ETC3* gewählt (*pETC3*). Der *ETC3* Promotor wurde in den binären Vektor pAMPAT kloniert, 3' von dem Promotor wurde das Reportergen *GUS* (β -Glucuronidase) fusioniert (Klonierung s. 4.7).

Das Konstrukt *pETC3::GUS* wurde in Columbia Wildtyp Pflanzen transformiert, und in der T1 Generation wurden von den selektierten Pflanzen 15 Linien angelegt. In der T2 Generation wurden die Pflanzen auf eine *GUS* Expression überprüft. Die *pETC3::GUS*

Expression (s. Abb. 2.1.6) konnte in acht Linien nach zwölf Stunden Inkubation in der X-Gluc Lösung als basale Expression in jungen Blättern detektiert werden, die sich später auf junge Trichomzellen beschränkte. In adulten Trichomen war die Expression nicht mehr zu sehen (s. Abb. 2.1.6 A). Weiterhin konnte in den Stomata eine *ETC3* Expression gezeigt werden (s. Abb. 2.1.6 B), was ebenfalls für *ETC2* gezeigt wurde (Kirik *et al.*, 2004b). In der Wurzel wurde gelegentlich eine sehr schwache Expression festgestellt, jedoch musste das Pflanzenmaterial dafür bis zu 48 Stunden in der X-Gluc Lösung inkubieren (s. Abb. 2.1.6 C).

Aufgrund der Veröffentlichung von Tominaga *et al.* (2008), wo GUS Expressionsanalysen von *ETC3* bzw. *CPL3* mit einem 2384bp langen Promotor (vor dem Start-Kodon) keine Expressionen in Trichomzellen zeigten, wurde das gleiche Promotor-Fragment hergestellt (pETC3-W). Die *ETC3/CPL3* Expression wurde ebenfalls mit dem GUS-Reportersystem in Wildtyp Columbia Pflanzen untersucht. Es konnte eine Expression in jungen Trichomzellen und in Stomata detektiert werden (Daten nicht gezeigt), wie es mit dem 2023bp Promotor-Fragment gezeigt wurde.

Für nachfolgende Experimente wurde lediglich der 2023bp lange Promotor verwendet.

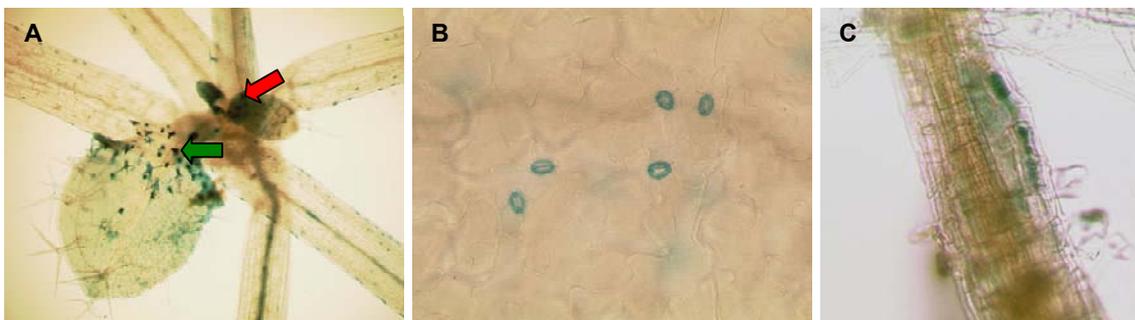


Abb. 2.1.6: GUS Expressionsanalyse von *ETC3*. (A-C) GUS Expressionsanalyse von *ETC3* in Wildtyp Columbia Hintergrund. Analyse der T2 Generation. (A) GUS Expression von *ETC3* im Blatt. Roter Pfeil zeigt auf die basale *ETC3* Expression. Grüner Pfeil markiert die Expression in Trichomen. (B) GUS Aktivität in Stomata. (C) GUS Aktivität in der Wurzel.

C) ETC3 Expressionsanalyse in verschiedenen Geweben

Um festzustellen, in welchen Geweben *ETC3* in *Arabidopsis* exprimiert wird und wie stark die Expression ist, wurden semi-quantitative RT-PCRs mit verschiedenen Wildtyp Geweben durchgeführt (s. Abb. 2.1.7). Für die PCRs dienten die genspezifischen Primer ETC3-forw. und ETC3-rev. (s. Abb. 2.1.2) für die Amplifikation der *ETC3* cDNA. Es wurde cDNA aus Wurzeln, Spross, Rosettenblättern, Hochblättern und Blüten isoliert. Da bei der GUS Expressionsanalyse in der Wurzel lediglich eine sehr schwache Expression zu detektieren war (s. Abb. 2.1.6 C), wurde zusätzlich cDNA aus Wurzeln der *cpc try* Doppelmutante isoliert. Wie Schellmann *et al.* (2002) feststellten, kann die Expression eines Inhibitors durch die Expression eines anderen Inhibitors reprimiert werden. Als Negativkontrolle diente cDNA aus der Wurzel von *etc3*. Wie auch schon bei der GUS Expressionsanalyse von *ETC3*, zeigte die RT-PCR in der Wurzel vom Wildtyp nur eine sehr schwache *ETC3* Expression. In Wurzeln der *cpc try* Doppelmutante war die Expression hingegen stark. In den restlichen Geweben zeigte *ETC3* die stärkste Expression in der Blüte, dann abnehmend stark in den Rosettenblättern und Hochblättern. Im Spross war die Expression von *ETC3* schwächer.

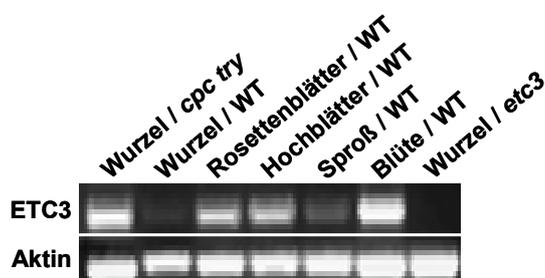


Abb. 2.1.7: Gewebespezifische *ETC3* Expressionsanalyse.

RT-PCRs in den oben angeführten Geweben von *Arabidopsis* Wildtyp (WT), *cpc try* und *etc3*. Obere Reihe, die genspezifische Amplifikation von *ETC3* cDNA. Aktin Amplifikation in den Geweben ist die Kontrolle.

D) Rettung der *etc3* Mutante

Um die Funktionalität des isolierten *ETC3* Promotors und der *ETC3* cDNA zu zeigen, wurde das Rettungskonstrukt pETC3::*ETC3* hergestellt, mit dem die *etc3* Mutante komplementiert werden sollte.

Nach der Transformation von *etc3* Pflanzen mit dem pETC3::*ETC3* Konstrukt wurde in der T1 Generation die Trichom-Dichte und Trichom-Verteilung auf den ersten beiden Blattpaaren von vierzig selektierten Pflanzen bestimmt (s. Tab. 2.1.3). Es wurde der Mittelwert der Trichom-Anzahl pro Blatt im ersten und zweiten Blattpaar bestimmt. Die

Anzahl der Trichome in *etc3* mit dem pETC3::ETC3 Konstrukt war annähernd gleich zu der Anzahl im Wildtyp, der Unterschied in der Trichom-Anzahl war nicht signifikant ($p=0,11$, der Wert bezieht sich auf die gesamte Trichom-Anzahl im ersten und zweiten Blattpaar von *etc3* und WT).

Tab. 2.1.3: Trichom-Anzahl in Abhängigkeit von ETC3.

Genotyp	Trichom-Anzahl pro Blatt im 1. Blattpaar	Trichom-Anzahl pro Blatt im 2. Blattpaar
WT	16,6 ± 2,2	45,5 ± 7,2
<i>etc3</i>	25,6 ± 2,9	71,0 ± 10,4
p35S::ETC3 / WT	1,1 ± 2,0	1,5 ± 3,8
pETC3::ETC3 / <i>etc3</i>	11,5 ± 4,0	44,9 ± 14,6
pRbc::ETC3 / WT	5,4 ± 2,8	20,5 ± 8,6
pRbc::CPC / WT	3,9 ± 3,0	16,9 ± 8,2

Trichom-Anzahl in Columbia Wildtyp (WT), *etc3* und transformierten Pflanzen, in denen *ETC3* unter Kontrolle der angeführten Promotoren exprimiert wird. *ETC3* unter dem endogenen Promotor (pETC3) wurde in *etc3* Pflanzen transformiert. Unter dem Rubisco und Cauliflower Mosaik Virus Promotors (pRbc, p35S) wurde ETC3 in Wildtyp Pflanzen transformiert. Die Trichom-Anzahl pro Blatt bezieht sich auf den Mittelwert ± Standardabweichung (n=40) im ersten und zweiten Blattpaar.

E) Untersuchung der Rosetten-Größe in Abhängigkeit von ETC3

Es wurde bereits gezeigt, dass in *etc3* Mutanten die Anzahl der Epidermiszellen in den Rosettenblättern geringer ist als im Wildtyp und die Blätter größer erscheinen (s. 2.2. B). Es war daher von Interesse, die Rosetten-Größe in Abhängigkeit von ETC3 zu analysieren. Hierfür wurden die Durchmesser ganzer Pflanzenrosetten (n=20) zum Blühzeitpunkt (28 ± 2 Tage) von *etc3* Pflanzen mit Wildtyp Pflanzen und den transgenen Linien p35S::ETC3 (in Columbia Wildtyp) und pETC3::ETC3 (in *etc3*) verglichen. Der längste Durchmesser einer Rosette wurde für die Messungen verwendet (s. Tab.2.1.4). Wie augenscheinlich schon erkennbar war, zeigten die *etc3* Pflanzen (s. Abb. 2.1.8 A) den größten Rosetten-Durchmesser von 11,68cm und die p35S::ETC3 Pflanzen (s. Abb. 2.1.8 C) die kleinste mit 7,56cm. Die Rosetten-Größe der *etc3* Pflanzen war signifikant höher ($p<0,0005$) als der Durchmesser von Wildtyp Pflanzen (s. Abb. 2.1.8.B). Die pETC3::ETC3 Pflanzen (s. Abb. 2.1.8 D) zeigten hingegen die gleiche Rosetten-Größe von 10,6cm wie der Wildtyp.

Tab. 2.1.4: Rosetten-Durchmesser in Abhängigkeit von ETC3.

<i>etc3</i> [cm]	WT [cm]	p35S::ETC3 / WT [cm]	pETC3::ETC3 / <i>etc3</i> [cm]
11,68 ± 0,93	10,61 ± 0,77	7,56 ± 0,48	10,58 ± 1,30

Von jeder angegebenen Pflanzenlinie wurde der längste Durchmesser der gesamten Pflanzenrosette (n=20) ausgemessen. Die Werte geben den entsprechenden Mittelwert mit Standardabweichung an. Bei den transgenen Linien ist der Hintergrund angegeben.



Abb. 2.1.8: Rosetten-Größe. Aufnahmen der Rosetten von *Arabidopsis* zum Blühzeitpunkt (28 Tage). **(A)** *etc3*, **(B)** WT, **(C)** p35S::ETC3 in WT Hintergrund. **(D)** pETC3::ETC3 in *etc3* Hintergrund.

F) Protein Lokalisation von ETC3

Wenn ETC3 die Funktion als Trichom-Inhibitor hat, sollte das Protein in der Lage sein, von Trichom-Initialzellen, wo es exprimiert wird (s. Abb. 2.1.3 B), in die Nachbarzellen zu wandern. Um zu untersuchen, ob ETC3 in der Lage ist zu wandern, wurde die *ETC3* cDNA mit YFP/GFP fusioniert und unter die Kontrolle des 35S Promotors und *ETC3* Promotors kloniert. Der *ETC3* Promotor wurde zusätzlich mit GFP-ER fusioniert, um die *ETC3* Expression auf zellulärer Ebene zu untersuchen (Klonierung s. 4.7). GFP-ER steht für die Fusion von GFP mit einer Endoplasmatischen Reticulum (ER) Lokalisationssequenz, wodurch GFP zellautonom ist. Die Konstrukte wurden in Wildtyp Pflanzen transformiert. In der T1 Generation wurden die Transformanten mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop auf ihre Protein Fluoreszenz Lokalisation analysiert. Pflanzen mit dem Konstrukt p35S::YFP-ETC3 zeigten eine ETC3 Lokalisation im Zellkern und im Cytoplasma (s. Abb. 2.1.9 A). Die endogene Expression von ETC3 mit dem Konstrukt pETC3::YFP-ETC3 in Transformanten zeigte, dass ETC3 in Trichom-Initialen lokalisiert und in den angrenzenden Nachbarzellen zu sehen ist (s. Abb. 2.1.9 B). In den Trichom-Initialzellen war ETC3 im Zellkern wie auch im Cytoplasma zu detektieren, wohingegen sich in den Nachbarzellen die Lokalisation fast ausschließlich im Zellkern konzentrierte.

Die Expression von pETC3::GFP-ER war lediglich in einzelnen Zellen zu sehen (s. Abb. 2.1.9 C), welche Trichom-Initialzellen darstellen.

Um die Mobilität von ETC3 durch weitere Experimente zu bestätigen, wurde die GFP-ETC3 Fusion (Klonierung s. 4.7) transient in Rosettenblättern exprimiert, um die Wanderung des Proteins zu verfolgen. Das p35S::GFP-ETC3 Konstrukt wurde zusammen mit dem Konstrukt p35S::YFP-PTS (Peroxisom Signalsequenz) mittels Partikel-Beschuss in junge Rosettenblätter geschossen. Der Peroxisom-Marker diente zur Erkennung der getroffenen Epidermis Zelle, da der Marker zellautonom ist. Nach 15 Stunden wurden die beschossenen Blätter mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die GFP-ETC3 Fusion war in den beschossenen Zellen und in den benachbarten Zellen in 76% der analysierten Zellen zu detektieren, wobei das Fusionsprotein eine Reichweite von bis zu drei Zellen hatte (Abb. 2.1.9 F).

Ein weiterer Nachweis für die Mobilität von ETC3 wurde durch die Expression von *ETC3* unter der Kontrolle des Rubisco Promotors (pRbc) erbracht (Promotor der kleinen Untereinheit 2b). Der Rubisco Promotor ist ausschließlich in der Subepidermis aktiv (Kim *et al.*, 2003). Wenn ETC3 in der Lage sein sollte, von der Subepidermis (L2) in die Epidermis (L1) zu wandern, sollte sich das auf den Trichom-Phänotyp auswirken. Zum Vergleich wurde *CPC* ebenfalls unter die Kontrolle des Rubisco Promotors kloniert (Klonierung s. 4.7). Die Konstrukte pRbc::ETC3 und pRbc::CPC wurden in Wildtyp Pflanzen transformiert. In der T1 Generation wurden je 40 selektierte Pflanzen analysiert, die insgesamt weniger Trichome auf den Rosettenblättern zeigten als der Wildtyp. Die Trichom-Anzahl war in Pflanzen mit dem pRbc::ETC3 Konstrukt im ersten Blattpaar um 68% und im zweiten Blattpaar um 55% niedriger als im Wildtyp (s. Abb. 2.1.9 E, Tab. 2.1.3). In Pflanzen mit dem pRbc::CPC Konstrukt war die Trichom-Anzahl im ersten Blattpaar um 77% und im zweiten Blattpaar um 63% niedriger (s. Tab. 2.1.3). Die Wanderung von der Subepidermis in die Epidermis wurde zusätzlich mit der YFP-ETC3 Fusion unter Kontrolle des Rubisco Promotors untersucht. Das Konstrukt pRbc::YFP-ETC3 wurde in Wildtyp Columbia Pflanzen transformiert und die ETC3 Lokalisation mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die YFP-ETC3 Fusion konnte sowohl in der L2 als auch in der L1 Schicht detektiert werden (s. Abb. 2.1.9 D).

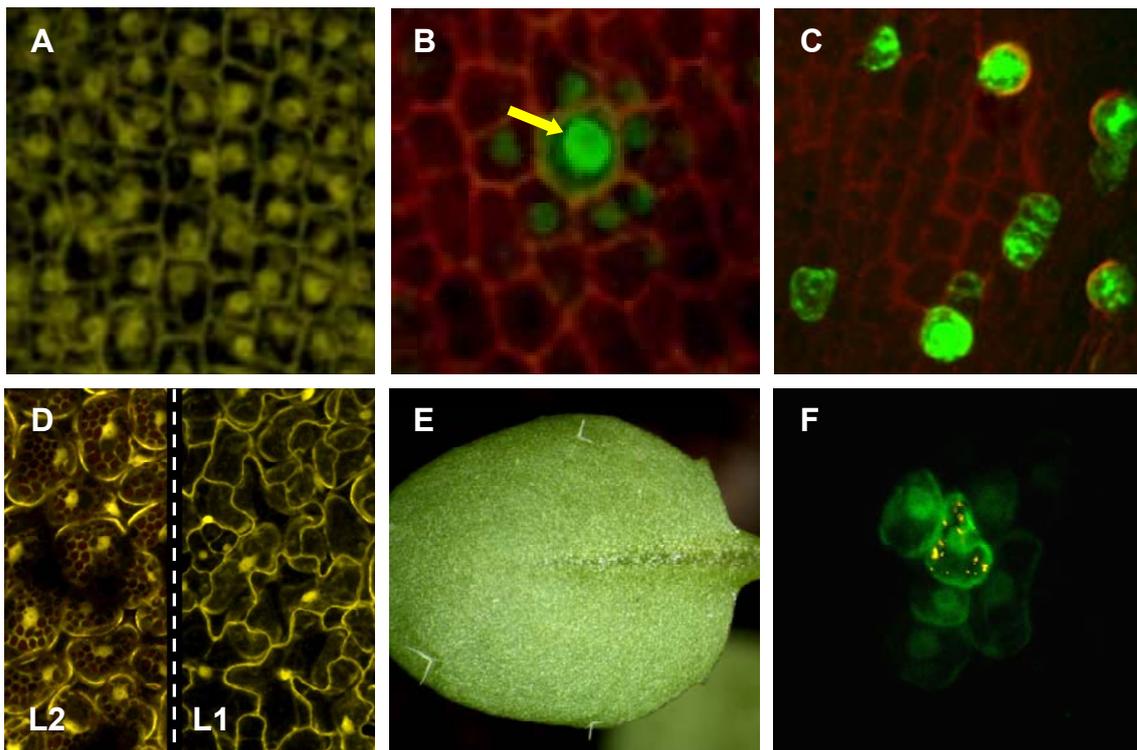


Abb. 2.1.9: Lokalisation von ETC3. (A-F) Rosettenblätter transgener Pflanzen in Columbia Wildtyp. (A-D) Konfokale Bilder von basalen Blattbereichen. (A) p35S::YFP-ETC3 Lokalisation in Epidermiszellen. (B) pETC3::YFP-ETC3 Lokalisation in der Epidermis. Gelber Pfeil markiert Trichom Initialzelle. Zellwände mit Propidiumiodid gefärbt. (C) pETC3::GFP-ER Expression in der Epidermis. Zellwände mit Propidiumiodid gefärbt. (D) pRbc::YFP-ETC3 Lokalisation in der Subepidermis (L2, in rot die Auto-Fluoreszenz der Chloroplasten) und Epidermis (L1) in einem ausgewählten Blattbereich. (E) Trichom-Phänotyp auf Rosettenblatt. Transformation mit pRbc::ETC3 Konstrukt. (F) Konfokale Aufnahme transientser Expression von p35S::GFP-ETC3 und p35S::YFP-PTS im basalen Blattbereich mittels Partikel-Beschuss. p35S::YFP-PTS (PTS=Peroxisom) markiert die getroffene Zelle.

2.1.4 Protein-Protein Interaktionsanalysen mit ETC3

Die regelmäßige Verteilung der Trichome auf Rosettenblättern wird durch laterale Inhibition reguliert, die aus der Mobilität der Inhibitoren und der Protein-Protein Interaktionen zwischen den Trichom-Inhibitoren und -Aktivatoren hervorgeht. Die Protein-Protein Interaktion von GL3 mit den Inhibitoren scheint für den Prozess der lateralen Inhibition entscheidend zu sein (Schnittger *et al.*, 1999; Payne *et al.*, 2000; Szymanski *et al.*, 2000; Schellmann *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Esch *et al.*, 2003; Larkin *et al.*, 2003; Marks and Esch, 2003; Pesch and Hülskamp, 2004; Ishida *et al.*, 2008; Bouyer *et al.*, 2008; Digiuni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Um zu zeigen, dass ETC3 an der lateralen Inhibition beteiligt ist, wurde die Interaktion von ETC3 mit GL3 und anderen Trichom-Regulatorproteinen mit dem GAL4 Zwei-Hybrid Interaktionstest in *Saccharomyces cerevisiae* analysiert.

ETC3 wurde dabei als Köder in dem Vektor pAS2.1 und die folgenden Trichom-Regulatorgene als Beuteplasmid in dem Vektor pAct eingesetzt: Die Trichom-Aktivatoren *GL1*, *GL1Δ*, *MYB23*, *GL2*, *GL3*, *GL3-96*, *GL3-400* und *TTG1* und Trichom-Inhibitoren *CPC*, *TRY*, *ETC1*, *ETC2* und *ETC3* (Klonierung s. 4.7). *GL1 Δ* (von Ullrich Hermann hergestellt) steht für eine verkürzte *GL1* DNA, C-terminal sind 27 Aminosäuren deletiert, wodurch die Autoaktivität von *GL1* ausgeschaltet werden kann. Bei *GL3-96* und *GL3-400* (in meiner Diplomarbeit hergestellt) handelt es sich ebenfalls um verkürzte DNA Fragmente. In *GL3-96* sind N-terminal 96 Aminosäuren und in *GL3-400* N-terminal 400 Aminosäuren deletiert. Die verkürzten *GL3* Fragmente beziehen sich auf die Veröffentlichung von Payne *et al.* (2000), wo gezeigt wurde, dass die Deletionen die *GL3*-Transaktivierungsdomäne außer Funktion setzen. Diese verkürzten *GL3* Fragmente zeigen keine Interaktion mehr mit *GL1*, jedoch wird die Interaktion mit *TTG1* nicht gestört.

Alle verwendeten Köder- und Beuteplasmide wurden vor den Interaktionstests auf eine eventuelle Autoaktivierung getestet, da es sich bei den Genen um Transkriptionsfaktoren handelt. Die Köderplasmide wurden mit dem leeren Beutevektor pAct auf eine Interaktion getestet. Leerer Vektor bedeutet, dass die GAL4 Aktivierungsdomäne bzw. Bindedomäne nicht mit einem Gen fusioniert ist. Die Interaktion wurde mittels des Histidin-Reportersystems über einen Agar-Plattentest durchgeführt. Die Interaktionsplatten wurden mit 5mM 3-Amino-1,2,4-triazol versetzt. Bei den Köderplasmiden wurde keine Autoaktivierung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Beuteplasmide wurden mit dem leeren Köderplasmid-Vektor pAS auf eine Interaktion getestet, wobei ebenfalls keine Autoaktivität festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Interaktionsanalysen zwischen *ETC3* und den Trichom-Regulatorgenen wurden mittels des Histidin-Reportersystems qualitativ über einen Agar-Plattentest durchgeführt. Die Interaktionsplatten wurden hierfür mit 5mM 3-Amino-1,2,4-triazol versetzt. Die beiden Hefeproteine SnF1 und SnF4 wurden als Positivkontrolle für eine Interaktion mit einbezogen (Fields and Song, 1989).

Wie alle bekannten Trichom-Inhibitoren zeigte auch ETC3 eine starke Protein-Protein Interaktion mit GL3. Mit allen anderen Trichom-Regulatoren wurde keine Interaktion festgestellt (s. Abb. 2.1.10).

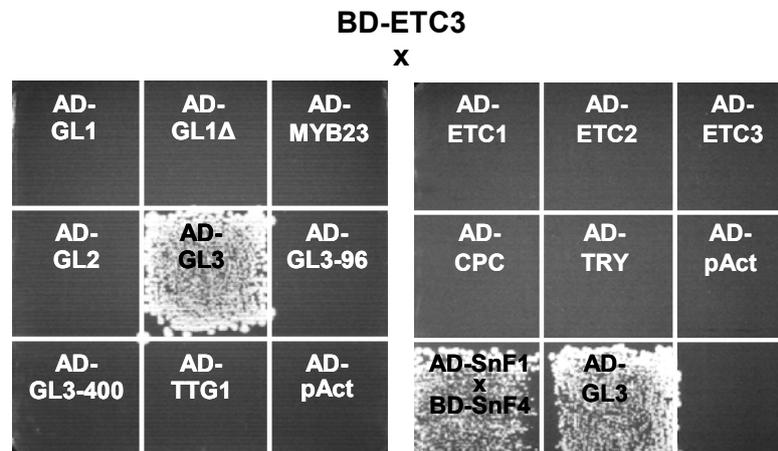


Abb. 2.1.10: GAL4 Zwei-Hybrid Interaktionstest. Qualitativer Protein-Protein Interaktionstest zwischen ETC3 als Köderplasmid mit GAL4 Bindedomäne (BD) und den aufgeführten Trichom-Regulatorproteinen als Beuteplasmide mit GAL4 Aktivierungsdomäne (AD). Das Wachsen der Hefen auf den Interaktionsplatten signalisiert eine Interaktion zwischen dem analysierten Köder- und Beuteplasmid.

2.1.5 Untersuchung möglicher redundanter Funktionen von ETC3

Die *etc3* Mutante wurde mit den Trichom-Inhibitor Mutanten *cpc*, *try*, *cpc try*, *etc1*, *etc2* und *cpc try etc1* gekreuzt um festzustellen, ob *etc3* eine redundante Funktion zu den aufgeführten Trichom-Inhibitoren in der Trichom-Musterbildung besitzt.

Die einzelnen Mutanten zeigen unterschiedliche Defekte in der Trichom-Verteilung und -Dichte auf Rosettenblättern. Danach kann man Mutanten der Trichom-Inhibitoren in drei Klassen von Phänotypen einteilen. In der *try* Mutante bilden sich Nester von Trichomen, bestehend aus zwei bis vier direkt angrenzenden Trichomzellen. In der *cpc* und *etc2* Mutante ist die Trichom-Dichte erhöht. Die *etc1* Mutante weist hingegen keine auffälligen Defekte im Trichom-Muster auf (Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b).

Für die Auswertung der Kreuzungen wurden in der F2 Generation jeweils drei homozygote Linien etabliert, die mittels PCR auf die Genotypen überprüft wurden. In der F3 Generation wurden die Analysen durchgeführt.

Zuerst wurden die vier möglichen Doppelmutanten *cpc etc3*, *try etc3*, *etc1 etc3*, *etc2 etc3* etabliert (s. Tab. 2.1.5). Bei den Doppelmutanten wurden von jeder Linie mindestens acht Pflanzen untersucht, bei den Einzelmutanten und Wildtypen waren es 15 Pflanzen. Das Trichom-Muster wurde auf die Trichom-Anzahl, Anzahl der Trichom-Initiationsstellen (Trichom-Initiationsstelle entspricht einem Trichom bzw. einem Trichom-Nest) und Frequenz der Trichom-Nester pro Blatt im ersten und zweiten Blattpaar untersucht. Die Frequenz der Trichom-Nester wurde aus der Gesamtzahl an Trichom-Initiationen und Trichom-Nestern in den Blattpaaren aller analysierten Pflanzen pro Blatt bestimmt.

Die *try etc3* Doppelmutante zeigte einen synergistischen Effekt. Die Nester-Frequenz pro Blatt im ersten und zweiten Blattpaar von 8,4% und 11,9% war verglichen mit der *try* Einzelmutante mit 6,2% im ersten und 10,5% im zweiten Blattpaar erhöht. Die Trichom-Anzahl war jedoch ähnlich hoch wie in der *etc3* Einzelmutante. Die *etc1 etc3* Doppelmutante zeigte eine höhere Trichom-Anzahl verglichen mit den Einzelmutanten ($p=0,003$ für *etc3*). In der *cpc etc3* und *etc2 etc3* war die Trichom-Anzahl im Vergleich zu den Einzelmutanten geringfügig erhöht. Ausgehend von den Doppelmutanten wurden die Tripelmutanten *etc1 etc2 etc3* und *cpc try etc3* (s. Abb. 2.1.12) etabliert. Die *etc1 etc2 etc3* Tripelmutante (s. Abb. 2.1.12 B, Tab. 2.1.5) zeigte eine starke Erhöhung der Trichom-Anzahl auf den Blättern im ersten und zweiten Blattpaar ($n=10$). Die Anzahl an Trichomen pro Blatt im ersten Blattpaar war in etwa doppelt so hoch wie bei der *etc1 etc2* Doppelmutante. Die Trichom-Verteilung war nicht gestört, es traten keine Trichom-Nester auf, jedoch waren die Trichome kleiner als in den Einzelmutanten. In der *cpc try etc3* Tripelmutante konnte ein stark synergistischer Effekt gezeigt werden. Sowohl die Trichom-Anzahl als auch die Größe der Trichom-Nester war verglichen mit der *cpc try* Doppelmutante erhöht (s. Abb. 2.1.12). Die Trichom-Nester bestanden aus über 300 Trichomen (geschätzter Wert). Auf dem Hypokotyl und den Sepalen befanden sich ebenfalls mehr ektopische Trichome als in der *cpc try* Doppelmutante, was auch bei der *cpc try etc1* und *cpc try etc2* Mutante (Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b) auftritt (s. Abb. 2.1.12).

Aus den Tripelmutanten *cpc try etc1* und *cpc try etc3* wurde die Quadrupelmutante *cpc try etc1 etc3* etabliert (s. Abb. 2.11), in der der beschriebene Phänotyp der Tripelmutanten noch weiter verstärkt ist. Die Trichom-Dichte in den Trichom-Nestern war weiter erhöht, wie es auch bei der *cpc try etc1 etc2* Mutante (von Daniel Bouyer hergestellt, s. Abb. 2.1.12) zu sehen ist.

Generell wiesen die Quadrupelmutanten phänotypische Defizite in ihrer Entwicklung auf. Die Pflanzen waren deutlich kleiner als die Tripelmutanten (s. Abb. 2.1.11) und benötigen für einen Generationswechsel etwa sechs Wochen länger als der Wildtyp. Es schien, dass die großen Trichom-Nester das normale Auswachsen der Rosettenblätter und der Infloreszenz blockieren.

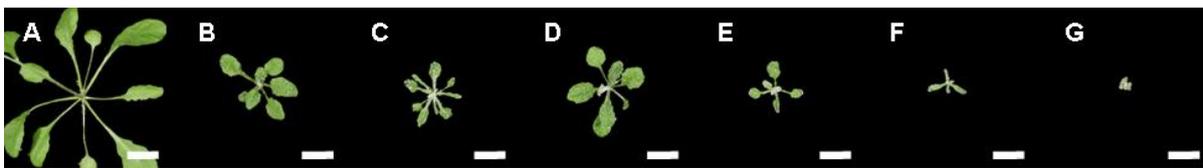


Abb. 2.1.11: Größenunterschied der Pflanzen in Abhängigkeit von *etc3*. Alle Abbildungen zeigen die gleiche Vergrößerung (Maßstab 1cm) von vier Wochen alten Pflanzen (A) WT. (B) *cpc try*. (C) *cpc try etc1*. (D) *cpc try etc2*. (E) *cpc try etc3*. (F) *cpc try etc1 etc2*. (G) *cpc try etc1 etc3*.

Die Pflanzen sind weniger fertil und bilden weniger Samen. Auf den Sepalen und dem Hypokotyl entwickeln sich ebenfalls ektopische Trichome (s. Abb. 2.1.12).

Jedoch zeigen die Quadrupelmutanten immer noch Blattbereiche ohne Trichome, weshalb die Quintupelmutante hergestellt werden sollte. Da die *cpc try etc1 etc3* Quadrupelmutante häufig nicht das Blühstadium erreichte wurde die *cpc try etc1 etc2* Quadrupelmutante mit der *cpc try etc3* Tripelmutante gekreuzt. In der F2 Generation wurde 40 Pflanzen, die eine sehr hohe Trichom-Dichte aufwiesen, genotypisiert, jedoch konnte keine Quintupelmutante identifiziert werden.



Abb. 2.1.12: Trichom-Inhibitor Mehrfachmutanten. (A-H) Rosettenblätter. (I-L) Hypokotyl. (M-R) Blüten. (A/M) WT. (B) *etc1 etc2 etc3*. (C/I/N) *cpc try*. (D/J/O) *cpc try etc1*. (E/K/P) *cpc try etc2*. (F/L/Q) *cpc try etc3*. (G/R) *cpc try etc1 etc2*. (H) *cpc try etc1 etc3*.

Tab. 2.1.5: Trichom-Anzahl und Trichom-Nester Frequenz in Trichom-Inhibitor Mutanten.

Genotype	Trichom-Initiationen pro Blatt im 1. Blattpaar	Trichom-Anzahl pro Blatt im 1. Blattpaar	Trichom-Nester Frequenz pro Blatt im 1. Blattpaar [%]	Trichom-Initiationen pro Blatt im 2. Blattpaar	Trichom-Anzahl pro Blatt im 2. Blattpaar	Trichom-Nester Frequenz pro Blatt im 2. Blattpaar [%]
WT (Col)	16,6± 2,2	16,6± 2,2	0	45,5± 7,2	45,5± 7,2	0
<i>etc3</i> (Col)	25,6± 2,9	25,6± 2,9	0	71,0± 10,4	71,0± 10,4	0
<i>etc1</i> (Col)	19,9± 2,6	19,6± 2,6	0	53,1± 9,6	53,1± 9,6	0
<i>try</i> (Col)	16,5± 2,3	18,6± 2,0	6,2	40,3± 6,4	48,9± 7,9	10,5
<i>etc3 try</i>	24,7± 3,3	28,8± 4,5	8,4	53,5± 7,1	66,7± 8,9	11,9
<i>etc3 etc1</i>	36,7± 4,6	37,1± 4,6	0,5	88,6± 11,4	89,6± 11,4	0,5
WT (WS)	19,8± 2,5	19,8± 2,5	0	66,7± 13,3	66,7± 13,3	0
<i>cpc</i> (WS)	27,7± 3,7	27,7± 3,7	0	102,7± 16,9	102,8± 17,0	0,1
<i>etc2</i> (WS)	24,3± 2,9	24,3± 2,9	0	75,0± 12,8	75,0± 12,8	0
<i>etc3 etc2</i>	30,5± 3,5	30,5± 3,5	0	78,9± 11,9	78,9± 11,9	0
<i>etc3 cpc</i>	38,8± 3,9	39,2± 3,9	0,6	106,8± 17,9	107,1± 18,1	0,1
<i>etc1 etc2</i>	47,0± 3,0	47,0± 3,0	0	136,2± 11,1	136,2± 11,1	0
<i>etc1 etc2 etc3</i>	92,6± 2,5	92,6± 2,5	0	>170± nd	>170± nd	0

Links sind die Einzel- und Doppelmutanten sowie die Wildtypen der verwendeten Ökotypen (Col= Columbia, WS= Wassilewskija) aufgelistet. Die Trichom-Anzahl, Trichom-Initiationen und die Trichom-Nester Frequenz pro Blatt bezieht sich auf den Mittelwert ± Standardabweichung im ersten und zweiten Blattpaar. Die Trichom-Initiationen (Trichom-Initiationsstellen) entsprechen einem Trichom bzw. einem Trichom-Nest pro Blatt. Die Trichom-Anzahl pro Blatt gibt die gesamte Trichom-Anzahl an. Die Trichom-Nester Frequenz pro Blatt ergibt sich aus der Gesamtzahl der Trichom-Initiationen und Trichom-Nester von den analysierten Blattpaaren.

2.1.6 Untersuchung der Stomata-Dichte und -Verteilung in Abhängigkeit von ETC3

Kirik *et al.* (2004b) zeigten, dass *ETC2* in Stomata exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde für *ETC3* eine Stomata-Expression detektiert (s. Abb. 2.1.6). Daher wurde überprüft, ob in den Einzelmutanten *etc2*, *etc3* und/oder in der Doppelmutante *etc2 etc3* Unterschiede in der Stomata-Dichte und -Verteilung auftreten. Hierfür wurden von vier Wochen alten Pflanzen jeweils das vierte Rosettenblatt mit Propidiumiodid angefärbt und die Stomata in einem Bereich von 1mm² an der Blattspitze mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop ausgezählt. Aus den Anzahlen wurde jeweils der Mittelwert berechnet (s. Tab. 2.1.6).

Die Stomata-Anzahl in *etc3* (n=18) war mit ca. 47 Stomata gleich hoch wie im Wildtyp Columbia (n=18) (p=0,18). Ebenso war die Stomata-Anzahl in *etc2* (n=18) gleichzusetzen mit der Anzahl im Wildtyp Wassilewskija (n=18) mit ca. 50 Stomata (p=0,23). Von der *etc2 etc3* Doppelmutante wurden drei Linien (jeweils zehn Blätter) analysiert. Die einzelnen Linien zeigten untereinander keine wesentlichen Unterschiede, weshalb die Stomata-Anzahl aus dem Mittelwert aller 30 Blätter bestimmt wurde. Bei der Überexpressionslinie p35S::ETC3 in Wildtyp Columbia Hintergrund wurden ebenfalls drei Linien analysiert und aus allen Blättern (n=30) der Mittelwert bestimmt. In der Doppelmutante *etc2 etc3* zeigte sich eine signifikant geringere Stomata-Anzahl im Vergleich zu den Einzelmutanten *etc3* und *etc2*. Die Stomata-Anzahl in der Doppelmutante von ca. 42 zeigte eine Signifikanz von p=0,011 gegenüber der Anzahl in der *etc3* Mutante und eine Signifikanz von p<0,001 zu *etc2*. Die Überexpressionslinie p35S::ETC3 zeigte hingegen die gleiche Anzahl an Stomata wie die *etc3* Mutante. Die Stomata-Verteilung war in allen analysierten Pflanzen nicht gestört.

Tab. 2.1.6: Stomata-Anzahl pro Fläche.

Stomata-Anzahl WT (Col)	Stomata-Anzahl <i>etc3</i> (Col)	Stomata-Anzahl WT (WS)	Stomata-Anzahl <i>etc2</i> (WS)	Stomata-Anzahl <i>etc2 etc3</i>	Stomata-Anzahl p35S::ETC3 (Col)
44,0 ±7,3	47,3 ±6,4	49,9 ±7,6	52,7 ±4,7	42,4 ±5,8	47,5 ±7,1

Die Stomata-Anzahl wurde in den oben aufgelisteten Pflanzen bestimmt. Die Stomata wurden in Rosettenblättern von vier Wochen alten Pflanzen (jeweils Blatt vier) auf einer Fläche von 1mm² ausgezählt. Die Werte in der Tabelle geben die berechneten Mittelwerte mit Standardabweichung an. Für Wildtyp Columbia (Col), Wildtyp Wassilewskija (WS), *etc3* und *etc2* ist n=18. Für *etc2 etc3* und Überexpressionspflanzen von *ETC3* (p35S::ETC3) ist n=30.

2.2 Untersuchung der Trichom-Inhibitoren auf Protein- und Expressionsebene

Nachdem mittlerweile sechs Gene identifiziert wurden, *ETC3* mit eingeschlossen, die alle eine Funktion als Trichom-Inhibitor zeigen, stellte sich die Frage, warum die Trichom-Musterbildung von sechs Trichom-Inhibitoren reguliert wird. Um unterschiedliche Funktionen der einzelnen Inhibitoren in der Trichom-Musterbildung aufzudecken, wurden die Trichom-Inhibitoren durch Interaktionstests und Mobilitätsanalysen auf Proteinebene untersucht und durch Promotor-Austausch Experimente auf Expressionsebene analysiert.

2.2.1 Protein-Protein Interaktions- und Kompetitionsstärken

Alle Trichom-Inhibitoren zeigen eine Interaktion mit GL3 (Wang *et al.*, 2008). Weiterhin wurde gezeigt, dass TRY und CPC mit GL1 um die Bindung an GL3 kompetieren (Esch *et al.*, 2003). Das Interesse lag nun darin, die Interaktionen der Trichom-Inhibitoren CPC, TRY, ETC1, ETC2, ETC3 und des Trichom-Aktivators GL1 mit GL3 zu vergleichen, um eventuelle Unterschiede zu erkennen. Weiterführend sollte die Konkurrenz für die Bindung an GL3 zwischen den restlichen Inhibitoren ETC1, ETC2, ETC3 und GL1 überprüft werden, um einen Vergleich zu den bereits bekannten Konkurrenten CPC und TRY herzustellen.

Die Interaktions- und Konkurrenztests wurden mit dem GAL4 Zwei-Hybrid bzw. GAL4 Drei-Hybrid System in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt.

Als Positivkontrolle für eine stattfindende Interaktion wurden die Hefeproteine SnF1 und SnF4 mit einbezogen (Fields and Song, 1989).

Da es sich bei den Trichom-Inhibitoren und den -Aktivatoren GL1 und GL3 um Transkriptionsfaktoren handelt, wurden alle verwendeten Köder- und Beuteplasmide (s. unten) vor den Interaktions- und Konkurrenztests auf eine eventuelle Autoaktivierung getestet, wobei für kein Beute- und Köderplasmid eine Autoaktivität festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

A) GAL4 Zwei-Hybrid Test

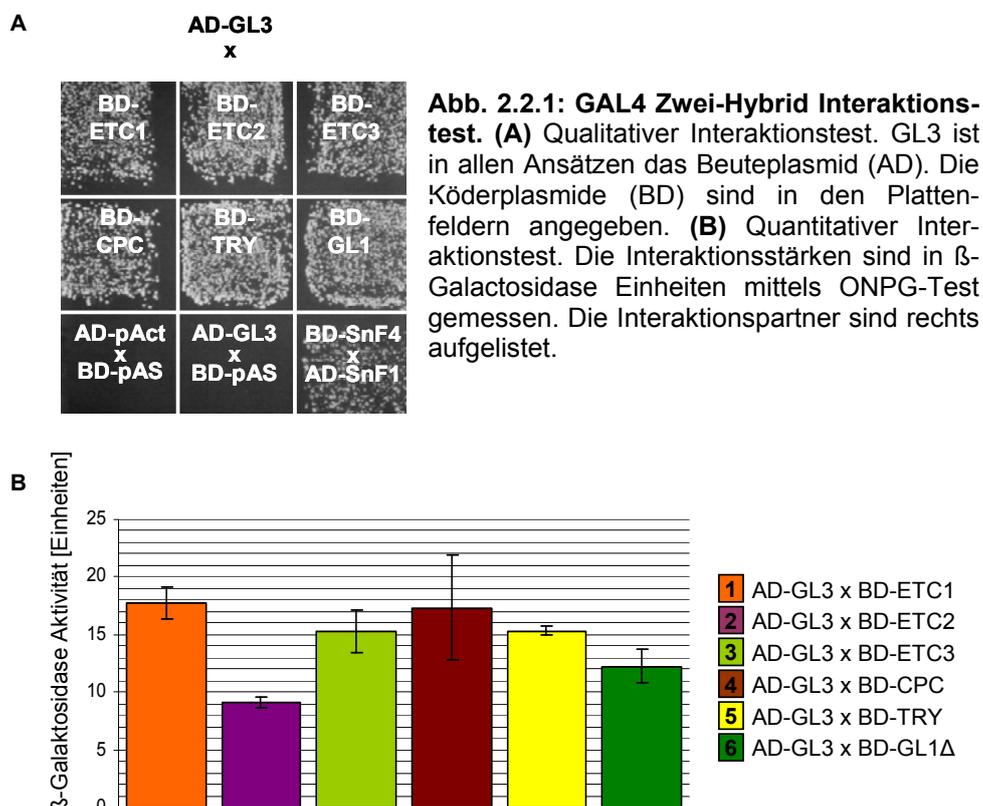
Mit dem GAL4 Zwei-Hybrid System wurden die Interaktionen der MYB Transkriptionsfaktoren mit GL3 vergleichend getestet. CPC, TRY, ETC1, ETC2, ETC3

und GL1 Δ wurden dabei als Köder in den Vektor pAS2.1 kloniert und GL3 in den pAct Vektor als Beuteplasmid. GL1 Δ steht für eine verkürzte GL1 cDNA, C-Terminal sind 27 Aminosäuren deletiert (von Ullrich Hermann hergestellt). Durch die Deletion wird die Autoaktivität von GL1 ausgeschaltet.

Die Interaktionen wurden qualitativ über einen Agar-Plattentest und quantitativ mit ONPG-Tests analysiert.

Im qualitativen Interaktionstest (s. Abb. 2.2.1 A) wurden die Interaktionsplatten mit 5mM 3-Amino-1,2,4-triazol versetzt. Alle Trichom-Inhibitoren und GL1 zeigten eine starke Protein-Protein Interaktion mit GL3, wobei keine Unterschiede in den Interaktionsstärken zu erkennen waren. Der Test wurde zweimal durchgeführt und zeigte jeweils das gleiche Ergebnis.

Um die Interaktionsstärken quantitativ zu messen, wurden ONPG-Tests durchgeführt. Die Messungen der Kompetitionsstärken in β -Galaktosidase Einheiten zeigten (s. Abb. 2.2.1 B), dass ETC2 die schwächste Interaktion mit GL3 eingeht. CPC und ETC1 zeigten die stärksten Interaktionen mit GL3, gefolgt von TRY, ETC3 und GL1, jedoch sind die Unterschiede in den Interaktionsstärken nur geringfügig. Jede Interaktion wurde mit zwei unabhängigen Hefeklonen durchgeführt.



B) GAL4 Drei-Hybrid Wettbewerb

Mit dem GAL4 Drei-Hybrid Test wurde die Konkurrenz zwischen den Inhibitoren und GL1 für die Bindung mit GL3 getestet. Für den Test wurde als Köderplasmid der Vektor pBridge-attR verwendet. GL1 Δ (s. oben) wurde mit der Bindedomäne fusioniert und jeweils ein Inhibitor 3' von dem Methionin-reprimierbaren Promotor kloniert (s. Abb. 2.2.2 A, Klonierung, s. 4.7). Als Beuteplasmid wurde der Vektor pACT verwendet, indem GL3 mit der Aktivierungsdomäne fusioniert wurde.

Durch die Expression eines Inhibitors unter Kontrolle des Methionin-reprimierbaren Promotors sollte der Einfluss auf die Interaktion zwischen GL1 und GL3 untersucht werden. Die Expressionsstärke der Inhibitoren wurde durch die Methionin-Konzentration im Interaktionsmedium gesteuert. Als Kontrolle wurde GL3 als Beuteplasmid im Vektor pAct und GL1 als Köderplasmid in dem Vektor pBridge in den Test mit einbezogen (Nr.6 in Abb. 2.2.2 B/C), um die ungestörte Interaktionsstärke zwischen GL1 und GL3 zu analysieren.

Für den Wettbewerbtest wurden qualitative und quantitative Interaktionsanalysen durchgeführt. Für den qualitativen Test wurden die co-transformierten Hefen nach dem Wachsen auf Selektionsplatten parallel auf verschiedene Interaktionsplatten umplattiert. Die Interaktionsplatten waren mit 30mM 3-Amino-1,2,4-triazol versetzt und beinhalteten unterschiedliche Konzentrationen an Methionin: 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 500 μ M Methionin. Das Wachsen bzw. Nicht-Wachsen der Hefezellen auf den Platten mit unterschiedlichen Methionin-Konzentrationen spiegelte die Wettbewerbsstärke zwischen den einzelnen Inhibitoren und GL1 für die Bindung an GL3 wider. Es wurden auch Ansätze mit geringeren 3-Amino-1,2,4-triazol-Konzentrationen durchgeführt, jedoch konnte erst mit einer Konzentration von 30mM 3-Amino-1,2,4-triazol eine Konkurrenz erzielt werden.

Wie aus dem Vergleich der Interaktionsplatten zu sehen ist (s. Abb. 2.2.2 B), konkurrierten CPC, TRY, ETC1 und ETC3 mit GL1, weil durch ihre Expression bei 0 μ M Methionin die Hefezellen auf der Interaktionsplatte nicht wuchsen (entspricht keiner Interaktion zwischen GL1 und GL3). Die ETC2 Expression zeigte hingegen, dass auf der 0 μ M Methionin Interaktionsplatte die Hefen wachsen konnten. Damit stellt ETC2 keinen Konkurrenten für GL1 dar. Durch steigenden Methionin-Konzentrationen in den Interaktionsplatten wird die Expression der Inhibitoren mehr und mehr reprimiert. Dadurch konnte die Wettbewerbsstärke der einzelnen Inhibitoren unterschieden

werden. Da die geringere Expression von CPC und ETC1 bei 10 μ M und 100 μ M Methionin immer noch zu einem schwächeren Wachstum der Hefen im Vergleich zu der Kontrolle (s. Abb. 2.2.2 B, Nr.6) führte, wohingegen die Expression von TRY und ETC3 weniger Einfluss auf das Wachstum der Hefen nahm, konnten den einzelnen Inhibitoren unterschiedlich starke Kompetitor-Eigenschaften zugeordnet werden. So sind CPC und ETC1 sehr starke Kompetitoren, d.h. sie sind in der Lage, die Interaktion zwischen GL3 und GL1 zu stören. Der nächst starke Kompetitor ist TRY, gefolgt von ETC3 und ETC2. Bei der Interaktionsplatte mit 500 μ M Methionin (s. Abb. 2.2.2 B) ist zu erkennen, dass durch die hohe Methionin-Konzentration der Methionin-sensitive Promotor inaktiv ist. Auf der Interaktionsplatte wurde die Zwei-Hybrid Situation zwischen GL1 und GL3 in allen Ansätzen widergespiegelt. Der qualitative Test wurde zweimal durchgeführt und ergab übereinstimmende Ergebnisse.

Um die Kompetitionsstärke der einzelnen Inhibitoren quantitativ messen zu können, wurden ONPG-Tests durchgeführt. Hierfür wurden von jedem Ansatz vier Hefeklone von den Selektionsplatten gepickt und in verschiedenen Flüssig-Selektionsmedien angezogen. Die Selektionsmedien unterschieden sich in der Methionin-Konzentration (0 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 500 μ M). Die Messungen der Kompetitionsstärke in β -Galaktosidase Einheiten (s. Abb. 2.2.2 C) ergab ein mit dem qualitativen Kompetitionstest übereinstimmendes Ergebnis. ETC1 und CPC zeigten die stärksten Kompetitor-Eigenschaften zu GL1, gefolgt von TRY und ETC3. ETC2 zeigte auch hier keine Competition.

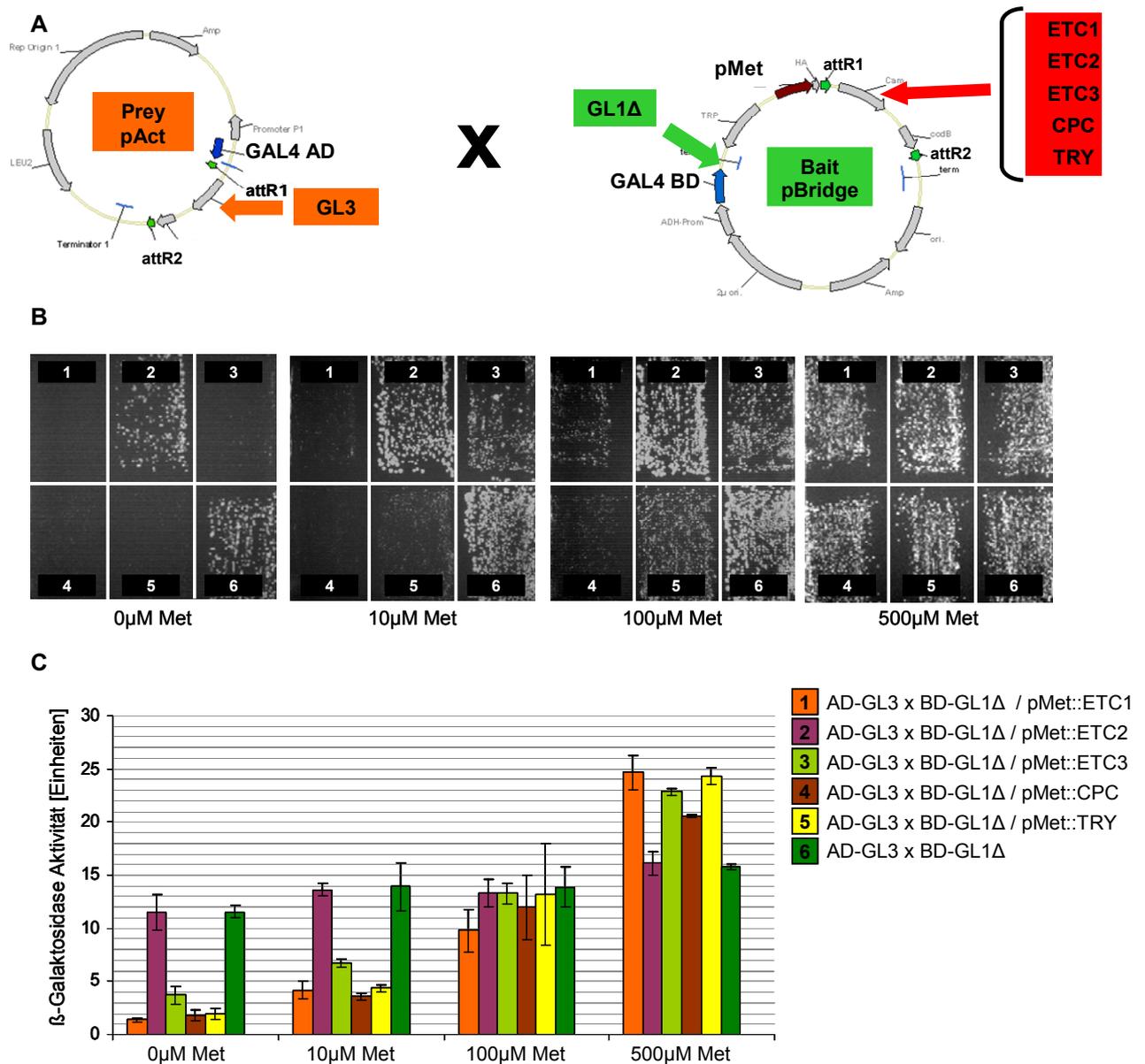


Abb. 2.2.2: GAL4 Drei-Hybrid Wettbewerbstest. (A) Verwendete Hefevektoren für den GAL4 Drei-Hybrid Test. In dem Test wird die Konkurrenz zwischen den exprimierten Inhibitoren und GL1 für die Bindung mit GL3 getestet. Links ist der Beuteplasmid-Vektor pACT gezeigt. Die GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) ist mit GL3 fusioniert. Rechts ist der Köderplasmid-Vektor pBridge gezeigt. Die GAL4 Bindedomäne (BD) ist mit GL1Δ fusioniert. Des Weiteren ist der Methionin-reprimierbare Promotor gezeigt (pMet), von dem 3' jeweils einer der 5 genannten Inhibitoren (roter Kasten) kloniert ist. Die fünf verschiedenen pBridge Vektoren wurden jeweils mit dem GL3 Beuteplasmid in Hefe co-transformiert. Als Kontrolle wurde GL3 als Beuteplasmid mit GL1 als Köderplasmid ohne zusätzlichen Inhibitor in Hefe co-transformiert. **(B)** Hefe Interaktionsplatten mit den sechs co-transformierten Beute- und Köderplasmiden. In **(C)** sind die einzelnen Protein-Paarungen aufgelistet. Jeder Ansatz ist auf allen Interaktionsplatten mit unterschiedlichen Methionin (Met)-Konzentrationen ausplattiert. Durch die Methionin-Konzentration wird die Expression der Inhibitoren gesteuert. Das Wachsen der Hefen auf Interaktionsplatten mit geringer Methionin-Konzentration spiegelt eine schwache Konkurrenz zwischen GL1 und dem Inhibitor wider. **(C)** ONPG-Test als quantitativer Wettbewerbstest. Die Protein-Paarungen sind rechts aufgeführt. Die Konkurrenzstärke zwischen dem Inhibitor und GL1 wurde durch die β-Galaktosidase Aktivität bestimmt. Eine geringe β-Galaktosidase Aktivität stellt eine starke Konkurrenzstärke dar.

2.2.2 Bindungsaffinität versus Mobilität

Aus den Ergebnissen der Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid Interaktionsanalysen (s. 2.2.1) konnte geschlossen werden, dass die Inhibitoren unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu GL3 besitzen. In dem Trapping/Depletion Modell von Bouyer *et al.* (2008) wurde gezeigt, dass GL3 in der Lage ist, TTG1 in den Zellkern von Trichom-Initialzellen zu ziehen. GL3 und TTG1 besitzen eine starke Protein-Protein Interaktion (Payne *et al.*, 2000).

Daraus entwickelte sich die Idee, dass die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Inhibitoren zu GL3 eventuell zu unterschiedlichen Mobilitäts-Eigenschaften der Trichom-Inhibitoren führen könnten. In transienten Expressionsanalysen sollte die Mobilität *per se* und Signalstärken der Inhibitoren getestet werden.

A) Untersuchung der Mobilität und Signalstärke in Abhängigkeit von der Bindungsaffinität

Um die Abhängigkeit der Mobilität von der Bindungsaffinität zu GL3 für die Inhibitoren zu untersuchen, wurden CPC und ETC3, die eine starke bzw. mittelstarke Bindungsaffinität zu GL3 widerspiegeln (s. Abb. 2.2.2), transient in der Epidermis von *Arabidopsis* Rosettenblättern exprimiert.

Hierfür wurde eine GL3 Überexpressionslinie und die *gl3 eg3* Doppelmutante hergestellt. Die Überexpressionslinie wurde durch Transformation des Wildtyps mit dem p35S::GL3 Konstrukt (Klonierung s. 4.7) erzeugt. In der T2 Generation wurde eine Linie etabliert, die pro Blatt im ersten Blattpaar 37% und im zweiten Blattpaar 86% mehr Trichome besitzt als der Wildtyp (s. Tab. 2.2.1, Abb. 2.2.3 B). Die *gl3 eg3* Doppelmutante wurde aus der Kreuzung der beiden Einzelmutanten *gl3* und *eg3* (Salk_118201 und Salk_019114) etabliert, die keine Trichome mehr besitzt (s. Abb. 2.2.3 C).

Die Konstrukte p35S::YFP-ETC3 und p35S::YFP-CPC (Klonierung s. 4.7) wurden mittels Partikel-Beschuss in *gl3 eg3* und p35S::GL3 Blattmaterial geschossen, wobei jedes Konstrukt mit dem YFP-Peroxisom-Marker (p35S::YFP-PTS) co-bombardiert wurde. Da der Peroxisom-Marker (PTS) zellautonom ist, werden so die getroffenen Epidermiszellen markiert. Nach fünfzehn Stunden wurde das beschossene Blattmaterial mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

Bei der Auswertung wurde sich auf zwei Fragestellungen konzentriert. Zum einen, ob es Unterschiede in der Mobilität von YFP-ETC3 und YFP-CPC in der *g/3 eg/3* Doppelmutante und der GL3 Überexpressionslinie gibt. Zum anderen, wenn CPC und ETC3 sowohl in der *g/3 eg/3* Doppelmutante als auch in der GL3 Überexpressionslinie mobil sind, ob es Unterschiede in den Signalstärken der Proteine nach der Wanderung in den Nachbarzellen gibt.

Für die erste Fragestellung wurden von jedem Beschuss fünfzig getroffene Epidermiszellen auf Mobilität bzw. keine Mobilität (Zellautonomie) von CPC bzw. ETC3 analysiert. Als Mobilität wurde definiert, wenn sich das Protein (YFP-CPC, YFP-ETC3) von der beschossenen Zelle in eine direkt angrenzende Nachbarzelle bewegen kann. Die Anzahl von Zellen, bei denen Mobilität vorlag, wurde mit der Gesamtzahl der analysierten Zellen ins Verhältnis gesetzt und so die Mobilität prozentual berechnet (s. Tab. 2.2.2). Für die YFP-ETC3 Fusion wie auch für die YFP-CPC Fusion war klar ersichtlich, dass die Mobilität in der *g/3 eg/3* Doppelmutante höher ist als in der p35S::GL3 Linie, beide Konstrukte zeigten in der *g/3 eg/3* Doppelmutante annähernd die gleiche Mobilität von 74% für ETC3 und 66% für CPC. YFP-ETC3 zeigte jedoch eine höhere Mobilität in der GL3 Überexpressionslinie (39%) als YFP-CPC (22%), was ein Hinweis für eine geringere Bindungsaffinität von ETC3 zu GL3 darstellen könnte. Auffällig war auch, dass die YFP-CPC Mobilität von dem Beschuss in p35S::GL3 (22%) zu der Mobilität in der *g/3 eg/3* Doppelmutante (66%) stärker zunimmt im Vergleich zu YFP-ETC3. Beide Proteine waren stets im Zellkern wie auch im Cytoplasma lokalisiert (s. Abb. 2.2.4).

Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in den Signalstärken von CPC und ETC3 in *g/3 eg/3* und p35S::GL3 gibt, wurden ausschließlich die beschossenen Epidermiszellen analysiert, die Mobilität zeigten (s. Abb. 2.2.4 A/B). Die Signalstärke bezog sich darauf, wie viel YFP-Signal von einer beschossenen Zelle in die Nachbarzelle wandert bzw. wie viel von dem YFP-Signal in der Nachbarzelle ankommt.

Die YFP-Signalstärke im Zellkern einer beschossenen Zelle und im Zellkern einer Nachbarzelle wurden mit der Histogramm Leica Konfokal Software ermittelt (s. Abb. 2.2.3 E/F). Die Signalstärke, die in der benachbarten Zelle im Kern vorlag, wurde mit der Signalstärke in der beschossenen Zelle (n=23) ins Verhältnis gesetzt, was der

prozentualen Signalstärke entspricht, also konkret die Protein-Signalstärke, die vom Zellkern der beschossenen Zelle im Zellkern der Nachbarzelle ankommt.

Aus den erhaltenden Daten war zu erkennen (s. Tab. 2.2.3), dass die YFP-ETC3 Signalstärke in Nachbarzellen (n=23) von beschossenen Zellen bei Verwendung der *gl3 egl3* Doppelmutante mit 44,8% höher lag als in der p35S::GL3 Linie mit 36,2% ($p < 0,01$). Bei CPC ist die YFP-Signalstärke in den Nachbarzellen (n=23) der p35S::GL3 Linie verglichen mit der in *gl3 egl3* drastischer reduziert als bei YFP-ETC3. Der Vergleich von 39,7% in *gl3 egl3* zu 20,7% in der p35S::GL3 Linie ($p < 0,00001$) zeigte, dass CPC an Signalstärke in den Nachbarzellen verliert, wenn GL3 vorhanden ist. Der Vergleich der prozentualen Signalstärken in Nachbarzellen der getroffenen Zellen von YFP-ETC3 und YFP-CPC zeigte in p35S::GL3 eine signifikant höhere Signalstärke in den Zellkernen der Nachbarzellen von YFP-ETC3 ($p < 0,00001$). Die Signalstärke bei YFP-CPC mit 39,7% und YFP-ETC3 mit 44,7% in *gl3 egl3* war hingegen annähernd gleich ($p = 0,13$). Als Kontrolle wurde YFP unter Kontrolle des 35S Promotors in *gl3 egl3* und p35S::GL3 Blattmaterial geschossen. Wie in Tab. 2.2.3 gezeigt, ist die Signalstärke von YFP in *gl3 egl3* mit 21,2% gleichzusetzen mit der von 22,8% in der GL3 Überexpressionslinie (n=15).

Tab. 2.2.1: Trichom-Anzahl in Abhängigkeit von GL3.

	Trichom-Anzahl pro Blatt im 1. Blattpaar	Trichom-Anzahl pro Blatt im 2. Blattpaar
WT (Col)	22,3 ±2,5	52,2 ±8,4
p35S::GL3 / WT	30,5 ±4,2	97,2 ±12,3
<i>gl3 egl3</i>	0	0

Trichom-Anzahl pro Blatt in den ersten beiden Blattpaaren im Columbia (Col) Wildtyp, der Überexpressionslinie von GL3 (p35S::GL3) in Wildtyp (WT) Hintergrund und der Doppelmutante *gl3 egl3* auf dem ersten und zweiten Blattpaar (n=20). Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.



Abb. 2.2.3: Trichom-Phänotyp in Abhängigkeit von GL3. Rosettenblätter, jeweils Blatt drei. (A) WT. (B) GL3 Überexpressionslinie (p35S::GL3) in Wildtyp Hintergrund. (C) *gl3 egl3* Doppelmutante.

Tab. 2.2.2: Mobilität der Inhibitoren in Abhängigkeit von GL3.

	Mobilität in <i>g/3 eg/3</i>	Mobilität in p35S::GL3
p35S::YFP-ETC3	74%	39%
p35S::YFP-CPC	66%	22%

Links die Konstrukte, die mittels Partikel-Beschuss in Rosettenblatt-Epidermiszellen der oben aufgeführten Pflanzenlinien geschossen wurden. Die Prozentzahlen spiegeln die Mobilität der Fusionsproteine in den analysierten Zellen (n=50) der Pflanzenlinien wider, die Mobilität zeigten.

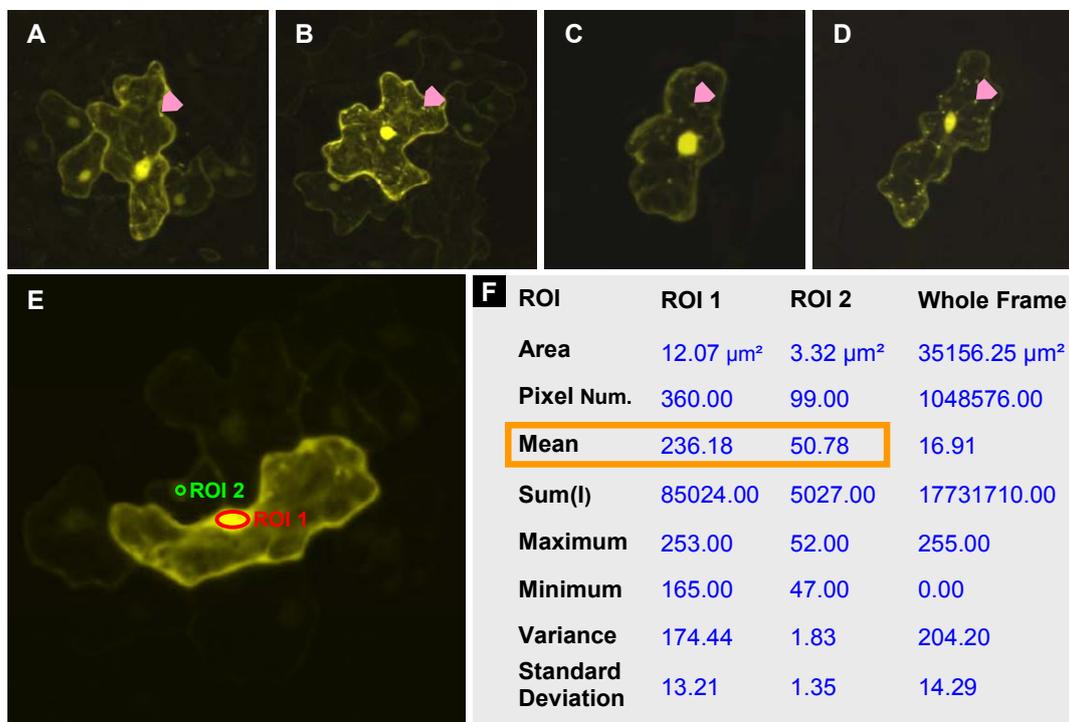


Abb. 2.2.4: Vergleich der Mobilität und Signalstärke in Abhängigkeit von GL3. (A-E) Konfokale Bilder transient exprimierter Konstrukte in Epidermiszellen von Rosettenblättern. Die Konstrukte wurden co-bombardiert mit p35S::YFP-PTS (Peroxisom-Marker, s. rosa Pfeile). (A-B) Mobile YFP-Fusionsproteine. (A) p35S::YFP-ETC3 in *g/3 eg/3* Blattmaterial. (B) p35S::YFP-CPC in *g/3 eg/3* Blattmaterial. (C-D) Beispiele von YFP-Fusionsproteinen, die Zellautonomie zeigen. (C) p35S::YFP-ETC3 in p35S::GL3 Blattmaterial. (D) p35S::YFP-CPC in p35S::GL3 Blattmaterial. (E) p35S::YFP-CPC in *g/3 eg/3* Blattmaterial. Beispiel für die Bestimmung der Signalstärken in den Zellkernen einer beschossenen Zellen (ROI 1) und der Nachbarzelle (ROI 2). (F) Histogramm Software (Leica) zur Bestimmung der YFP-Signalstärken in den mit ROI markierten Bereichen in E.

Tab. 2.2.3: Signalstärken der Inhibitoren in Abhängigkeit von GL3.

	Signalstärke im Zellkern der Nachbarzellen in <i>gl3 egl3</i> [%]	Signalstärke im Zellkern der Nachbarzellen in p35S::GL3 [%]
p35S::YFP-ETC3	44,78 ±13,15	36,22 ±7,06
p35S::YFP-CPC	39,67 ±8,82	20,73 ±4,88
p35S::YFP	21,22 ±4,42	22,89 ±3,66

Links die Konstrukte, die mittels Partikel-Beschuss in die oben aufgeführten Pflanzenlinien geschossen wurden. Die YFP-Signalstärken ergeben sich aus dem Verhältnis der YFP-Signalstärke im Kern einer beschossenen Zelle und der Signalstärke im Kern der Nachbarzelle (n=23) und zeigen, wie viel von der Signalstärke der YFP-Fusionsproteine in den Zellkernen der Nachbarzellen von getroffenen Zellen ankommt. p35S::YFP (n=15) ist die Kontrolle.

B) Zeitliche und zelluläre Untersuchung der Mobilität

Mittels der erhaltenen Ergebnisse über die unterschiedlichen Signalreichweiten von CPC und ETC3 in Abhängigkeit von GL3 sollte versucht werden, die unterschiedlichen Signalreichweiten bzw. Signalstärken auf zellulärer Ebene zu zeigen. Weitergehend sollte getestet werden, ob die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu GL3 in einer unterschiedlich schnellen Wanderung der Inhibitoren in die Nachbarzellen resultiert. Um die Zell-Zell Wanderung der Inhibitoren zeitlich verfolgen zu können, wurde das DRONPA-GFP Fluoreszenzprotein eingesetzt (Habuchi *et al.*, 2005). DRONPA-GFP kann durch optische Anregung zwischen einem fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zustand reversibel und schnell wechseln. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 503nm und die Emission bei einer Wellenlänge von 518nm. Mit einer Wellenlänge von 488nm kann das Protein in einen nicht-fluoreszierenden Zustand versetzt werden, und mit kurzer Bestrahlung bei 405nm wechselt das Protein in den fluoreszierenden Zustand.

Um das DRONPA-GFP zu testen, wurde zu Beginn nur die *CPC* cDNA 5' vor DRONPA-GFP unter Kontrolle des 35S Promotors in den binären Vektor pAMPAT kloniert (Klonierung s. 4.7). Das p35S::CPC-GFP-DRONPA Konstrukt wurde mittels Partikel-Beschuss transient in Zwiebel-Epidermiszellen exprimiert, um die reversible Aktivität des GFPs zu überprüfen. Wie in Abb. 2.2.5 gezeigt, war es möglich, das GFP (s. Abb. 2.2.5 A) durch längere Bestrahlung mit dem 488nm Laser (Laserstärke 80% für 1,5min) zu inaktivieren (s. Abb. 2.2.5 B) und durch kurze Bestrahlung mit dem 405nm Laser (40% Laserstärke für 20s) wieder zu aktivieren (s. Abb. 2.2.5 C). Die transiente

Expression wurde in *Arabidopsis* Epidermiszellen wiederholt. Auch hier war es möglich, das DRONPA-GFP mit dem 488nm Laser auszuschalten und mit dem 405nm Laser wieder einzuschalten (s. Abb. 2.2.5 D-F). Jedoch war das Signal generell schwächer als in Zwiebelzellen, und es konnte keine Mobilität festgestellt werden. Das Konstrukt p35S::CPC-DRONPA-GFP wurde zur Analyse der zeitlichen Verfolgung der Zell-Zell Wanderung in Wildtyp Pflanzen transformiert. In der T1 wurden Linien etabliert, die keine Trichome mehr besitzen, wie es für die Überexpression von *CPC* bereits gezeigt wurde (Wada *et al.*, 1997; Schellmann *et al.*, 2002). In der T3 Generation wurden zehn Linien auf GFP Fluoreszenz hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenz in allen Linien sehr schwach war. Im Cytoplasma konnte lediglich ein sehr schwaches GFP Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt), im Zellkern war kein Signal zu erkennen. Auch durch die Bestrahlung mit dem 405nm Laser konnte das GFP in den Zellen nicht stärker aktiviert werden. Aus diesen Daten ergab sich die These, dass das GFP eventuell durch den UV-Licht Anteil in den Gewächshauslampen ausgebleichen werden könnte. Daher wurden Keimlinge im Dunkeln angezogen, wo sich zeigte, dass die CPC-DRONPA-GFP Fluoreszenz in den Kotyledonen gut zu erkennen war (s. Abb. 2.2.5 G). Jedoch ist es bislang noch nicht gelungen, die Wanderung von CPC zeitlich aufgelöst in Pflanzen zu untersuchen.

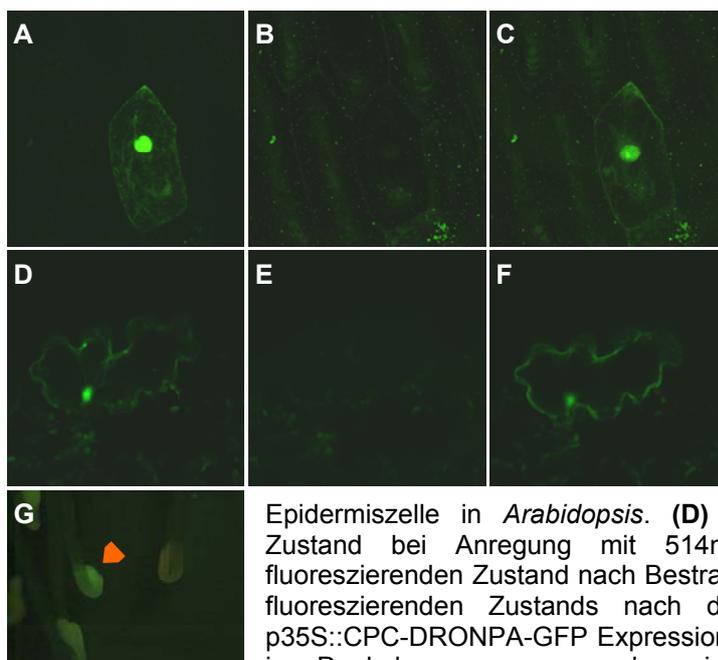


Abb. 2.2.5: Reversible CPC-DRONPA-GFP Fluoreszenz. Gezeigt ist die Expression von p35S::CPC-GFP-DRONPA. **(A-C)** Gleicher Ausschnitt transienter Expression von p35S::CPC-DRONPA-GFP in einer Zwiebelepidermiszelle. **(A)** CPC-DRONPA-GFP im fluoreszierenden Zustand mit 514nm Anregung. **(B)** CPC-DRONPA-GFP im nicht-fluoreszierenden Zustand nach Bestrahlung mit 488nm Laser. **(C)** Aktivierung des fluoreszierenden Zustands nach der Bestrahlung mit 405nm Laser. **(D-F)** Gleicher Ausschnitt transienter Expression von p35S::CPC-DRONPA-GFP in einer Rosettenblatt-Epidermiszelle in *Arabidopsis*. **(D)** CPC-DRONPA-GFP im fluoreszierenden Zustand bei Anregung mit 514nm. **(E)** CPC-DRONPA-GFP im nicht-fluoreszierenden Zustand nach Bestrahlung mit 488nm Laser. **(F)** Aktivierung des fluoreszierenden Zustands nach der Bestrahlung mit 405nm Laser. **(G)** p35S::CPC-DRONPA-GFP Expression in transformierten Wildtyp Keimlingen, die im Dunkel angezogen worden sind. Oranger Pfeil markiert Pflanze, die Fluoreszenz zeigt.

2.2.3 *ETC3* Expression unter Kontrolle des *TRY* und *CPC* Promotors

Um zu analysieren, ob die Promotoren der Inhibitoren die Expression der Gene unterschiedlich regulieren, wurden Promotor-Austausch Experimente durchgeführt.

In Abschnitt 2.1 wurde bereits gezeigt, dass die *etc3* Mutante mit der *ETC3* cDNA unter Kontrolle des endogenen Promotors gerettet werden kann. Um zu analysieren, ob die *etc3* Mutante auch komplementiert werden kann, wenn *ETC3* unter Kontrolle des *TRY* und *CPC* Promotors exprimiert wird, wurden die Konstrukte pTRY::*ETC3* und pCPC::*ETC3* (Klonierung s. 4.7) in *etc3* und *cpc try etc3* Mutanten transformiert. Die Transformation von p*ETC3*::*ETC3* in die beiden Hintergründe diente jeweils als Kontrolle.

Bei der Transformation in *etc3* wurde in der T1 Generation die Trichom-Dichte und die Trichom-Verteilung pro Blatt auf den ersten beiden Blattpaaren von vierzig selektierten Pflanzen bestimmt (s. Tab. 2.2.4). Mit den Konstrukten pCPC::*ETC3* und pTRY::*ETC3* konnte eine Rettung der *etc3* Pflanzen im gleichen Maße erzielt werden wie mit dem endogenen Promotor.

Bei der Transformation in die *cpc try etc3* Tripelmutante wurde in der T1 Generation eine phänotypische Charakterisierung durchgeführt (s. Abb. 2.2.6). Mit dem p*ETC3*::*ETC3* Konstrukt konnte die Tripelmutante zum Phänotyp der *cpc try* Doppelmutante gerettet werden (s. Abb. 2.2.6 B). Die *ETC3* Expression unter Kontrolle des *CPC* bzw. *TRY* Promotors zeigte hingegen eine Vielfalt von Phänotypen. Es gab Pflanzen, die zum *cpc try* Phänotyp gerettet wurden, aber auch Pflanzen, die aberrante Phänotypen zeigten, welche nie zuvor mit dem p*ETC3*::*ETC3* Konstrukt erzielt wurden. Generell konnte man einen Unterschied zwischen der pTRY::*ETC3* und pCPC::*ETC3* Expression erkennen. Bei pTRY::*ETC3* sind Kreise bzw. Ovale von Trichom-Nestern zu sehen, die in der Mitte einzelne Trichome aufweisen (s. Abb. 2.2.6 C). Bei pCPC::*ETC3* hingegen finden sich nur vereinzelt Trichom-Nester auf den Blättern, die kleiner sind als in der *cpc try* Doppelmutante. Die einzelnen Trichome sind unregelmäßig über das Blatt verteilt (s. Abb. 2.2.6 D). Manchmal treten Trichome in einer Gruppe auf, wobei es sich hierbei nicht um Trichom-Nester handelt, da sich zwischen den Trichomen ein bis zwei epidermale Zellen befinden (s. Abb. 2.2.6.E).

Tab. 2.2.4: Trichom-Anzahl in Abhängigkeit von *ETC3*.

Genotyp	Trichom-Anzahl pro Blatt im 1. Blattpaar	Trichom-Anzahl pro Blatt im 2. Blattpaar
WT	16,6 ± 2,2	45,5 ± 7,2
<i>etc3</i>	25,6 ± 2,9	71,0 ± 10,4
pETC3:: <i>ETC3</i> / <i>etc3</i>	11,5 ± 4,0	44,9 ± 14,6
pTRY:: <i>ETC3</i> / <i>etc3</i>	12,5 ± 3,1	48,2 ± 13,7
pCPC:: <i>ETC3</i> / <i>etc3</i>	11,4 ± 2,8	46,7 ± 14,0

Trichom-Anzahl pro Blatt auf dem ersten und zweiten Blattpaar im Wildtyp, *etc3* und von transformierten Pflanzen, bei denen *ETC3* unter Kontrolle der angeführten Promotoren exprimiert wird. *ETC3* Konstrukte sind in *etc3* Pflanzen transformiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n=40).



Abb. 2.2.6: Rettung der *cpc try etc3* Mutante. Ausschnitte von Rosettenblättern. **(A)** *cpc try etc3*. **(B-E)** Transgene Pflanzen der T1 Generation. **(B)** pETC3::*ETC3* Expression in *cpc try etc3* Hintergrund. **(C)** pTRY::*ETC3* Expression in *cpc try etc3* Hintergrund. **(D-E)** pCPC::*ETC3* Expression in *cpc try etc3* Hintergrund. Orange Pfeile markieren einzelne Trichome. Lila Pfeile markieren Gruppen von Trichomen. **(E)** Gruppe von Trichomen.

2.3 CPC und TRY Mutagenese

In dem Aktivator-Inhibitor Modell von Meinhardt and Gierer (1974; 2000) ist eine Voraussetzung, dass die Inhibitoren mobil sind, um ein geordnetes Trichom-Muster auf Rosettenblättern zu gewährleisten. In transienten Expressionsanalysen wurde die Mobilität von CPC und TRY gezeigt (Kurata *et al.*, 2005; Digiuni *et al.*, 2008). Das Aktivator-Inhibitor Modell definiert zusätzlich, dass die Inhibitoren sich schneller als die Aktivatoren (wenn diese mobil sind) bewegen müssen. Noch nicht geklärt ist, warum die Aktivität der Inhibitoren erst in den Nachbarzellen wirksam ist und keinen Einfluss auf die Trichom-Initialzellen hat, wo die Inhibitoren exprimiert werden.

Für die Aktivität von Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren sind häufig posttranslationale Modifikationen notwendig. Die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Bereich der DNA-Bindedomäne durch spezifische Proteinkinasen stellt einen weit verbreiteten Mechanismus zur Regulation der Protein-Aktivität dar (Meek and Street, 1992; Hunter and Karin, 1992). Des Weiteren kann durch die Phosphorylierung von Proteinen der Transport durch Plasmodesmata reguliert werden, was z.B. für virale Movement Protein (MP) in Pflanzen gezeigt wurde (Waigmann *et al.*, 2000).

Die Phosphorylierung von Proteinen erfolgt überwiegend an Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) Aminosäureresten. Bei genauerer Betrachtung des Protein-Sequenzvergleichs der Inhibitoren CPC, TRY, ETC1, ETC2 und ETC3 fiel ein übereinstimmender Aminosäureabschnitt in allen fünf Inhibitoren auf. Im N-terminalen Bereich vor der MYB-Domäne an den Positionen 30, 34 und 35 besitzen alle fünf Proteine Serin-Reste, die putative Phosphorylierungsstellen darstellen (s. Abb. 2.3.1 A).

Die Idee war nun zu überprüfen, ob die Aktivität der Trichom-Inhibitoren durch Phosphorylierung reguliert wird, wobei die Modifikation erst bei der Passage durch die Plasmodesmata oder in den Nachbarzellen von Trichomzellen erfolgen sollte, wo sie durch laterale Inhibition die Zellen an der Entwicklung zu Trichomzellen hindern.

Um diese These zu überprüfen, wurde die *CPC* und *TRY* cDNA mutagenisiert. Alle drei Serine wurden in beiden cDNAs durch Alanin (*CPC-3xAla*) bzw. Glutamat (*CPC-3xGlu*) ausgetauscht, in einem dritten Ansatz wurden die drei Serine deletiert (*CPC-3xDel*, Klonierung s. 4.7). Die Aminosäure Alanin kann nicht phosphoryliert werden, und die Aminosäure Glutamat stellt eine Mimikry für eine Phosphorylierung dar (Maciejewski *et al.*, 1995; Waigmann *et al.*, 2000). Die mutagenisierten *CPC* und *TRY* cDNAs wurden

unter die Kontrolle des Rubisco Promotors (pRbc) und zusätzlich unter die Kontrolle der eigenen Promotoren kloniert (Klonierung s. 4.7). Die nicht mutierten *CPC* und *TRY* cDNAs wurden als Kontrollen mit einbezogen. Die Konstrukte mit Rubisco Promotor (pRbc::CPC, pRbc::CPC-3xAla, pRbc::CPC-3xGlu, pRbc::CPC-3xDel, pRbc::TRY, pRbc::TRY-3xAla, pRbc::TRY-3xGlu, pRbc::TRY-3xDel) wurden in Columbia Wildtyp Pflanzen transformiert. Die Konstrukte mit den eigenen Promotoren (pCPC::CPC, pCPC::CPC-3xAla, pCPC::CPC-3xGlu, pCPC::CPC-3xDel, pTRY::TRY, pTRY::TRY-3xAla, pTRY::TRY-3xGlu, pTRY::TRY-3xDel) wurden in die *cpc try* Doppelmutante transformiert.

In der T1 Generation wurden die Transformanden im Wildtyp Columbia Hintergrund (n=60) auf Trichom-Dichte und -Verteilung pro Blatt in den ersten beiden Blattpaaren untersucht (s. Tab. 2.3.1). Die Rubisco Promotor-Konstrukte zeigten alle eine geringere Trichom-Dichte als der Wildtyp. Dabei war die Trichom-Dichte in den Pflanzen mit allen mutagenisierten cDNAs gleichzusetzen mit der Trichom-Dichte in Pflanzen, welche die nicht mutierten cDNA Konstrukte (pRbc::CPC und pRbc::TRY) exprimierten. Die geringeren Trichom-Dichten zeigen, dass CPC bzw. TRY in der Lage sind, von der L2 in die L1 zu wandern und die Trichom-Entwicklung in der L1 hemmen zu können.

Bei der Expression der mutierten *TRY* und *CPC* cDNA unter Kontrolle der endogenen Promotoren wurde in der T1 Generation die *cpc try* Doppelmutante zum Trichom-Phänotyp der *try* Mutante bis hin zum Muster von Wildtyp Pflanzen gerettet, wie es auch bei der Expression der nicht mutierten *CPC* und *TRY* cDNA (s. Abb. 2.3.1 B-D) zu beobachten war.

Die Trichom-Dichte und -Verteilung wurde nicht weiter betrachtet, da die Ergebnisse nicht auf eine Phosphorylierung der Inhibitoren hindeuten. Man hätte bei einer für die Funktion notwendigen Phosphorylierung keine Rettung der *cpc try* Mutante mit den 3xAlaninen bzw. 3xDeletionen in den cDNAs erwartet. Weiterhin zeigten die Expressionen mit den mutierten cDNAs unter Kontrolle des Rubisco Promotors, dass sie das gleiche Potential besitzen, von der L2 Schicht in die L1 Schicht zu wandern, wie das wildtypische TRY und CPC und dort die Funktion als Trichom-Inhibitoren ausüben können, was sich in der geringeren Trichom-Dichte widerspiegelte.

Tab. 2.3.1: CPC und TRY Mutagenese.

	Trichom-Anzahl pro Blatt im 1. Blattpaar	Trichom-Anzahl pro Blatt im 2. Blattpaar
pRbc::CPC / WT	4,05 ± 3,85	14,88 ± 9,27
pRbc::CPC-3xDe / WT	5,48 ± 2,33	16,55 ± 8,37
pRbc::CPC-3xAla / WT	4,00 ± 3,17	14,98 ± 8,8
pRbc::CPC-3xGlu / WT	6,15 ± 2,96	14,35 ± 5,52
pRbc::TRY / WT	6,54 ± 3,33	16,93 ± 9,02
pRbc::TRY-3xDel / WT	7,21 ± 2,75	17,96 ± 7,04
pRbc::TRY-3xAla / WT	5,81 ± 2,40	16,20 ± 6,59
pRbc::TRY-3xGlu / WT	8,38 ± 3,6	22,16 ± 9,73

Trichom-Anzahl in Pflanzen mit den links aufgeführten Konstrukten, die in Wildtyp Columbia Hintergrund transformiert sind. Die Zahlen geben die Mittelwerte ± Standardabweichung (n=50) pro Blatt im ersten und zweiten Blattpaar an.

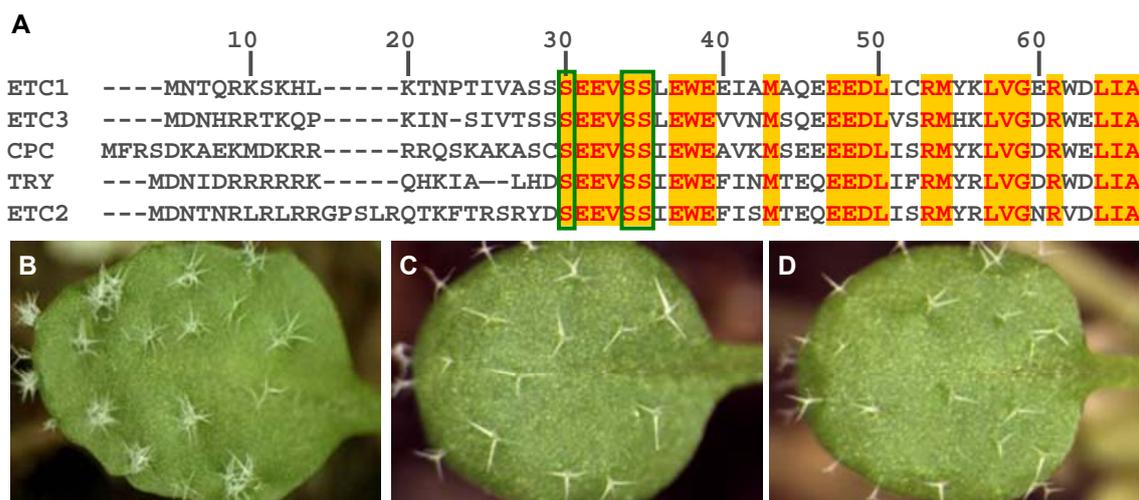


Abb.2.3.1: CPC und TRY Mutagenese. (A) Ausschnitt aus dem Proteinsequenzvergleich der links angeführten Inhibitoren. In grün sind die Serine (S) markiert, die mutagenisiert wurden. (B) *cpc try* Doppelmutante. (C) pTRY::CPC Expression in *cpc try* Doppelmutante. (D) pCPC::TRY Expression in *cpc try* Doppelmutante.

2.4 *In vivo* Verfolgung der Trichom-Musterbildung

Die Trichom-Entwicklung auf Rosettenblättern in *Arabidopsis thaliana* wird häufig als Modellsystem für die Festlegung von Zellschicksalen herangezogen. Ein Ziel der Entwicklungsbiologie ist es, die Entstehung des Zellmusters von Trichomen zu verstehen und zu rekonstruieren. Die räumliche Anordnung von Trichomen auf Rosettenblättern wurde bislang jedoch hauptsächlich durch zwei-dimensionale (x-, y-Achse) Aufnahmen analysiert, was für eine quantitative Auswertung der Trichom-Musterbildung in der drei-dimensionalen Struktur der Rosettenblätter nicht ausreicht. Lee *et al.* (2006) und Kaminuma *et al.* (2008) stellten drei-dimensionale Aufnahmeverfahren vor, die optische Projektionstomographie und die Mikro Röntgenstrahl-Computertomographie, mit denen man die Trichom-Musterbildung quantitativ auswerten kann. Bei den Techniken kann die Trichom-Musterbildung entweder zu einem Entwicklungsstadium zellulär betrachtet werden, oder die Trichom-Entwicklung wird auf Rosettenblättern eines Pflanzenkeimlings verfolgt. Das Trichom-Muster wird durch den Bezug der Trichom-Abstände zueinander und im Vergleich zur Blattfläche vermessen, wodurch die Trichom-Musterbildung *in silico* rekonstruiert werden kann. Bei beiden Analysetechniken bleiben jedoch noch Fragen offen. Wenn die Auswertung nur zu einem Zeitpunkt möglich ist, kann man z.B. nicht die Positionen in der Initiationszone bestimmen, wo neue Trichomzellen während der Entwicklung entstehen, und welchen Bezug sie zu bereits existierenden Trichomen haben. Bei der Verfolgung der Trichom-Musterbildung in Keimlingen können die entscheidenden Musterbildungsprozesse im basalen Blattbereich nicht aufgelöst werden.

Die Motivation bestand nun darin, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, die Trichom-Entwicklung auf einem Blatt mit der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie *in vivo* über eine längere Zeit von der Initiationszone akropetal bis zum adulten Stadium zu verfolgen, um vier-dimensionale (x-, y-, z-Achse und Zeit) quantitative Daten zu erhalten. Dabei sollte die Trichom-Musterbildung im Wildtyp mit der Musterbildung in Trichom-Mutanten verglichen werden. Die quantitative Auswertung der Daten sollte durch eine Kollaboration mit Bioinformatiker-Gruppen für biologische Systemanalyse in Freiburg (AG Fleck, AG Ronneberger) erfolgen.

Für die Verfolgung der Trichom-Musterbildung wurde eine Trichom-Markerlinie im *Landsberg erecta* Wildtyp Hintergrund eingesetzt, bei der GFP mit der Endoplasmatischen Reticulum Signalsequenz (ER) fusioniert ist, wodurch GFP

zellautonom bleibt, und unter Kontrolle des *GLABRA2* Promotors (pGL2) exprimiert wird (pGL2::GFP-ER, von Jaideep Mathur hergestellt). *GLABRA2* wird bereits in jungen Trichomzellen exprimiert, die sich morphologisch noch nicht von epidermalen Zellen unterscheiden lassen. Die Expression hält bis zum adulten Stadium an. Um die Entwicklung auf einem Blatt über mehrere Tage verfolgen zu können, wurden junge Blätter mit Petiolen von Keimlingen präpariert und mit der Petiole in 1% MS Agar eingebettet. Für die Aufnahmen mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop dienten der GFP Kanal (grün) zur Detektion der Trichomzellen und die Autofluoreszenz von Chlorophyll zur Erkennung der Blattfläche (rot). Die Blätter wurden in einem Aufnahmestapel in der x-, y- und z-Ebene (Serie genannt) gescannt, woraus sich dreidimensionale Bilder durch die Voxel-Größen herstellen lassen. Um möglichst viele Trichom-Entwicklungsstadien analysieren zu können, wurden ca. 200 μ M große Blätter (jeweils Blatt drei) verwendet, bei denen erst drei bis sieben Trichomzellen zu erkennen waren (s. Abb. 2.4.1).

Als erstes wurde getestet, ob die präparierten Blätter unter diesen Bedingungen über eine längere Zeit lebensfähig sind. Es wurde eine Serie (40x Wasserobjektiv, ohne Deckglas) direkt nach der Präparation durchgeführt, 48 Stunden später wurde das Blatt nochmals analysiert. Wie in Abb. 2.4.1 gezeigt, war die Blatt- und Trichom-Entwicklung in dieser Zeitspanne weiter fortgeschritten.

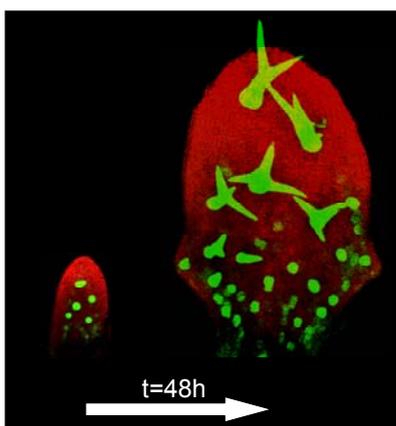


Abb. 2.4.1: Verfolgung der Blatt- und Trichom-Entwicklung. Konfokale Bilder von einem Wildtyp Rosettenblatt zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit pGL2::GFP-ER Expression. Trichome sind in grün markiert. In rot die Autofluoreszenz von Chlorophyll. Links ist das Blatt nach der Präparation, rechts das gleiche Blatt nach 48h gezeigt.

Um einzelne Blätter zu unterschiedlichen Zeitpunkten über einen Zeitraum von drei Tagen mit der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie analysieren zu können, wurden

die Aufnahmen mit einem 40x Trockenobjektiv oder mit einem 40x Wasserobjektiv durchgeführt (immer ohne Deckglas). Bei der Verwendung des Trockenobjektivs konnte die Verfolgung der Trichom-Entwicklung über mehrere Zeitpunkte verfolgt werden, da die Blätter weniger Stress ausgesetzt waren. Der Kontakt der Blätter mit Wasser zeigte, dass die Entwicklung der Blätter und Trichome gehemmt wird, weswegen die Blätter nach jeder Aufnahme vorsichtig trockengetupft werden mussten. Die Auflösung mit dem Trockenobjektiv ist schlechter als bei der Verwendung des Wasserobjektivs, was die quantitative Auswertung erschwert.

Bei älteren Entwicklungsstadien, wo das Blatt nicht mehr mit einer Serie erfasst werden konnte, wurde das Blatt in Quadranten aufgeteilt und jeweils überlappend gescannt.

Es wurden zehn Zeit-Serien erstellt, die die Entwicklung von Trichomen ab der Initiationszone akropetal bis zur Blattspitze in einem Zeitfenster von ca. 70 Stunden zeigen (s. Abb. 2.4.2 A, zwei-dimensionale Überlagerung der einzelnen Zeit-Serien, mit Adobe Photoshop6.0 zusammengestellt).

Aus der zeitlichen Verfolgung der Trichom-Entwicklung war zu sehen, dass in der Initiationszone zu frühen Zeitstadien Nester von Zellen eine *GL2* Expression zeigen. Bei der fortlaufenden Entwicklung zeigten einzelne Zellen in einem Nest eine weiter zunehmende *GL2* Expression, aus denen sich später Trichomzellen entwickeln. Die restlichen Zellen stellen die *GL2* Expression ein und entwickeln sich zu Nicht-Trichomzellen (s. Abb.2.4.2 B). Es war daher von Interesse, die Verfolgung der Trichom-Musterbildung zellulär aufzulösen, um bestimmen zu können, welche Zellen aus einem Nest von *GL2* exprimierenden Zellen sich zu Trichomzellen entwickeln. Hierfür wurden wieder junge Blätter präpariert und mit der Petiole in 1% MS Agar eingebettet. Vor jeder Zeitserie wurden die Zellwände mit Propidiumiodid angefärbt. Da durch die Anfärbungen die Blätter extremen Bedingungen ausgesetzt waren, konnte die Trichom-Musterbildung nur bei drei Blättern (jeweils Blatt fünf) zeitlich verfolgt werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Trichom-Musterbildung im Wildtyp mit der Trichom-Musterbildung in Trichom-Mutanten vergleichen zu können, musste das GFP-ER Fusionskonstrukt neu hergestellt werden und unter die Kontrolle des *GL2* Promotors in den binären Vektor pAMPAT kloniert werden (p*GL2*::GFP-ER, Klonierung s. Abschnitt 4.7). Das Konstrukt wurde in die *cpc*, *try* Einzelmutanten und in die *cpc try* Doppelmutante transformiert (von Martina Pesch durchgeführt). Die Mutanten besitzen eine erhöhte Trichom-Dichte und/oder

Nester von Trichomen (Schellmann *et al.*, 2002). In der T2 Generation wurden von den Transformanten Linien etabliert, die eine GL2 Expression zeigten. Von der *cpc* Mutante mit pGL2::GFP-ER Expression konnte bislang die Trichom-Entwicklung auf drei Blättern (jeweils Blatt drei) verfolgt werden, wobei Chlorophyll zur Erkennung der Blattfläche diente (s. Abb. 2.4.2 C, zwei-dimensionale Überlagerung der einzelnen Zeit-Serien, mit Adobe Photoshop6.0 zusammengestellt).

Alle drei-dimensionalen Zeit-Serien der *in vivo* Trichom-Entwicklung wurden zur quantitativen Auswertung den Informatikern in Freiburg (AG Fleck, AG Ronneberger) übergeben. Die Auswertung ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

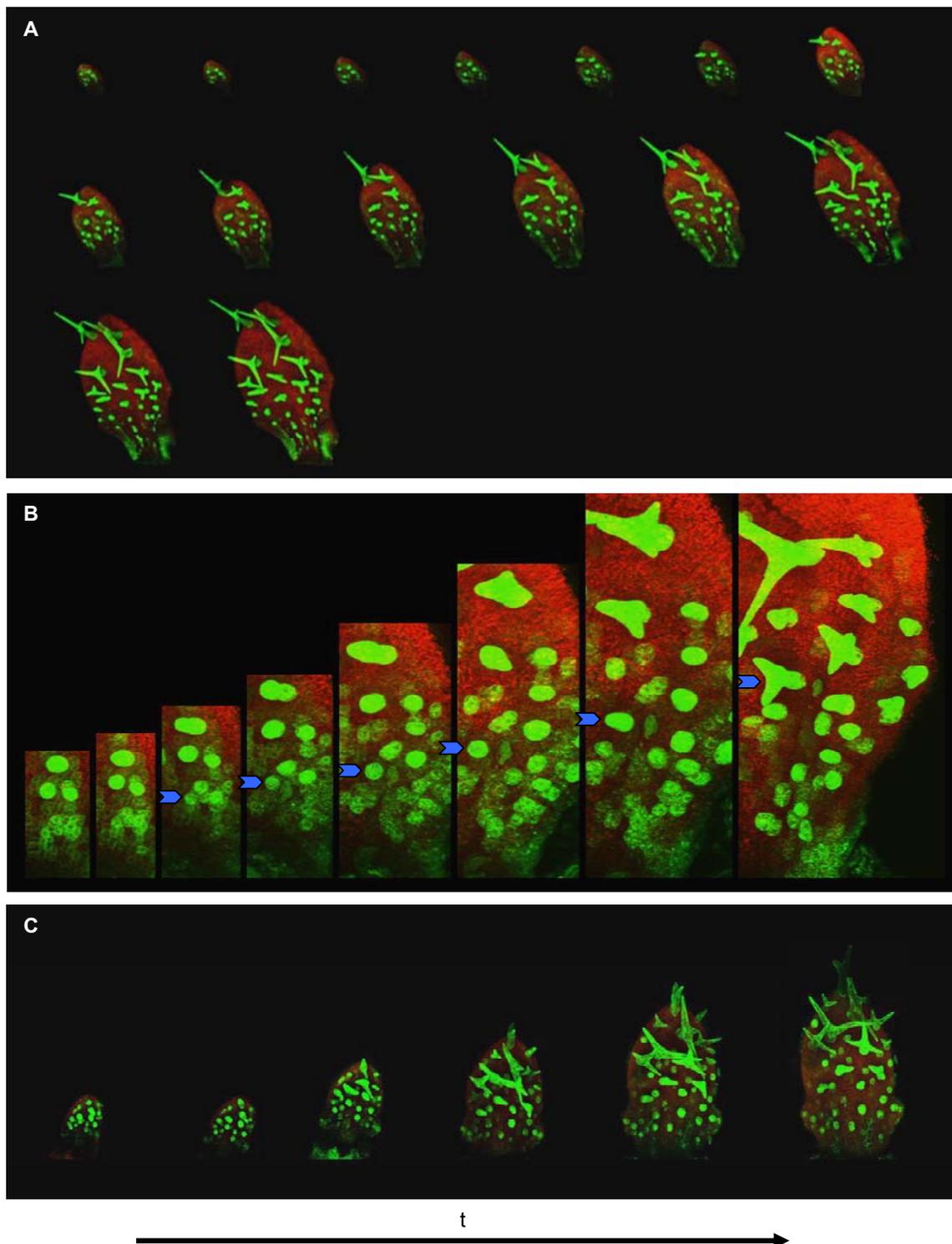


Abb. 2.4.2: Trichom-Entwicklung *in vivo*. Konfokale Bilder von Rosettenblättern. Trichome sind mit dem Trichom-spezifischen Fluoreszenzmarker pGL2::GFP-ER in grün markiert. In rot die Autofluoreszenz von Chlorophyll. Bilder zeigen einzelne Entwicklungsstadien der Trichom-Entwicklung über einen definierten Zeitraum (t). **(A)** pGL2::GFP-ER Expression im WT. Gezeigt ist die Trichom-Entwicklung auf einem Blatt in unterschiedlichen Entwicklungsstadien über einen Zeitraum von 72,5h. **(B)** pGL2::GFP-ER Expression im WT. Ausschnitte aus basalem Blattbereich. Die Ausschnitte zeigen einen Blattbereich zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien über einen Zeitraum von 42h. Die blauen Pfeile markieren die Position einer Trichomzelle zu den einzelnen Entwicklungsstadien. **(C)** pGL2::GFP-ER Expression in *cpc*. Gezeigt ist die Trichom-Entwicklung auf einem Blatt zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien über einen Zeitraum von 60h.

2.5 Zell-Ablation: Untersuchung der *de novo* Trichom-Musterbildung

Die Trichom-Entwicklung auf Rosettenblättern wird als *de novo* Musterbildungsprozess postuliert (Larkin *et al.*, 1996; Schnittger *et al.*, 1999; Schellmann *et al.*, 2002; Pesch and Hülskamp, 2004; Digiuni *et al.*, 2008), wonach alle epidermalen Zellen in jungen Stadien das gleiche Entwicklungspotential besitzen, sich zu Trichomzellen zu entwickeln. Larkin *et al.* (1996) zeigten, dass die Trichom-Entwicklung nicht durch Zellabstammung erklärt werden kann, weiterhin sind keine positionsabhängigen Merkmale im Blatt bekannt, die das Trichom Zellschicksal in der Epidermis festlegen könnten. Ein direkter Nachweis für eine *de novo* Trichom-Musterbildung wurde jedoch noch nicht gezeigt.

Bei der Verfolgung der Trichom-Entwicklung (s. 2.4) wurde die Trichom-Markerlinie pGL2::GFP-ER vorgestellt, womit man die Trichom-Entwicklung auf Rosettenblättern verfolgen kann. Es wurde beobachtet, dass in der Initiationszone Nester oder Reihen von Zellen eine GL2 Expression zeigen und mit der Zeit einzelne Zellen aus diesen Gruppen eine stärkere GL2 Expression entwickeln, wobei sich diese Zellen morphologisch noch nicht von den restlichen Zellen unterscheiden. Diese Zellen entwickelten sich zu Trichom-Zellen und die restlichen Zellen nahmen das epidermale Zellschicksal an (s. Abb. 2.4.2 B).

Aus dieser Beobachtung ergab sich der Versuch, durch Zell-Ablation in der pGL2::GFP-ER Markerlinie einen direkten Nachweis für eine *de novo* Musterbildung zu zeigen. Es sollten diejenigen Zellen in der Trichom-Initiationszone ablatiert werden, welche in einem Nest oder in einer Reihe von Zellen eine erkennbar stärkere GL2 Expression zeigten, die so genannten Trichom-Initialzellen. Theoretisch sollte durch die Ablation einer Trichom-Initialzelle eine der Nachbarzellen in der Lage sein, sich zur Trichomzelle zu entwickeln. Bei einer *de novo* Trichom-Musterbildung sollte durch die Ablation einer Trichom-Initialzelle die laterale Inhibition aufgehoben werden, wodurch Nachbarzellen das Trichom-Schicksal annehmen können sollten.

Die Analysen wurden mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop durchgeführt, wobei die Trichom-Markerlinie (pGL2::GFP-ER) in *cpc* Hintergrund verwendet wurde, da sich in *cpc* mehr Trichomzellen auf den Rosettenblättern entwickeln, was die Auswahl an Zellen vergrößert, die man ablatieren kann. Einzelne Blätter der Markerlinie wurden präpariert und in 1%MS Agar eingebettet. Zu Beginn wurde ein Übersichtsbild

erstellt. Anschließend wurde eine geeignete Trichom-Initialzelle ablatiert und die Entwicklung der Nachbarzellen verfolgt. Um festzustellen, dass die Zellen ablatiert worden sind, wurden die Blätter mit Propidiumiodid angefärbt, wodurch Zellwände und tote Zellen markiert werden.

Zu Beginn wurden die Ablationen mechanisch mit der Mikroinjektionsanlage durchgeführt, die mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop gekoppelt ist. Einzelne fluoreszierende Trichom-Initialen der Markerlinie wurden mit der Nadel angestochen. Die Blätter wurden anschließend bis zu zwei Tage weiter beobachtet. Mittels Propidiumiodid-Färbung konnte festgestellt werden, dass durch die Ablation mit Hilfe einer Nadel das umliegende Gewebe zu stark beschädigt wurde. Sowohl die angestochene Zelle als auch das umliegende Gewebe wurde abgetötet (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden Laser-Ablationen durchgeführt. Für die Laser-Ablationen wurde hier der Multi-Photon Laser eingesetzt, bei dem die Anregungswellenlänge in etwa der doppelten normalen Anregungswellenlänge entspricht. So kann beispielsweise Infrarotes Licht eingesetzt werden, um GFP anzuregen. Der Vorteil gegenüber dem normalen (Ein-Photon) Laser ist, dass durch das längerwellige Licht die Streuung geringer ist und die Fluoreszenz lediglich in der Fokusebene angeregt wird, wodurch die Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene nicht ausgebleicht werden.

Die Trichom-Initialzellen wurden mit Licht der Wellenlängen 710nm und 820nm mit unterschiedlicher Intensität und Dauer beschossen. Die Wellenlänge von 710nm entspricht der zweifachen Wellenlänge von UV-Licht, mit der versucht wurde, die DNA in den beschossenen Zellen zu zerstören. Jedoch konnten bei dieser Durchführung in 22 Versuchen die beschossenen Zellen nicht ablatiert werden, ohne die Nachbarzellen zu beschädigen (Daten nicht gezeigt).

Mit der maximalen Wellenlänge des Multi-Photon Lasers von 820nm erhält man annähernd die zweifache Wellenlänge für die Anregung von GFP (Anregung bei 488nm). Mit diesem Versuchsansatz sollten die Zellen überhitzt werden. Für die Ablation wurden die Zellen mit 570mW und 10ms zwei bis fünf mal beschossen.

Nach den Ablationen wurden die Blätter über zwei Tage hinweg analysiert. In sechs Ablationen von insgesamt fünfzehn konnte man nach 10 Stunden mit einer Propidiumiodid-Färbung eine erfolgreiche Ablation der Zellen beobachten, wobei die

umliegenden Zellen intakt waren und einige der Zellen bereits eine verstärkte *GL2* Expression zeigten. Nach insgesamt 36 Stunden konnte bei den sechs Ablationen beobachtet werden, wie sich in drei Fällen eine direkte Nachbarzelle zu einer Trichomzelle entwickelte (s. Abb. 2.5.1 A/C/D). In den restlichen drei Fällen war eine Zellen weiter von der ablatierten Zelle entfernt eine neue Trichomzelle entstanden, was heißt, dass zwischen der ablatierten und der neu entwickelten Trichomzelle lediglich eine epidermale Zelle liegt (s. Abb. 2.5.1 A/B/E).

Bei der Verfolgung der Trichom-Musterbildung *in vivo* konnte hingegen immer ein Mindestabstand von zwei epidermalen Zellen zwischen den Trichom-Initialzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden.

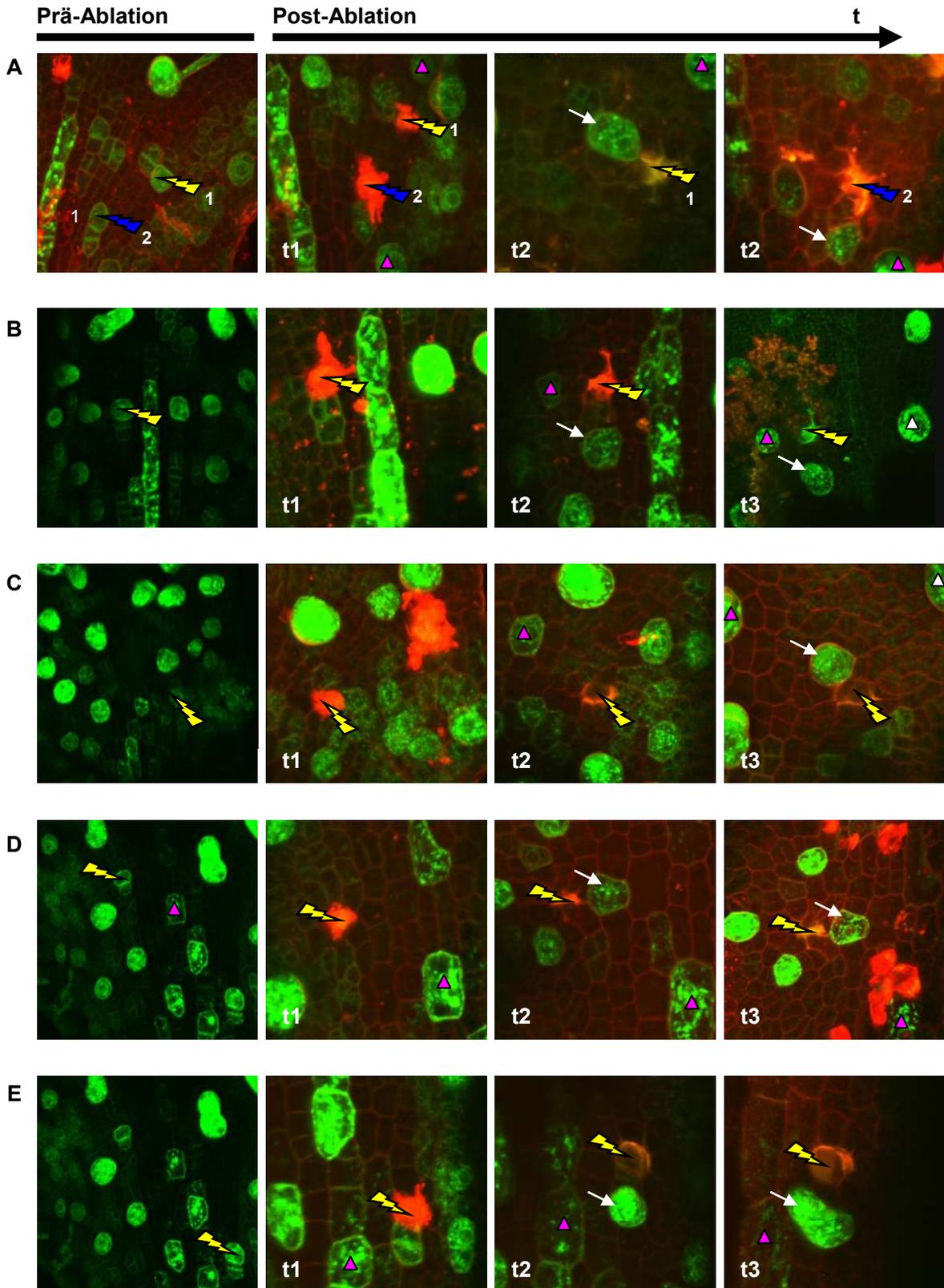


Abb. 2.5.1: Zell-Ablation. (A-E) Konfokale Bilder von Rosettenblättern, Ausschnitte aus der Trichom-Initiationszone. Trichome sind mit dem Trichom-spezifischen Fluoreszenzmarker pGL2::GFP-ER in grün markiert. In rot die Zellwände, die mit Propidiumiodid angefärbt sind. Die blauen und gelben Blitze markieren jeweils eine Laser-ablatierte Zelle. Links sind die Ausschnitte vor der Ablation gezeigt (Prä-Ablation), daneben die post-ablatierten Ausschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten. Die rosa Dreiecke dienen zu Orientierung, sie markieren eine Trichomzelle im Umkreis der Ablation. Die weißen Pfeile markieren die neu entstehende Trichomzelle. (A) Zwei ablatierte Zellen, mit gelbem und blauem Blitz. (B-E) Jeweils eine ablatierte Zelle.

3. Diskussion

3.1 ETC3 besitzt die Funktion eines Trichom-Inhibitors

Durch die hier durchgeführten Experimente wurde ETC3 auf die Funktion eines Trichom-Inhibitors untersucht, wodurch das Gen bzw. Protein in das Modell für die Trichom-Musterbildung nach dem Aktivator-Inhibitor Modell (Meinhardt and Gierer, 2000) mit einbezogen werden kann.

Das Gen *ETC3* (AT4G01060) wurde als homologes Gen zu den Trichom-Inhibitoren *CPC*, *TRY*, *ETC1* und *ETC2* mit einer Übereinstimmung von bis zu 50% (s. Abb. 2.1.1) identifiziert. Während der hier durchgeführten Untersuchungen zu *ETC3* wurde das Gen von Simon *et al.* (2007) in der Wurzelhaarentwicklung vorgestellt. Tominaga *et al.* (2008) publizierten das gleiche Gen als Trichom-Inhibitor mit dem Namen *CAPRICE LIKE MYB3 (CPL3)* und Wang *et al.* (2008) integrierten *ETC3* in eine vergleichende Analyse der Trichom-Inhibitoren. Die Ergebnisse in den Publikationen sind teilweise kontrovers zu den Ergebnissen in dieser Arbeit und werden im Folgenden diskutiert.

Die Salk Linie 094027 enthält eine T-DNA Insertion im zweiten Intron und wurde in dieser Arbeit als *etc3* Funktionsverlustmutante identifiziert. Die Mutante entwickelt über 50% mehr Trichome auf den Rosettenblättern als der Wildtyp. Die Komplementation der *etc3* Mutante zeigte, dass der Trichom-Phänotyp in *etc3* allein durch die Mutation in *ETC3* hervorgerufen wird (s. Tab. 2.1.3). In Wang *et al.* (2008) wurde die gleiche *etc3* Salk Linie verwendet, jedoch stellten sie keinen Trichom-Phänotyp in der Mutante fest. Gründe hierfür sind unklar. Tominaga *et al.* (2008) verwendeten eine Wisconsin T-DNA Mutante mit einer Insertion im ersten Exon, die als *cp13* Funktionsverlustmutante charakterisiert wurde. Die Mutante entwickelt bis zu 80% mehr Trichome auf den Rosettenblättern. Beide Mutanten *etc3* bzw. *cp13* zeigen also die gleiche Tendenz zu einer erhöhten Trichom-Dichte, die jedoch in der *cp13* Mutante um ca. 30% höher liegt als in der *etc3* Mutante. Gründe hierfür können in der Verwendung unterschiedlicher mutanter Allele und in unterschiedlichen Wachstumsbedingungen liegen. Eine Rettung der *cp13* Mutante unter Verwendung eines 3kb *ETC3* genomischen Fragments konnte jedoch nicht gezeigt werden, die Pflanzen besitzen keine Trichome mehr. Als Begründung wurde eine Dosis-abhängige Expression angeführt. Der Unterschied der

hier erzielten Rettung der *etc3* Mutante mittels der *ETC3* cDNA unter Kontrolle des 2023bp Promotors im Vergleich zu der Überrettung der *cp13* Mutante mit dem genomischen Fragment kann dahingehend diskutiert werden, dass dieser Phänotyp durch die unterschiedlichen Promotor-Fragmente oder durch das Vorhandensein der Introns zustande kommt. Weiterhin könnte eine hohe Kopienanzahl oder der Ort der Insertion im Genom verantwortlich für den Trichom-freien Phänotyp sein.

Neben *etc3* zeigen auch die Trichom-Inhibitor Mutanten *cpc* und *etc2* (Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004b) eine erhöhte Trichom-Dichte, was auf eine Funktion von *ETC3* als Trichom-Inhibitor hindeutet. Nach dem Aktivator-Inhibitor Modell regulieren die Trichom-Inhibitoren die definierten Abstände zwischen den Trichomzellen durch laterale Inhibition. Die erhöhte Trichom-Dichte in *etc3* kann nach dem Modell dahingehend interpretiert werden, dass durch den Ausfall eines Trichom-Inhibitors die laterale Inhibition verringert wird, wodurch sich mehr epidermale Zellen zu Trichomzellen entwickeln können. Jedoch wird durch die Präsenz der anderen Trichom-Inhibitoren noch ein Verteilungsmuster in der *etc3* Mutante aufrechterhalten.

Die *GUS* Expressionsanalysen von *ETC3* mit dem hier verwendeten 2023bp Promotor-Fragment zeigten eine basale ubiquitäre Expression in Rosettenblättern, die sich später auf Trichomzellen beschränkt (s. Abb. 2.1.6). Dieses Expressionsmuster wurde auch für die Trichom-Aktivatoren *GL1*, *TTG1*, *GL3* und für die Trichom-Inhibitoren *CPC*, *TRY*, *ETC1* und *ETC2* in Rosettenblättern gezeigt (Larkin *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2003; Ohashi *et al.*, 2002; Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b). Die basale Expression der Aktivatoren und Inhibitoren spiegelt eine Voraussetzung des Aktivator-Inhibitor Modells wider, nach der alle Zellen in frühen Entwicklungsstadien das gleiche Entwicklungspotential für ein Zellschicksal besitzen müssen. Alle Zellen sollten somit das gleiche Set an Trichom-Aktivatoren und -Inhibitoren exprimieren, was für die oben angeführten Gene zutrifft.

In der Publikation von Tominaga *et al.* (2008) wurde ein 2348bp Promotor-Fragment für die Expressionsanalyse von *CPL3* verwendet. Es wurde basale Expression in Rosettenblättern gezeigt, jedoch keine spezifische Expression in Trichomzellen. Da dieses Expressionsmuster nicht mit den hier erhaltenen Ergebnissen übereinstimmt, wurde das von Tominaga *et al.* (2008) verwendete Promotor-Fragment von 2348bp

kloniert und für eine Expressionsanalyse eingesetzt. Diese zeigte im Gegensatz zu den publizierten Daten eine deutliche *GUS* Expression für *ETC3* bzw. *CPL3* in Trichomzellen (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurde die *ETC3* Expression und Lokalisation auch auf zellulärer Ebene genauer untersucht (s. unten), wobei die Expression von *ETC3* in Trichomzellen bestätigt wurde.

Die Expression von GFP-ER unter Kontrolle des *ETC3* Promotors zeigte eine Expression von *ETC3* in Trichom-Initialzellen (s. Abb. 2.1.9). Eine basale Expression, wie mittels des *GUS* Reportersystems gefunden, konnte jedoch nicht detektiert werden. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der sensitiveren Detektion mit dem *GUS* Reportersystem, da der Farbstoff in Zellen akkumuliert, hingegen könnte die mit Hilfe des GFP-ER Fusionsproteins untersuchte basale *ETC3* Expression unterhalb der Detektionsgrenze liegen.

Die Untersuchung der Mobilität von *ETC3* mittels GFP- und YFP-Fusionen in transienten Transformationen und in stabilen transgenen Pflanzen zeigte klar, dass *ETC3* in der Lage ist, in der Epidermis von Rosettenblättern zu wandern, und auch von der L2- in die L1-Schicht (s. Abb. 2.1.9) wandern kann. Die Mobilität der Inhibitoren ist eine Voraussetzung des Aktivator-Inhibitor Modells, denn durch die Wanderung wird die laterale Inhibition sichergestellt. Bei der Untersuchung der YFP-*ETC3* Lokalisation durch die Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors war *ETC3* in Trichom-Initialzellen und benachbarten Zellen lokalisiert (s. Abb. 2.1.9). Vergleicht man die Expression von *ETC3::GFP-ER*, wo *ETC3* lediglich eine Expression in Trichom-Initialzellen zeigte, mit der endogenen Lokalisation mittels *pETC3::YFP-ETC3*, kann man schließen, dass *ETC3* in Trichom-Initialzellen exprimiert wird und von dort in die Nachbarzellen wandert. Ob es sich bei der Wanderung um das Protein und/oder RNA handelt, müsste noch durch *in situ* Hybridisierungen oder Immuno-Färbungen analysiert werden. Interessant wäre auch zu untersuchen, ob es sich bei der Wanderung von *ETC3* von der L2- in die L1-Schicht um eine unidirektionale oder bidirektionale Wanderung handelt, wonach *ETC3* auch von der L1- in die L2-Schicht wandert sollte, was hier nicht getestet wurde. Eine unidirektionale Wanderung würde für eine gewebespezifische Mobilität sprechen, wie es z.B. für *KNOTTED1* (Kim *et al.*, 2003) gezeigt wurde, woraus man ableiten kann, dass die Wanderung durch die Plasmodesmata reguliert wird. Bei einer bidirektionalen Wanderung kann eine passive

Passage durch die Plasmodesmata angenommen werden, wobei das Protein bzw. die RNA eine geringere Größe als die Plasmodesmata Porengröße besitzen muss. Für CPC wurde eine gewebespezifische Mobilität in der Wurzel gezeigt, wobei CPC in der Epidermis zwischen Wurzelhaarzellen und Nicht-Wurzelhaarzellen wandern kann, jedoch von Stelenzellen in die Epidermis keine Mobilität besitzt. Für die Mobilität von CPC wurden die beiden Aminosäuren Tryptophan und Methionin an Position 76 und 78 charakterisiert (Kurata *et al.*, 2005), die ebenfalls in ETC3, TRY, ETC1 und ETC2 konserviert sind. Daher kann man vermuten, dass alle Inhibitoren eine Nicht-Zellautonomie besitzen und die Mobilität gewebespezifisch reguliert wird. Bislang wurde lediglich für CPC und TRY in der Epidermis von Rosettenblättern Mobilität durch transiente Expressionsanalysen gezeigt (Digiuni *et al.*, 2008).

Wildtyp Pflanzen, in denen *ETC3* unter Kontrolle des 35S Promotors überexprimiert wurde, entwickelten keine Trichome mehr (s. Abb. 2.1.5), was auch Tominaga und Co-Autoren (2008) gezeigt haben. Dieser Phänotyp wurde auch mit Hilfe der Überexpression von *TRY*, *CPC*, *ETC1*, *ETC2* und *TCL1* gezeigt (Wada *et al.*, 1997; Schellmann *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2007). Nach dem Aktivator-Inhibitor Modell wird die Expression der Inhibitoren durch die Aktivatoren eingeschaltet. Die Inhibitoren müssen wiederum in der Lage sein, die Aktivatoren zu reprimieren. Der Trichom-freie Phänotyp von *ETC3* Überexpressionslinien kann dahingehend interpretiert werden, dass durch die Überexpression von *ETC3* die Expression der Aktivatoren reprimiert wird, wodurch keine Trichom-Entwicklung stattfinden kann. Digiuni *et al.* (2008) zeigten in *TRY* und *CPC* Überexpressionslinien, die zusätzlich ein pTRY::GUS Konstrukt enthielten, indirekt die Reprimierung der Aktivatoren durch die Inhibitoren. Durch die Überexpression der Inhibitoren konnte keine TRY::GUS Aktivität mehr detektiert werden. Dies deutet auf eine Reprimierung der Aktivatoren hin, was wiederum dazu führt, dass auch die Inhibitoren nicht mehr exprimiert werden können.

Durch die Etablierung von Doppel-, Tripel- und Quadrupelmutanten konnte für *ETC3* eine redundante Funktion zu den bekannten Trichom-Inhibitoren in der Trichom-Musterbildung gezeigt werden. Wie *CPC*, *TRY*, *ETC1* und *ETC2* ist *ETC3* an der Regulation der Trichom-Verteilung und Trichom-Dichte beteiligt (Schellmann *et al.*,

2002; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b). Die Trichom-Dichte und Größe der Trichom-Nester erhöht sich von Trichom-Inhibitor Doppelmutanten über die Tripelmutanten zu den Quadrupelmutanten (s. Abb. 2.1.12). Die Trichom-Phänotypen der Tripel- und Quadrupelmutanten *cpc try etc3*, *etc1 etc2 etc3*, *cpc try etc1 etc3* und *cpc try etc1 etc2* sind ebenfalls ein Beispiel für eine Voraussetzung im Aktivator-Inhibitor Modell, wonach alle Zellen in frühen Entwicklungsstadien das gleiche Entwicklungspotential für die Trichom-Entwicklung tragen sollten. Die extrem hohe Trichom-Dichte in den Mehrfachmutanten zeigt, dass das Potential zur Trichom-Entwicklung nicht auf eine begrenzte Anzahl von epidermalen Zellen beschränkt ist. Durch die Etablierung der *cpc etc3* Doppelmutante beschrieben Wang *et al.* (2008), dass ETC3 in der Trichom-Musterbildung die Funktion eines Trichom-Inhibitors hat, da der Trichom-Phänotyp der *cpc* Mutante verstärkt wird. Die Quadrupelmutante *cpc try etc1 cpl3* in Tominaga *et al.* (2008) zeigte ebenfalls eine drastisch erhöhte Trichom-Dichte auf Rosettenblättern.

Neben der Funktion von ETC3 in der Trichom-Musterbildung wurden für ETC3 auch Funktionen in anderen Geweben aufgezeigt.

Zum einen entwickeln *etc3* Mutanten größere Rosetten als der Wildtyp (s. Abb. 2.1.8). Die größeren Rosetten können auf vergrößerte Rosettenblätter zurückgeführt werden, die sich aufgrund vergrößerter epidermaler Zellen (Nicht-Trichomzellen) entwickeln (s. Tab. 2.1.2). Überexpressionslinien von *ETC3* zeigten entsprechend kleinere Rosetten bzw. Rosettenblätter. Hier kann nur spekuliert werden, dass die kleineren Rosettenblätter aufgrund kleinerer epidermaler Zellen zu erklären sind und dass die gesamte Zellzahl in der *etc3* Mutante und der Überexpressionslinie von *ETC3* gleich hoch ist wie im Wildtyp. In Tominaga *et al.* (2008) wurde diese Vermutung bestätigt. In der Publikation wurden ebenfalls vergrößerte Rosettenblätter in der *cpl3* Mutante analysiert, die sich aufgrund größerer epidermaler Zellen entwickelten. In Überexpressionspflanzen von *CPL3* waren die Zellen kleiner. Die gesamte Zellzahl war bei Rosettenblättern der unterschiedlichen Pflanzenlinien gleich hoch wie im Wildtyp. Die vergrößerten Zellen hatten einen erhöhten DNA-Gehalt, wie es auch für die Trichomzellen der *try* Mutante gezeigt wurde (Tominaga *et al.*, 2008; Schellmann *et al.*, 2002).

Generell zeigen die Ergebnisse zur Untersuchung der Rosettenblattgrößen, dass die Bestimmung der Trichom-Dichte auf Rosettenblättern durch die Auszählung von Trichomen in einem definierten Bereich erfolgen sollte. Auf diese Weise kann die Feststellung einer vermeintlich erhöhten bzw. niedrigeren Trichom-Dichte durch unterschiedlich große Blattflächen ausgeschlossen werden.

Tominaga und Co-Autoren (2008) zeigten zusätzlich zu dem erhöhten DNA Gehalt in epidermalen Zellen, dass der DNA Gehalt in Trichomzellen gegenüber Wildtyp-Trichomzellen reduziert ist, was zu häufig unterverzweigten und kleineren Trichomen in der *cp13* Mutante führt. Eine Unterverzweigung konnte für die *etc3* Mutante nicht beobachtet werden, lediglich eine Abnahme an vierfach-verzweigten Trichomen wurde bei der *etc3* Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Die Trichome waren im Wildtyp und in der *etc3* Mutante gleich groß (s. Abb. 2.1.3).

Weiterhin zeigten Expressionsanalysen, dass *ETC3* in Stomata und in Wurzeln exprimiert wird (s. Abb. 2.1.6).

Da neben *ETC3* auch *ETC2* in Stomata exprimiert wird (Kirik *et al.*, 2004b), wurde die Stomata-Dichte in *etc3*, *etc2* und in *etc2 etc3* im Vergleich zu den beiden Wildtyp Hintergründen untersucht. Dabei war zu beobachten, dass durch das Ausschalten von *ETC2* oder *ETC3* kein Einfluss auf die Stomata-Dichte genommen wird. Jedoch zeigte die Untersuchung der *etc2 etc3* Doppelmutante, dass die Stomata-Dichte gegenüber den Einzelmutanten verringert ist (s. Tab. 2.1.6). Somit könnten *ETC2* und *ETC3* eine Funktion als Stomata-Aktivatoren besitzen. Jedoch müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um diese Annahmen zu untermauern. Tominaga *et al.* (2008), die ebenfalls Stomata-Expression von *CPL3* detektierten, stellten in der *etc2 etc3* Doppelmutante keinen aberranten Stomata-Phänotyp im Vergleich zu den Einzelmutanten und Wildtyp fest. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen vermutlich in der Verwendung unterschiedlicher Allele für *etc3* bzw. *cp13* sowie für *etc2*. In dieser Arbeit wurde mit unterschiedlichen Ökotypen gearbeitet, *etc2* in Wassilewskija und *etc3* in Columbia Hintergrund. In Tominaga *et al.* (2008) wurden ausschließlich Mutanten in Columbia Hintergrund verwendet.

In der Wurzel wurde für *ETC3* lediglich eine schwache Expression gezeigt, was auch durch semi-quantitative RT-PCRs bestätigt wurde (s. Abb. 2.1.7). Tominaga *et al.*

(2008) stellten ebenfalls nur eine schwache Expression in der Wurzel fest und Simon *et al.* (2007) detektierten keine *ETC3* Expression in der Wurzel.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *ETC3* Expression in der Wurzel durch CPC und/oder TRY reprimiert wird, da in der *cpc try* Doppelmutante mittels semi-quantitativer RT-PCR eine hohe *ETC3* Expression in der Wurzel festgestellt wurde (s. Abb. 2.1.7). Die Reprimierung der Inhibitoren CPC, TRY und ETC1 in der Wurzel durch CPC und TRY wurde in Schellmann *et al.* (2002) und Simon *et al.* (2007) bereits festgestellt. Die Analyse der Wurzelhaar-Entwicklung in Abhängigkeit von *ETC3* wurde von Simona Digiuni untersucht, wobei in *etc3* eine signifikant geringere Anzahl von Wurzelhaarzellen in Wurzelhaarzellreihen festgestellt wurde. In der *cpc etc3* Doppelmutante konnte keine Abweichung zur *cpc* Mutante festgestellt werden, und in p35S::*ETC3* Überexpressionspflanzen war die Anzahl an Wurzelhaarzellen in den Nicht-Wurzelhaarzellreihen erhöht (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse spiegeln eine überlappende Funktion von *ETC3* in der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung wider. Tominaga *et al.* (2008) stellen in der *cp13* Mutante ebenfalls eine niedrigere Anzahl an Wurzelhaarzellen im Vergleich zum Wildtyp fest, wohingegen Simon *et al.* (2007) keine Abweichung in der Wurzelhaar-Musterbildung in *etc3* feststellten.

3.2 Trichom-Inhibitoren besitzen funktionale Unterschiede auf Protein- und Expressionsebene

Aufgrund der Tatsache, dass mit *ETC3* insgesamt sechs Gene als Trichom-Inhibitoren identifiziert sind, wurden die Trichom-Inhibitoren auf eventuelle unterschiedliche Merkmale in der Trichom-Musterbildung untersucht.

Für die laterale Inhibition der Trichom-Inhibitoren werden bislang zwei Mechanismen angenommen. Erstens, laterale Inhibition durch die Verdrängung von GL1 aus dem Aktivator-Komplex durch einen Inhibitor, wie es für TRY und CPC *in vitro* durch Drei-Hybrid Kompetitionsanalysen gezeigt wurde (Esch *et al.*, 2003). Die Bindung eines Inhibitors an den Komplex führt dazu, dass *GL2* nicht exprimiert wird, was zur Folge hat, dass keine Trichom-Entwicklung stattfindet (Payne *et al.*, 2000; Schiefelbein, 2003; Pesch and Hülskamp, 2004; Morohashi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). Zweitens, laterale Inhibition durch die direkte Reprimierung der Aktivatoren durch einen Inhibitor, wodurch der Aktivator-Komplex nicht mehr gebildet und folglich keine Trichom-

Entwicklung eingeleitet werden kann. Dieser Mechanismus wurde bislang jedoch nur für die Reprimierung von *GL1* durch *TCL1* gezeigt (Wang *et al.*, 2007).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zwei-Hybrid Analysen zeigten, dass *ETC3* mit *GL3* interagiert, wie es auch für die restlichen Trichom-Inhibitoren und *GL1* gezeigt wurde (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Esch *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004; Kirik *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2008). Die quantitative Auswertung der Interaktionsstärken zwischen den Inhibitoren und *GL3* zeigte weiterhin, dass *CPC* und *ETC1* die stärkste Interaktion mit *GL3* eingehen und *ETC2* die schwächste. In Drei-Hybrid Kompetitionsanalysen wurde gezeigt, dass neben *CPC* und *TRY* auch *ETC1* und *ETC3* mit *GL1* um die Bindung an *GL3* unterschiedlich stark kompetieren, wohingegen *ETC2* keine Competition zeigt (s. Abb. 2.2.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *CPC*, *TRY*, *ETC1* und *ETC3* an der lateralen Inhibition durch die Verdrängung von *GL1* aus dem Aktivator-Komplex beteiligt sind.

Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu *GL3* wurden als Kriterium verwendet, den Einfluss auf die Trichom-Musterbildung zu untersuchen. Die Vermutung war, dass durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Inhibitoren zu *GL3* die Mobilität bzw. die Signalreichweite der Inhibitoren beeinflusst werden könnte. Für *YFP-ETC3* und *YFP-CPC* wurde in transienten Expressionsanalysen in der *g/3 eg/3* Doppelmutante und in einer *GL3* Überexpressionslinie die Mobilität und Signalreichweiten der Inhibitoren in Abhängigkeit von *GL3* untersucht. Zum einen wurde gezeigt, dass *ETC3* in der *GL3* Überexpressionslinie eine höhere Mobilität besitzt als *CPC* und dass in *g/3 eg/3* die Mobilität von *CPC* angehoben wird (s. Tab. 2.2.2). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass *CPC* durch die höhere Bindungsaffinität zu *GL3* in seiner Mobilität eingeschränkt wird und *ETC3* durch die niedrigere Bindungsaffinität zu *GL3* in seiner Mobilität weniger beeinflusst wird.

Weiterführend wurde die Signalreichweite von *ETC3* und *CPC* in Abhängigkeit von *GL3* untersucht. Es wurden die Protein-Signalstärken, die in direkt angrenzenden Zellen von *YFP-CPC* bzw. *YFP-ETC3* exprimierenden Zellen vorliegt, relativ zu deren Ausgangssignalstärke gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass in der *GL3* Überexpressionslinie die Signalstärke von *ETC3* in den angrenzenden Zellen höher ist als die Signalstärke von *CPC*. Die *CPC* Signalstärke konnte durch die Expression in *g/3 eg/3* erhöht werden (s. Tab. 2.2.3). Die unterschiedlichen Signalstärken werden dahingehend interpretiert, dass eine hohe gemessene Signalstärke in den

angrenzenden Zellen für eine längere Signalreichweite des Proteins spricht und eine niedrige gemessene Signalstärke für eine kürzere Signalreichweite steht.

Aus den Daten kann interpretiert werden, dass CPC eine geringere Signalreichweite als ETC3 besitzt, da CPC stärker an GL3 bindet.

Betrachtet man die Drei-Hybrid Wettbewerbsanalysen, kann in Bezug auf die Bindungsaffinität zu GL3 ein Modell postuliert werden, in dem ETC2 die längste Signalreichweite besitzt und ETC3 die zweitlängste. CPC hat zusammen mit ETC1 die kürzeste Signalreichweite, gefolgt von TRY (s. Abb. 3.1). Mit Hilfe des Depletion/Trapping Modells (Bouyer *et al.*, 2008) wurde gezeigt, dass GL3 in der Lage ist, TTG1 aus umliegenden Zellen in den Zellkern von Trichom-Initialzellen zu ziehen. Diese Tatsache kann die Vermutung stützen, dass GL3 auch die Signalreichweiten der Inhibitoren durch deren Bindung beeinflussen kann. Somit wird in Betracht gezogen, dass unterschiedliche Signalreichweiten der Inhibitoren einen relevanten Unterschied innerhalb der Inhibitoren auf Proteinebene in der Trichom-Musterbildung darstellen kann.

Um dieses Modell untermauern zu können, wurde ein theoretisches Modell für die Abhängigkeit der Inhibitor-Signalreichweiten von der Bindungsaffinität zu GL3 basierend auf dem Aktivator-Inhibitor Modell von Florian Geier (AG Fleck, Bioinformatik-Gruppe für biologische Systemanalyse in Freiburg) erstellt (s. Abb. 3.1). Das Modell setzt folgende Parameter voraus: Ein Inhibitor wird lokal produziert und breitet sich gleichmäßig aus, wobei er eine konstante Abbaurrate besitzt. Aufgrund dieser Parameter besitzt der Inhibitor seine charakteristische Signalreichweite, was der Entfernung von der lokalen Produktion bis zu dem Abfall des Inhibitor-Niveaus auf 37% ($1/e$) entspricht. Zusätzlich wird der Inhibitor durch seine Bindungsaffinität zu GL3 unterschiedlich stark zurückgehalten. GL3 liegt in allen Zellen konstant vor. Anhand der charakteristischen Signalreichweite wird durch die Bindungsaffinität zu GL3 die kalkulierte Signalreichweite ermittelt. Diese Berechnungen (genauere Angaben s. Anhang) liefern ein theoretisches Modell (s. Abb. 3.1), das ebenfalls in unterschiedlichen Signalreichweiten der Inhibitoren (kalkulierten Signalreichweiten) in Abhängigkeit von GL3 resultiert, wobei durch eine höhere Bindungsaffinität zu GL3 die Signalreichweite kürzer ausfällt, was mit den Ergebnissen in dieser Arbeit übereinstimmt.

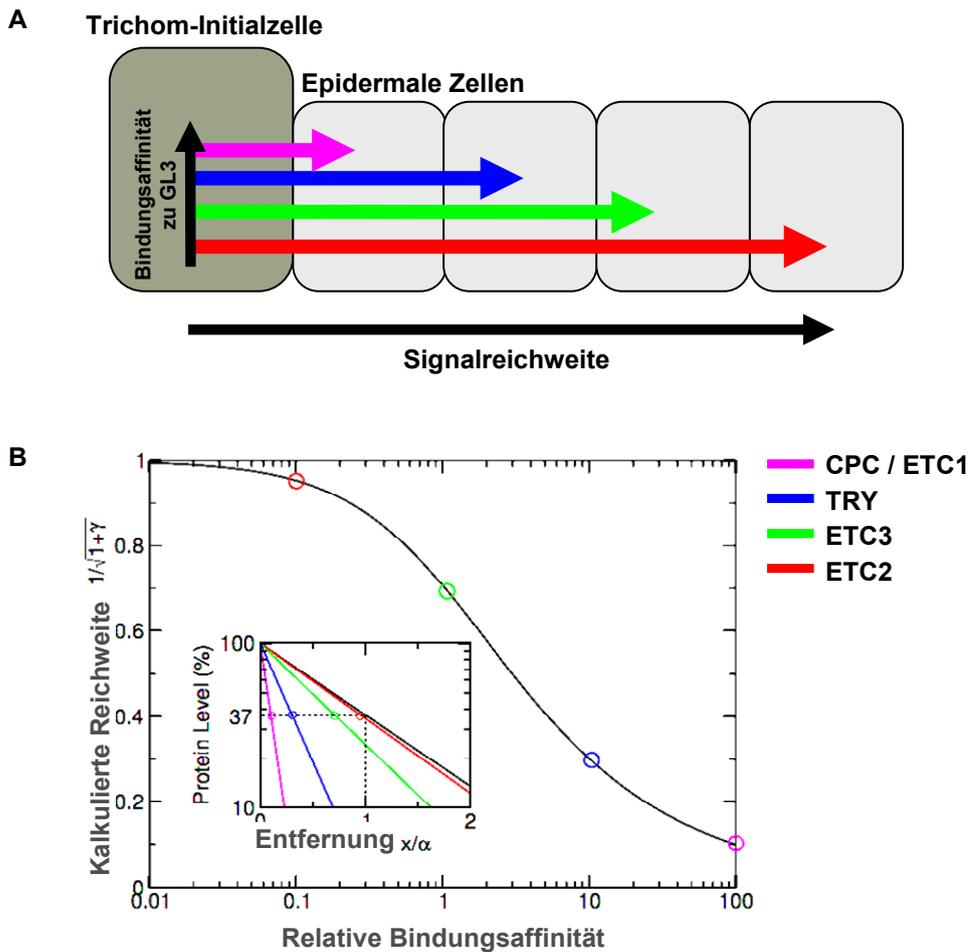


Abb. 3.1. Modell für die Signalreichweiten der Inhibitoren in Abhängigkeit zu GL3. (A) Schematische Darstellung des Modells. Durch eine höhere Bindungsaffinität zu GL3 in der Trichom-Initialzelle wird die Signalreichweite der Inhibitoren kürzer. Die Farbkodierungen spiegeln die einzelnen Inhibitoren wider, die in B aufgelistet sind. **(B)** Theoretisches Modell. Einsatz: Abnahme der Inhibitor-Konzentration mit zunehmendem Abstand zur Quelle bei unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Inhibitoren zu den Aktivatoren. Die Entfernungs-Skala hat die Einheit der charakteristischen Signalreichweite a , die diejenige Entfernung darstellt, bei der die Proteinkonzentration auf 37% der Ausgangskonzentration an der Quelle ohne Bindung an andere Proteine gefallen ist (gestrichelte Linie, schwarze Kurve). Farbkodierung: Keine Proteinbindung (schwarz), relative Bindungsaffinität $\gamma = 0.1$ (rot), $\gamma = 1$ (grün), $\gamma = 10$ (blau), $\gamma = 100$ (magenta). Man beachte die korrespondierenden Kreise im Einsatz und in der größeren Grafik. Mit zunehmender relativer Bindungsaffinität des Inhibitors zum Aktivator nimmt die Signalreichweite ab.

In dem postulierten Modell besitzt CPC eine kürzere Signalreichweite als TRY, was im Gegensatz zu den Annahmen von Schellmann *et al.* (2002) steht, wo argumentiert wurde, dass CPC aufgrund der hohen Trichom-Dichte in der *cpc* Mutante über eine längere Signalreichweite als TRY verfügen sollte. Da in der *try* Mutante Nester von Trichomen gebildet werden, sollte TRY lokaler wirken. Da keine quantitativen Angaben über das Netzwerk aus endogenen Protein-Expressionsleveln, -Abbauraten und -

Transportraten der Inhibitoren vorliegen, kann das theoretische Modell keine Vorhersagen zu den Trichom-Phänotypen der Trichom-Inhibitor Mutanten treffen. Die Ergebnisse über die unterschiedlichen Signalreichweiten durch die transienten Expressionsanalysen im Zusammenhang mit dem aufgestellten theoretischen Modell zeigen jedoch, dass die Modellierung der Inhibitor-Signalreichweiten neue Ansatzpunkte für die Trichom-Musterbildung auf Protein-Ebene liefert.

Um Daten über die Abbauraten und Transportraten der Inhibitoren zu erhalten, wurde versucht, die Mobilität der Inhibitoren mittels DRONPA-GFP Fusionen in stabilen Pflanzenlinien auf zellulärer Ebene zeitlich aufzulösen. Die Idee war, durch definiertes Einschalten der Inhibitor-DRONPA-GFP Fusionen unter Kontrolle des 35S Promotors in einer epidermalen Zelle die Wanderung des Proteins in benachbarte Zelle zeitlich zu verfolgen. Des Weiteren sollte die zeitliche Verfolgung bzw. Detektionsdauer der Fusionsproteine eine Aussage über die Abbauraten liefern.

Das p35S::CPC-DRONPA-GFP Fusionskonstrukt wurde anfänglich in Zwiebelepidermiszellen auf seine reversible Fluoreszenzaktivität getestet, wobei das Fusionsprotein durch unterschiedliche Anregungswellenlängen zwischen einem fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zustand wechseln konnte (s. Abb. 2.2.5). Jedoch konnten die Fusionsproteine in transgenen Pflanzen nicht detektiert werden. Da DRONPA-GFP durch Wellenlängen im UV-Bereich eingeschaltet wird, lag die Vermutung nahe, dass bei der Pflanzen-Anzucht die Lichtquellen durch ihren UV-Licht Anteil das DRONPA-GFP zu stark ausbleichen, da UV-Licht DRONPA-GFP anregt. Bei dem Versuch, p35S::CPC-DRONPA-GFP Samen der T2 Generation im Dunkeln keimen zu lassen, zeigte sich, dass sechs Tage alte Keimlinge eine starke GFP Fluoreszenz in den Kotyledonen aufweisen, eine Analyse war jedoch noch nicht möglich (s. Abb. 2.2.5). Die Anzucht von transgenen Pflanzen mit DRONPA-GFP Fusionen sollte demnach unter UV-freiem Licht erfolgen.

Die Vermutung, dass Unterschiede der Trichom-Inhibitoren auf Protein-Ebene die Trichom-Musterbildung beeinflussen, wird auch anhand von Promotor-Austausch-Experimenten in Simon *et al.* (2007) gezeigt. Durch die Expression der Inhibitoren unter Kontrolle des CPC Promotors wurden unterschiedlich starke Rettungen der *cpc* Mutante in der Wurzelhaar- und Trichom-Entwicklung erzielt. In der Wurzel zeigten CPC und ETC1 die beste Rettung, gefolgt von ETC3, TRY und ETC2. In Blättern erzielte die

Expression von *ETC1*, *ETC2*, *CPC* und *ETC3* unter Kontrolle des *CPC* Promotors die gleiche Rettung des Trichom-Phänotyps zum Phänotyp des Wildtyps. Nur *TRY* zeigte eine Überrettung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibitoren auf Protein-Ebene funktionale Unterschiede besitzen, die sich in verschiedenen Geweben zudem unterschiedlich auswirken.

Neben den aufgezeigten funktionalen Unterschieden der Trichom-Inhibitoren auf Protein-Ebene wird die Expression der Trichom-Inhibitoren ebenfalls unterschiedlich reguliert. So werden z.B. die Trichom-Inhibitoren *TCL1* und *ETC2* nicht in der Wurzel exprimiert, und *ETC2* und *ETC3* werden als einzige Trichom-Regulatorgene in Stomata exprimiert (Kirik *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2007; diese Arbeit). Weiterhin wird die Expression von *CPC*, *TRY*, *ETC1* und *ETC3* durch die Aktivatoren *GL1*, *GL3* und *TTG1* gesteuert, wohingegen die Expression von *ETC2* und *TCL1* nicht durch die Aktivatoren eingeschaltet wird (Wang *et al.*, 2008; Morohashi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). In der Wurzel wurde für *TRY* gezeigt, dass die Expression auch durch *GL2* gesteuert werden kann, weshalb für *TRY* auch eine Expression zu späteren Entwicklungsstadien angenommen wird (Simon *et al.*, 2007). Weitere Unterschiede wurden für *TCL1* gezeigt. Unter Kontrolle des *CPC* Promotors kann *TCL1* den Trichom-Phänotyp der *cpc* Mutante retten, wohingegen die Expression von *TCL1* unter Kontrolle des *TRY* Promotors die *cpc* Mutante nicht retten kann (Wang *et al.*, 2007).

Weiterführend konnte in dieser Arbeit durch Promotor-Austausch-Experimente gezeigt werden, dass die Expression von *ETC3* unter Kontrolle des endogenen Promotors, des *TRY* Promotors und des *CPC* Promotors unterschiedlich reguliert wird. Transformationen von *cpc try etc3* Tripelmutanten zeigten bei der Expression von *ETC3* unter Kontrolle des *TRY*- und *CPC*-Promotors in den Tripelmutanten eine stärkere Rettung des Trichom-Phänotyps in Richtung der Trichom-Verteilung auf Wildtyp Pflanzen (s. Abb. 2.2.6). Bei Expression von *ETC3* unter Kontrolle des endogenen Promotors konnte der Trichom-Phänotyp in den Transformanten lediglich bis zum Trichom-Phänotyp in *cpc try* Doppelmutanten gerettet werden (s. Abb. 2.2.6).

Die funktionalen Unterschiede der Trichom-Inhibitoren auf Expressionsebene zeigen, wie auch schon bei den Analysen auf Proteinebene, dass die Trichom-Musterbildung durch

ein komplexes Netzwerk funktionaler Unterschiede innerhalb der Trichom-Inhibitoren aufgebaut ist. Zwar zeigen die Trichom-Inhibitoren Redundanzen in Bezug auf Trichom-Verteilung und Trichom-Dichte in den entsprechenden Mehrfachmutanten, die Proteine und die Regulation der Expression zeigt jedoch Diversifikationen. Um festlegen zu können, welche der funktionalen Unterschiede für die Trichom-Musterbildung notwendig sind, wäre eine *in silico* Modellierung unter den Voraussetzungen des Aktivator-Inhibitor Modells (Meinhardt and Gierer, 1974; Meinhardt and Gierer, 2000) hilfreich.

3.3 TRY und CPC Mutagenese

Im Aktivator-Inhibitor Modell wird beschrieben, dass die Inhibitoren sich von den Zellen, in denen sie exprimiert werden, schneller ausbreiten müssen als die Aktivatoren, damit die laterale Inhibition wirksam ist (Meinhardt and Gierer, 2000). Jedoch ist nicht geklärt, warum die Aktivität der Inhibitoren erst in den Nachbarzellen wirksam ist und keinen Einfluss auf die Trichomzellen nimmt, wo sie exprimiert werden. Basierend auf dieser Tatsache wurde mittels Mutagenesen in der *TRY* und *CPC* cDNA untersucht, ob posttranslationale Phosphorylierung die Aktivität und/oder Mobilität der Inhibitoren regulieren könnte. Für das Movement Protein des Tabak Mosaik Virus (TMV) wurde in Pflanzen gezeigt, dass durch die Mutation der C-terminalen Phosphorylierungsstellen sowohl der Transport zu den Plasmodesmata als auch die Passage durch die Plasmodesmata verhindert werden kann (Waigmann *et al.*, 2000).

Die Mutagenesen von *CPC* und *TRY* wurden so durchgeführt, dass drei konservierte Serin-Reste verändert wurden, indem sie entweder deletiert, zu Alanin oder zu Glutamat ausgetauscht wurden. Waigmann *et al.* (2000) und Maciejewski *et al.* (1995) zeigten, dass der Austausch von Serin zu Alanin dazu führt, dass ein Protein nicht mehr phosphoryliert werden kann und dass Glutamat eine Mimikry für eine Phosphorylierung darstellt. In den hier hergestellten Transformanten war zu beobachten, dass die Verhinderung einer Phosphorylierung oder eine Mimikry für Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Aktivität und Mobilität der Inhibitoren nimmt, da die Proteine sowohl in der Lage waren, von der L2- in die L1-Schicht zu wandern und weiterhin, unter Kontrolle der endogenen Promotoren, die *cpc try* Doppelmutante retten können (s. Tab. 2.3.1, Abb. 2.3.1). Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivität und Mobilität der Inhibitoren nicht durch Phosphorylierung dieser drei Serinreste reguliert wird. Jedoch

kann nicht ausgeschlossen werden, dass Phosphorylierung an anderen Stellen in den Proteinen stattfindet. Weiterhin kann spekuliert werden, dass die Aktivität der Inhibitoren nicht reguliert wird, was bedeutet, dass die Aktivität durch die Expression auch in den Trichom-Initialzellen vorliegt. Jedoch nimmt die Inhibitor-Aktivität aufgrund der hohen Konzentration an Trichom-Aktivatoren keinen Einfluss auf die Trichom-Initialzellen. In den Nachbarzellen, wo die Aktivator-Konzentration niedriger ist, zeigt die Aktivität der Inhibitoren hingegen seine Wirkung.

In weiterführenden Experimenten sollte man untersuchen, ob die Inhibitoren überhaupt phosphoryliert werden, was in dieser Arbeit nicht analysiert wurde. Weiterhin sollte die Wanderung der Inhibitoren durch die Pasmodesmata auf eine aktive oder passive Passage untersucht werden. Für die aktive Passage wird angenommen, dass Protein-Protein Interaktionen mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MPB2C und/oder posttranslationale Modifikation die Spezifizierung regulieren, wie es z.B. für KNOTTED1 und virale "Movement"-Proteine in Pflanze gezeigt wurde (Kragler *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 2007; Waigmann *et al.*, 2000). Kurata *et al.* (2005) zeigten durch die Fusion von CPC mit mehreren GFPs, dass das Fusionsprotein in der Lage ist, von Zelle zu Zelle zu wandern. Dies ist ein Hinweis darauf, dass CPC aktiv durch die Plasmodesmata wandert, da das Fusionsprotein die Porengröße der Plasmodesmata überschreitet und somit für die Passage die Porenweite der Plasmodesmata anheben muss. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass eine aktive Wanderung auch bei den restlichen Trichom-Inhibitoren vorliegen kann. Mikroinjektionsexperimente könnten zur Überprüfung einer aktiven Wanderung der Inhibitoren durch die Plasmodesmata hilfreich sein.

In den hier durchgeführten Untersuchungen zur Signalreichweite der Inhibitoren wurde beobachtet, dass YFP alleine über eine geringere Signalreichweite als die Fusionsproteine verfügt (s. Tab. 2.2.3). Für YFP bzw. GFP wurde eine passive Wanderung durch Plasmodesmata gezeigt (Crawford and Zambryski, 2000; Crawford and Zambryski, 2001; Kim *et al.*, 2002). Man kann die geringere Signalreichweite von YFP im Vergleich zu den höheren Signalreichweiten der Inhibitoren möglicherweise dahingehend interpretieren, dass der Transport der Inhibitoren zu den Plasmodesmata reguliert wird, wodurch sie schneller in die Nachbarzellen wandern können als z.B. YFP. Konservierte Signalsequenzen, die den Transport von mobilen Proteinen zu den Plasmodesmata steuern könnten, sind bislang jedoch nicht bekannt, wie es z.B. bei

CPC und KNOTTED1 untersucht wurde. In KNOTTED1 ist ein Teil der Homöodomäne von 23 Aminosäuren für die Mobilität des Proteins verantwortlich, die keine Sequenzähnlichkeiten zu CPC aufzeigt.

3.4 Verfolgung der Trichom-Musterbildung *in vivo* zeigt charakteristische Merkmale des Aktivator-Inhibitor Modells

Es wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, die Trichom-Entwicklung von der Trichom-Initiationszone bis zu adulten Trichomen auf Rosettenblättern *in vivo* zu verfolgen. Hierzu wurde die Trichom-Markerlinie pGL2::GFP-ER verwendet. In der Initiationszone, wo die Trichom-Musterbildung festgelegt wird, waren stets Nester oder Reihen von Zellen mit GL2 Expression zu beobachten, wobei sich mit fortschreitender Entwicklung einzelne Zellen aus diesen Zellverbänden zu Trichomzellen entwickelten. Die restlichen Zellen stellten die GL2 Expression ein und nahmen das normale epidermale Zellschicksal an (s. Abb. 2.4.2).

Die Differenzierung von Trichomzellen aus den GL2 exprimierenden Zellverbänden spiegelt nach der postulierten *de novo* Musterbildung (Larkin *et al.*, 1996; Schnittger *et al.*, 1999; Schellmann *et al.*, 2002; Pesch and Hülskamp, 2004) die Etablierung eines Zellmusters aus anfänglich äquivalenten Zellen wider. Im Stadium, in dem viele Zellen eine GL2 Expression zeigen (s. Abb. 3.2), ist die Entscheidung über das Zellschicksal noch nicht getroffen. Durch eine stärker werdende Expression in einzelnen Zellen wird die Trichom-Entwicklung eingeleitet. Nach dem Aktivator-Inhibitor Modell (Meinhardt and Gierer, 1974; Meinhardt and Gierer, 2000) bedeuten diese Beobachtungen, dass durch lokale Fluktuationen die Aktivator-Konzentration in einer Zelle erhöht wird, was sich *in vivo* durch eine erhöhte GL2 Expression äußert (s. Abb. 3.2). Diese Zellen nehmen das Trichom-Schicksal an. Die Nachbarzellen werden durch laterale Inhibition an der Entwicklung zum gleichen Zellschicksal gehindert, was durch die abnehmende GL2 Expression in den benachbarten Zellen zu beobachten ist (s. Abb. 3.2). Diese Prozesse führen zu einem Abstandsmuster von drei bis vier Zellen zwischen den einzelnen Trichomzellen in der Initiationszone (Hülskamp *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 1994). Mit fortlaufender Entwicklung wird der Abstand zwischen den Trichomzellen durch mitotische Teilungen der epidermalen Zellen vergrößert. Vergleicht man die vorgestellten Tomographie Analysetechniken von Lee *et al.* (2006) und Kaminuma *et al.*

(2008) zur quantitativen Auswertung der Trichom-Musterbildung mit den hier erhaltenen Bilddaten aus der *in vivo* Verfolgung, können durch die hier vorgestellte Methode Trichom-Musterbildungsprozesse bereits zu frühen Entwicklungsstadien verfolgt werden. Neu entstehende Trichomzellen können zu bereits entwickelten Trichomen in Bezug gesetzt werden, was bei den Tomographie-Analysen bislang nicht möglich ist.

Die hier erhaltenen Bilddaten liefern vier-dimensionale quantitative Daten (x, y, z, t), die zur Auswertung der Trichom-Musterbildung verwendet werden können. Das Ziel ist, die Trichom-Musterbildung statistisch auswertbar zu machen und die Trichom-Verteilung im Wildtyp mit der in Mutanten zu vergleichen und *in silico* zu rekonstruieren, um Vorhersagen über die Musterbildung treffen zu können. Die Trichom-Markerlinie steht bereits in den Mutanten *try*, *cpc* und *cpc try* für diese Zwecke zur Verfügung. Die *in silico* Auswertungen werden von der Bioinformatiker-Gruppen für biologische Systemanalyse in Freiburg (AG Fleck, AG Ronneberger) ausgeführt und sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Man kann daher noch nicht festlegen, ob anhand der *in vivo* verfolgten Trichom-Musterbildung auf 13 Blättern des Wildtyps und drei Blättern der *cpc* Mutante eine statistische Auswertung möglich ist oder noch weitere Daten in die Auswertung einfließen müssen.

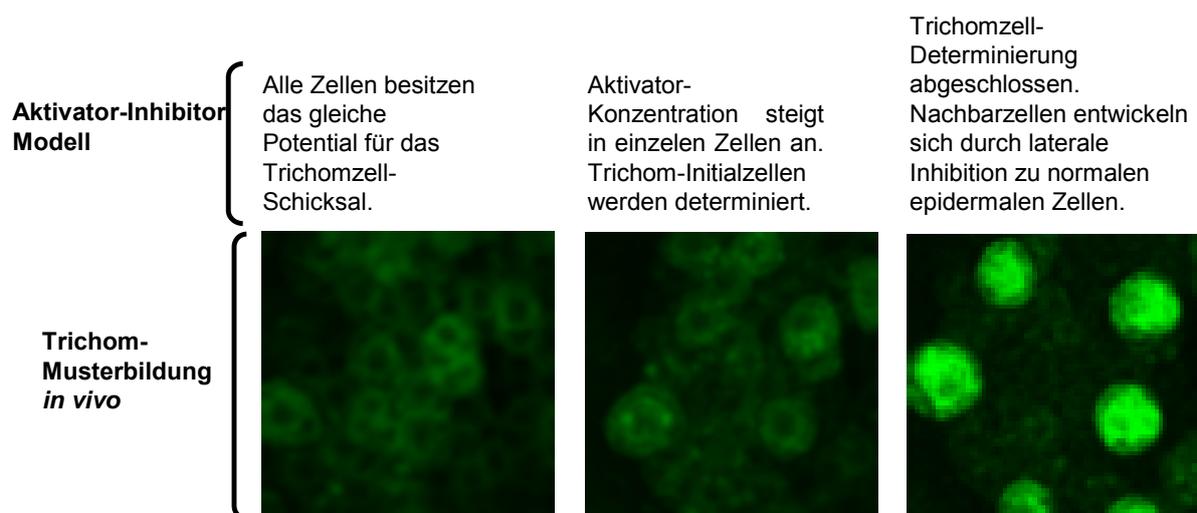


Abb. 3.2: Trichom-Musterbildung nach den Regeln des Aktivator-Inhibitor Modells. Gezeigt ist Vergleich der oben genannten Voraussetzungen des Aktivator-Inhibitor Modells von Meinhardt and Gierer (1974) und der Trichom-Musterbildung *in vivo* (unten). Es sind Ausschnitte aus der Trichom-Initiationszone von einem Rosettenblatt zu verschiedenen Entwicklungsstadien gezeigt. Trichomzellen werden durch den Trichom-spezifischen Marker pGL2::GFP-ER markiert (in grün).

3.5 Verfolgung der *de novo* Trichom-Musterbildung

Für die Annahme, dass es sich bei der Trichom-Musterbildung um einen *de novo* Musterbildungsprozess handelt, sprechen viele Indizien. Zum einen konnte die Entstehung der Trichom-Verteilung nach der Zellabstammung durch klonale Analysen ausgeschlossen werden (Larkin *et al.*, 1996). Weiterhin sind keine positionsabhängigen Signale aus anderen Zellschichten bekannt. Durch die etablierten Trichom-Inhibitor Quadrupelmutanten in dieser Arbeit und in Tominaga *et al.* (2008) wie durch die Überexpression von Trichom-Aktivatoren (Payne *et al.*, 2000; Schellmann *et al.*, 2002), wird diese Annahme gestützt, da das Trichomschicksal nicht auf eine begrenzte Anzahl von Zellen beschränkt ist. Dennoch konnte ein direkter Nachweis für eine *de novo* Trichom-Musterbildung noch nicht erbracht werden. In dieser Arbeit wurden Laser-Ablationen von Trichom-Initialzellen in der *cpc* Trichom-Markerlinie GL2::GFP-ER durchgeführt, um die postulierte *de novo* Musterbildung *in vivo* zu verfolgen.

Nach den Zell-Ablationen zeigte die zeitliche Beobachtung, dass entweder eine direkte Nachbarzelle oder eine Zelle, die eine weitere Zelle entfernt von der ablatierten Zelle liegt, in der Lage war, das Trichom-Schicksal einzuschlagen (s. Abb. 2.5.1, Abb. 3.3). Bei der *in vivo* Verfolgung (ohne Ablation) konnte immer ein Mindestabstand von zwei Zellen zwischen den Trichomzellen beobachtet werden. Somit zeigen die Ablationen, dass es möglich ist, die Trichom-Entwicklung dahingehend zu manipulieren, dass neue Trichomzellen entstehen, was nur durch einen *de novo* Prozess erklärt werden kann. Bei einer *de novo* Musterbildung sollte durch die Ablation einer Trichom-Initialzelle die laterale Inhibition eingestellt werden wodurch angrenzende Zellen das Trichomzell-Schicksal annehmen können, was hier gezeigt wurde. Somit können positionsabhängige Zelldeterminierung und Zellabstammung für die Trichom-Musterbildung weiterhin ausgeklammert werden. Da hier jedoch nur sechs erfolgreiche Ablationen in der *cpc* Mutante beobachtet wurden, müssen weitere Ablationen im Wildtyp und in Mutanten durchgeführt werden, um den direkten Nachweis für eine *de novo* Musterbildung zu erhärten. Weiterhin könnte durch die Analysen im Wildtyp und in Mutanten die *de novo* Musterbildung statistisch ausgewertet werden.

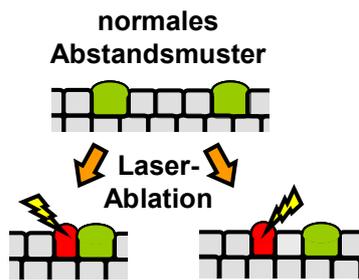


Abb. 3.3: Nachweis-Methode für eine *de novo* Trichom-Musterbildung. Oben das normale Abstandsmuster zwischen zwei Trichom-Initialzellen (grün) in der *cpc* Mutante. Die normalen epidermalen Zellen sind in grau markiert. Durch Laser-Ablation (Blitz) von Trichom-Initialzellen (rote Zelle) entwickeln sich neue Trichom-Initialzellen, die nicht das typische Abstandsmuster zu den ablatierten Trichom-Initialzellen einhalten.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend können aus den durchgeführten Ergebnissen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden.

ETC3 besitzt die Funktion eines Trichom-Inhibitors, wobei die erhaltenen Expressionsanalysen, Phänotypen und Protein-Lokalisationen zu ETC3 mit dem Modell für die Trichom-Musterbildung nach dem Aktivator-Inhibitor Modell erklärt werden können. Weiterhin besitzt ETC3 eine Funktion in der Stomata- und Wurzelhaar-Entwicklung und ist an der Regulation der epidermalen Zellgrößen beteiligt.

Die Trichom-Inhibitoren weisen auf Protein- und Expressionsebene funktionale Unterschiede auf. Anhand des postulierten Modells besitzen die Inhibitoren unterschiedliche Signalreichweiten, die in Abhängigkeit zu GL3 stehen. Für die Trichom-Musterbildung kann somit spekuliert werden, dass die Inhibitoren für die laterale Inhibition unterschiedliche Signalreichweiten besitzen, wodurch definierte Abstände zwischen den Trichomzellen eingehalten werden.

Die Verfolgung der Trichom-Entwicklung *in vivo* mit Hilfe der Trichom-Markerlinie spiegelt die Voraussetzungen des Aktivator-Inhibitor Modells wider. Die erhaltenen Bilddaten können zur quantitativen Auswertung der Trichom-Musterbildung *in silico* verwendet werden. Weiterhin ermöglicht die *in vivo* Verfolgung der Trichom-Musterbildung eine Analyse der postulierten *de novo* Musterbildung. Durch Laser-Ablationen von Trichom-Initialzellen konnte gezeigt werden, dass die *de novo* Musterbildung *in vivo* zu erkennen ist.

4. Material / Methoden

4.1 Molekularbiologische Arbeiten

Plasmid DNA Präparation aus Bakterien:

Plasmidpräparationen erfolgten aus einer 2ml Bakterienkultur und wurden mit dem Säulen pEQ-LAB Miniprep Kitl von PEQLAB Biotechnology GmbH nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Enzymatische Modifikationen von DNA:

Alle verwendeten Enzyme stammten von Fermentas. Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen, die Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase, die Phosphorylierung mit T4 Polynukleotid Kinase, das Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow und die Ligation mit T4-Ligase erfolgten nach den Angaben des Herstellers oder wurden modifiziert nach den Vorschriften von Sambrook.

Agarose Gelelektrophorese:

DNA- und RNA-Fragmente wurden für analytische und präparative Zwecke durch horizontale Agarose Gelelektrophoresen aufgetrennt. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße (Basenpaare, bp) wurden 1–5%ige (w/v) Agarose (Biozym) Gele verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 10x Auftragspuffer (s. 4.14) vermischt. Zur Größenbestimmung der Fragmente dienten DNA-Größenmarker von Fermentas und Invitrogen.

DNA-Extraktion aus Agarosegelen:

DNA-Extraktionen wurden mit dem Säulen Jetquick Gel Extraction Kit von Genomed nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde anschließend in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ eluiert.

PCR:

PCRs (engl. polymerase chain reaction; PCR) wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten und zur Überprüfung von klonierten Konstrukten eingesetzt. Für präparative PCRs im 50µl Volumen wurde die Phusion Polymerase von Finnzymes

(proofreading, 1kb/15sec) oder die Pfu Polymerase von Fermentas (proofreading, 0,5kb/1min) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Bei Kontroll-PCRs im 25µl Volumen wurde die Polymerase von Bioline (1kb/30sec) oder Haus-Taq (1kb/30sec) eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt. Bei einer Standard-PCR wurde zu Beginn bei 94°C oder 98°C für 2min denaturiert. Ein Zyklus bestand aus Denaturierung bei 96°C oder 98°C für 30sec, Primerhybridisierung bei 60°C ±10°C (Primer-abhängig) für 30sec und Elongation bei 72°C für 1min (abhängig von der Amplifikatlänge und Polymerase). Der Zyklus wurde 20x bis 40x wiederholt.

Sequenzierung:

Sequenzierungen wurden mit dem ABI 310 Prism (Perkin-Elmer applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem Big-Dye Kit 1.1 (Perkin-Elmer applied Biosystems) angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde von den Angaben des Herstellers wie folgt modifiziert.

Ansatz: Puffer: 0,25µl
Primer: 0,25µl
DNA: 0,4µl
Big-Dye: 0,5µl
H₂O: 1,1µl

Die PCR erfolgte in einem Eppendorf Mastercycler bei folgenden Bedingungen. Zu Beginn wurde bei 94°C für 2min denaturiert. Ein Zyklus bestand aus Denaturierung bei 94°C für 20sec, Primerhybridisierung bei 56°C ± 2°C, Elongation bei 60°C für 4min. Der Zyklus wurde 30x wiederholt. Die Wahl der Primer, sowie die Auswertung erfolgte mit der Vektor NTI AdvanceTM 10 Software (Invitrogen).

Genomische DNA Präparation:

Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde wie folgt durchgeführt. Es wurden 1-2 Blätter homogenisiert, in 200µl 2xCTAB-Puffer (s. 4.14) gelöst und für 1h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde 200µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und für 15sec gevortext. Nach Zentrifugation für 5min bei 13.000rpm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 200µl Isopropanol aufgefüllt. Nach Inkubation für 5min bei 4°C, wurde für 20min bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250µl 70% EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet

wurde in 20µl Tris pH 8,2 aufgenommen. Für PCRs wurde 1µl genomische DNA eingesetzt.

RNA Präparation:

Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte mit dem TRI Reagenz von MRC. Für die Isolierung wurde 80-100mg Blattmaterial eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 50µl DEPC-H₂O gelöst. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau für 1h bei 37°C, wonach eine Chloroform/Phenol Extraktion erfolgte. Das Pellet wurde in 20µl DEPC-H₂O gelöst.

cDNA Einzel-Strang Synthese:

Die Synthese von RNA zu DNA wurde mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für anschließende PCRs wurden 2µl cDNA eingesetzt.

Semiquantitative RT-PCR:

RT-PCRs (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen) wurden zur Bestimmung der Expressionslevel von ETC3 in verschiedenen Geweben eingesetzt. Hierfür wurde aus den Geweben cDNA hergestellt und für die RT-PCRs eingesetzt. Die verwendeten Primer Sequenzen sind in 4.13 aufgeführt. Als Kontrolle diente die Amplifikation von Aktin in dem analysierten Gewebe mit den Primern Aktin-forw. und Aktin-rev. Die BioTAQ™ DNA Polymerase von Bioline wurde für die PCRs eingesetzt. Die PCR-Ansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50µl nach den Angaben des Herstellers. Die Expressionslevel wurden zwischen 20 bis 40 PCR-Zyklen analysiert.

4.2 Gateway-Klonierungssystem

Das Gateway-System von Invitrogen stellt ein Klonierungs-System auf der Basis von Rekombinations-Reaktionen dar. Durch das System können universelle Klone mit gewünschtem Insert hergestellt werden. Die sogenannten Entry-Klone können über BP-Reaktionen erzeugt werden, die wiederum in beliebige Zielvektoren, die Destination-Vektoren (binäre Vektoren), über LR-Reaktionen transferiert werden können. Alle binären Vektoren in dieser Arbeit wurden mit diesem System hergestellt (Invitrogen,

Gateway™ Cloning Technology). Die Reaktionsansätze wurden von den Angaben des Herstellers wie folgt modifiziert:

BP-Reaktionsansatz:

5x BP-Puffer: 1µl
 PCR-Produkt: 400ng
 pDonor Vektor: 100ng
 BP Klonase Mix.: 1µl
 H₂O_{dest.}: auf 5µl aufgefüllt

Inkubation: 25°C, über Nacht

LR-Reaktionsansatz:

5x LR-Puffer: 1µl
 pEntry Klon: 800ng
 pDest-Vektor: 60ng
 LR Klonase Mix.: 1µl
 H₂O_{dest.}: auf 5µl aufgefüllt

Inkubation: 25°C, über Nacht

4.3 Arbeiten mit Bakterien

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden die *E.coli* Stämme DH5α und dB3.1 eingesetzt. Für die Transformation von *Arabidopsis* diente der Agrobakterienstamm GV3101 pMP90RK (s. Tab. 4.1).

Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen:

Die Herstellung kompetenter Zellen wurde nach der Calcium- und Rubidiumchlorid Methode durchgeführt. Von einer Kolonie wurde eine Übernachtskultur in 10ml ψ-Medium (s. 4.14) im 37°C Schüttler bei 250rpm angezogen. Von der Vorkultur wurden 4ml in 400ml ψ-Medium bis zu einer OD 0,5 (ca. 2,5h) bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden anschließend in 50ml Zentrifugenröhrchen für 15min auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 4°C und 2000rpm für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils in 15ml TFB1-Lösung (s. 4.14) resuspendiert und für 2h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 2000rpm für 5min wurden die Pellets insgesamt in 2ml TFB2-Lösung (s. 4.14) resuspendiert und in 100µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Hitzeschock-Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen:

Ein 100µl *E.coli* Aliquot wurde auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA (400ng-800ng) vermischt und für 30min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2min. Die Zellen wurden mit 600µl LB-Medium (s. 4.14) aufgefüllt und für 45-60min bei 37°C und 950rpm geschüttelt. Nachfolgend wurden die Zellen auf geeigneten LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien Zellen:

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde die Calcium-Methode verwendet. Der Stamm GV3101 pMP90RK (s. Tab. 4.1) wurde verwendet. Von einer Kolonie wurde eine Übernachtskultur in 5ml YEB+Rif+Kan-Medium (s. 4.14) im 28°C Schüttler bei 220rpm angezogen. Aus der Vorkultur wurden 4ml in 400ml YEB+Rif+Kann-Medium umgeimpft und bis zu einer OD von 0,5 geschüttelt (ca. 9h). Die Kultur wurde dann in kalten 50ml Zentrifugenbechern bei 4°C für 5min und 7000g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet jeweils in 5ml eiskaltem 0,15M NaCl₂ (autoklaviert) resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 5min bei 4°C und 7000g zentrifugiert und die Pellets insgesamt in 2ml eiskaltem 20mM CaCl₂ (autoklaviert) aufgenommen und in 25µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Hitzeschock-Transformation von Agrobakterien:

Ein Aliquot von 25µl kompetenter Agrobakterien wurde bei RT aufgetaut und anschließend mit 500ng Plasmid-DNA vermischt und in flüssigem N₂ für 2min schockgefroren. Nach dem Auftauen erfolgte für 2min bei 42°C ein Hitzeschock. Danach wurde die Agrobakterien-Lösung mit 600µl YEB-Flüssigmedium (s. 4.14) für 2h bei 28°C und 800rpm geschüttelt. Von der Kultur wurden 60µl auf geeignete YEB-Selektionsplatten ausplattiert und für 2 Tage bei 28°C inkubiert.

4.4 Antibiotika

Antibiotika (s. Tab. 4.2) dienen als Selektionsmarker zur Identifizierung transformierter Bakterien und Pflanzen. Die Antibiotika (Roth, Duchefa Biochemie) wurden den Nährmedien hinzugefügt. Die Wahl der Antibiotika richtete sich nach den Antibiotika-Resistenz-markern der transformierten Plasmide.

Tab. 4.1: Bakterien- und Hefestämme..

Stamm	Genotyp	Anwendung
DH5α (<i>E.coli</i>)	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Vermehrung von Plasmide, die kein ccdB Operon tragen
dB3.1 (<i>E.coli</i>)	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl5 Δleu mtl1	Vermehrung von Plasmiden, die das ccdB Operon tragen
GV3101 pMP90RK (<i>A.tumefaciens</i>)	C58C1 Rif ^r Gm ^r Km ^r	Transformation von Arabidopsis mit pAMPAT Vektoren, die das Ti Helferplasmid für den T-DNA Transfer benötigen
AH109 (<i>S.cerevisiae</i>)	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	Verwendet für alle 2-Hybrid und 3-Hybrid Interaktionsanalysen

Die aufgeführten Bakterienstämme und der Hefestamm wurden für die unter Anwendung angegebenen Tätigkeiten verwendet.

Tab. 4.2: Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung-Konzentration	Arbeitskonzentration als Selektionsmedium
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	100mg/ml	100µg/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml
Rifampicin (Rif)	DMSO	50mg/ml	50µg/ml
Carbenicillin (Carb)	H ₂ O	50mg/ml	50µg/ml

Die aufgeführten Antibiotika wurden zur Selektion von transformierten Bakterien und Pflanzen in den angegeben Konzentrationen den Nährmedien zugeführt.

4.5 Arbeiten mit Hefen

Für Zwei-Hybrid und Drei-Hybrid Analysen wurde der Hefestamm AH109 (s. Tab. 4.1) eingesetzt.

Herstellung / Transformation chemisch kompetenter Hefezellen:

Die Hefetransformation wurde nach der Lithium-Acetat/ SS-DNS/PEG Methode von der Gietz Labor Homepage durchgeführt (<http://home.cc.umanitoba.ca/~gietz/>). Die

transformierten Hefezellen wurden in 70µl H₂O_{dest} gelöst und auf Minimalmedium-Platten ausplattiert. Die verwendeten Minimalmedium-Platten (=Selektionsplatten, Trp-, Leu-) richteten sich nach den Aminosäure-Selektionsmarkern der transformierten Hybridplasmide (Tab. 4.3).

GAL4 Zwei-Hybrid Test:

Mit dem Zwei-Hybrid System wurden Trichom-Regulatoren auf deren Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht. Das von Fields and Song (1989) entwickelte GAL4 Interaktionssystem aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde verwendet.

Für den Hefe Zwei-Hybrid Interaktionstest wurden die Köder- und Beuteplasmide (pAS2.1 und pAct, s. Tab. 4.6) durch eine Doppel-Transformation in den Hefestamm AH109 (s. Tab. 4.1) auf eine Interaktion untersucht. Die Feststellung einer Interaktion bzw. Autoaktivität wurde mit zwei verschiedenen Methoden untersucht.

Zum einen wurde mittels des Histidin-Reportersystems ein qualitativer Interaktionstest über einen Agar-Plattentest durchgeführt. Das Wachsen von Hefekolonien auf Interaktionsplatten spiegelt eine Interaktion zwischen den analysierten Proteinen wider. Zum anderen wurde über das lacZ-Reportersystem ein quantitativer Test (ONPG-Test) in Flüssigkultur vorgenommen. Hierfür wurden Hefekolonien von den Selektionsplatten eingesetzt. Die Hydrolyse des farblosen Substrats o-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid (ONPG) wird durch das Genprodukt von LacZ, der β-Galactosidase katalysiert. Dabei entsteht das leuchtend gelbe Reaktionsprodukt o-Nitrophenol, welches spektrophotometrisch bei 420nm nachweisbar ist. Der Test wurde nach dem Protokoll des Yeast Protocols Handbook von Clontech (# PT3024-1) durchgeführt.

GAL4 Drei-Hybrid Test:

Mit dem Drei-Hybrid System wurden Trichom-Regulatoren auf deren Protein-Protein Konkurrenz untersucht. Das GAL4 Drei-Hybrid Interaktionssystem aus *Saccharomyces cerevisiae* beinhaltet zusätzlich in dem Beuteplasmid (pBridge, s. Tab. 4.6) einen Methionin-reprimierbaren Promoter, unter dessen Kontrolle ein drittes Gen in dem System exprimiert werden kann.

Für den Konkurrenztest wurden die Köder- und Beuteplasmide (pBridge und pAct) durch eine Doppel-Transformation in den Hefestamm AH109 (s. Tab. 4.1) integriert.

Die Feststellung einer Konkurrenz wurde zum einen über einen qualitativen Agar-Plattentest durchgeführt. Hierbei wurde das Wachstum der Hefen auf

Interaktionsplatten untersucht, die unterschiedliche Methionin-Konzentrationen beinhalteten. Das Wachsen bzw. Nichtwachsen der Hefe im Vergleich spiegelt eine Konkurrenz zwischen zwei Proteinen für die Bindung an ein drittes Protein wider. Zum anderen wurde über das lacZ-Reportersystem ein quantitativer Konkurrenz-Test (ONPG-Test) in Flüssigkultur vorgenommen (s. GAL4 Zwei-Hybrid Test).

Autoaktivierungstest:

Alle verwendeten Köder- und Beuteplasmide wurden vor den Interaktionstests auf eine eventuelle Autoaktivierung getestet. Hierfür wurden die Köderplasmide im pAS2.1 und pBridge-attR Vektor mit dem leeren Beutevektor pAct auf eine Interaktion getestet. Leerer Vektor bedeutet, dass die GAL4 Aktivierungsdomäne bzw. Bindedomäne nicht mit einem Gen fusioniert ist. Die Interaktion wurde mittels des Histidin-Reportersystems über einen Agar-Plattentest durchgeführt. Die Interaktionsplatten (Leu-/Trp-/His-) wurden hierfür mit 5mM 3-Amino-1,2,4-triazol (Sigma) versetzt.

Hefe-Medien:

Die Medien (s. 4.14) zeichnen sich durch das Fehlen von Aminosäuren im Vollmedium aus, welche generell für das Wachstum von Hefezellen essentiell sind. Die Selektionsmedien sind durch das Fehlen der Aminosäuren gekennzeichnet, welche die entsprechenden Aminosäure-Selektionsmarkergene der transformierten Köder- bzw. Beuteplasmide tragen (s. Tab. 4.3).

Den Interaktionsmedien fehlt zusätzlich noch die Aminosäure Histidin für den Zwei-Hybrid Test und Methionin für den Drei-Hybrid Test (s. Tab. 4.3).

Tab.4.3 A: Aminosäure-Selektionsmarker der Hybridplasmide.

Tryptophan (Trp-)	Leucin (Leu-)
Köderplasmid pAS.2.1; pBridge	Beuteplasmid pAct

Tab.4.3 B: Verwendete Interaktionsplatten.

Fehlende Aminosäure im Medium	Tryptophan/Leucin/Histidin (Trp- /Leu- /His-)	Tryptophan/Leucin/Histidin/ Methionin (Trp- /Leu- /His- / Met-)
Verwendungs- zweck	Kultivierung von doppel- transformierten Hefezellen mit einem Köder-plasmid und Beuteplasmid. Zwei-Hybrid Test.	Kultivierung von doppel- transformierten Hefezellen mit dem Köderplasmid pBridge und dem Beuteplasmid pAct. Drei-Hybrid Test.

Die Tabellen zeigen in **(A)** die Aminosäure-Selektionsmarker der verwendeten Hybridplasmide. In **(B)** die verwendeten Interaktionsmedien.

4.6 Arbeiten mit *Arabidopsis*

Transformation von *Arabidopsis thaliana*:

Für die Pflanzen Transformation wurde der Agrobakterien-Stamm GV3101 pMP90RK verwendet. Die transgene Bakterienkultur wurde für 3 Tage in einem 200ml Volumen im 28°C Schüttler bei 220rpm angezogen. Die Pflanzen-Transformation wurde nach der "floral-dip" Methode von Clough and Bent (1998) durchgeführt.

Anzucht von *Arabidopsis thaliana*:

Die Pflanzen wurden in der Regel unter Langtagbedingungen (16hTag/ 8h Nacht) bei 22°C im Gewächshaus oder 24°C bzw. 18°C in Klimakammern angezogen. Die Aufzucht erfolgte entweder in Töpfen auf Erde oder auf MS-Platten (s. 4.14). Nach der Aussaat wurden die Töpfe bzw. Platten zunächst für 3 Tage stratifiziert, bevor die Samen zum Keimen ins Gewächshaus gestellt wurden. Transformierte Samen wurden nach der Keimung auf Erde für die Selektion mit Basta^R besprüht.

Sterilisation von *Arabidopsis thaliana* Samen:

Samen wurden vor der Aussaat auf MS-Platten (s. 4.14) einer Oberflächen-Sterilisation unterzogen. Hierfür wurden die Samen 15min in 70%EtOH unter Schütteln gründlich gewaschen. Anschließend wurden die Samen 2x mit H₂O_{dest} gewaschen und dann ausplattiert.

Kreuzen von *Arabidopsis thaliana*:

Den Akzeptor-Pflanzen wurden die Staubblätter frühzeitig vor der Pollenreifung mit einer feinen Pinzette entfernt. Einen Tag später wurde das Stigma der emaskulierten Blüten mit reifen Pollen der Donor-Pflanze bestäubt.

Pflanzenlinien:

Bei den verwendeten Pflanzenlinien handelt es sich um *Arabidopsis* Wildtypen, sowie Einzel- und Mehrfach-Mutanten. Die Linien dienten zum Kreuzen und zur Transformation. Die verwendeten Pflanzenlinien sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

Genotypisierung von Einzel- und Mehrfachmutanten:

Bei der Überprüfung von Einzel- und Mehrfachmutanten wurden die Pflanzen auf ihren Genotyp mittels PCR überprüft. Für die Überprüfung wurden immer 2 unterschiedliche PCRs angesetzt und miteinander verglichen. Zum einen wurde eine PCR mit einem genspezifischen Primerpaar angesetzt. Zum anderen wurde eine PCR mit einem genspezifischen Primer und einen für die Insertion/Mutation spezifischen Primer angesetzt. Bei Salk-Linien wurde der spezifische LBa1-Primer verwendet, bei Wisconsin-Linien der JL202-Primer. Die Primer Kombinationen für die einzelnen Mutationen sind in Tab. 4.5 aufgeführt. Die Primer-Sequenzen sind in Tab. 4.13 aufgelistet.

Tab. 4.4: Verwendete Pflanzenlinien.

Pflanzen-Linie (Ökotyp)	Mutagen	Referenz
WT (Columbia, Col)	---	---
WT (Landsberg, Ler)	---	---
WT (Wasilewskaja, WS)	---	---
<i>gl3</i> (Col)	Salk_118201, T-DNA in Exon 6	in dieser Arbeit analysiert
<i>egl3</i> (Col)	Salk_019114, T-DNA in Exon 6	in dieser Arbeit analysiert
<i>try-JC</i> (Col)	EMS	Larkin <i>et al.</i> , 1999
<i>cpc</i> (WS)	T-DNA Linie, Insertion in AS 75, führt zu Stopp Codon, 19 AA 3' fehlen, darunter Teil der MYB Domäne	Wada <i>et al.</i> , 1997
<i>cpc try-82</i> (WS, Ler)	Kreuzung (<i>try-82</i> EMS)	Schellmann <i>et al.</i> , 2002
<i>etc1</i> (Col)	Salk_071734, T-DNA in Intron 1	Kirik <i>et al.</i> , 2004a
<i>etc2</i> (WS)	Wisconsin	Kirik <i>et al.</i> , 2004b
<i>etc3</i> (Col)	Salk_094027, T-DNA in Intron 2	in dieser Arbeit analysiert
<i>cpc try-82 etc1</i> (WS, Ler, Col)	Kreuzung, s.o.	Kirik <i>et al.</i> , 2004a
<i>cpc try-82 etc2</i> (WS, Ler, WS)	Kreuzung, s.o.	Kirik <i>et al.</i> , 2004b
pGL2::GFP-ER / WT (Ler)	Transformande, trichomspezifische Markerlinie	Mathur <i>et al.</i> , 2002

Bei den aufgeführten Pflanzenlinien handelt es sich um Wildtypen (WT) und Einzel- und Mehrfach-Mutanten von Trichom-Regulatorgenen. Des Weiteren ist die trichomspezifische Markerlinie pGL2::GFP-ER unter dem *GL2* Promotor aufgelistet.

Tab. 4.5: Primer für Genotypisierung.

Mutante Pflanzenlinie	Genspezifisches Primerpaar	Primerpaar für Mutation
<i>etc1</i> (Col)	ETC1 (ATG)-forw. + ETC1 (+Stop)-rev.	LBa1 + ETC1 (ATG)-forw.
<i>etc2</i> (WS)	ETC2 (B)-forw. + ETC2 (B)-rev.	JL202 + ETC2 (B)-rev.
<i>etc3</i> (Col)	ETC3-forw. + ETC3-rev.	LBa1 + ETC3-forw.
<i>cpc</i> (WS)	genom.CPC (A)-forw. + genom.CPC (A)-rev.	Hyg-B-forw.+ Hyg-B-rev.
<i>try</i> (Ler)	TRY genom-forw. + TRY-rev. 2.PCR auf die 1. PCR: TRY-CAP-forw. + TRY-82-rev.	Verdau mit AvrII auf PCR-Amplifikat (mit CAP)
<i>gl3</i> (Col)	kGL3-forw. + GL3 (Ampl. -Stop)-rev.	LBa1 + kGL3-forw.
<i>egl3</i> (Col)	EGL3-forw. + EGL3-rev.	LBa1 + EGL3-rev.

Zur Überprüfung der aufgelisteten Einzelmutanten wurden zwei verschiedene PCRs angesetzt. Zum einen mit den aufgeführten genspezifischen Primern und zum anderen mit den Primern, welche die Mutation aufzeigen.

4.7 Klonierungsstrategien

Neu klonierte Subklone, Entry Klone und binäre Vektoren wurden durch Kontroll-Verdaus und/oder Sequenzierung überprüft. Für die Festlegung der Restriktionsenzyme und Primer sowie die Auswertung wurde die Vektor NTI Advance™ 10 Software verwendet.

Klonierungsvektoren:

In Tab. 4.6 sind alle verwendeten Vektoren aufgelistet, die für weitere Klonierungen verwendet wurden. Als binärer Vektor wurde der pAMPAT Vektor eingesetzt, der in *E.coli* Ampicillin-resistent ist. In Pflanze kann mit Basta selektiert werden. Alle Entry Klone haben eine Kanamycin Resistenz in *E.coli*. Der pUC und pBS Vektor sind Ampicillin.-resistent, wie auch alle Hefevektoren in *E.coli*. In Hefe zeigen die Beuteplasmide (GAL4 Aktivierungsdomäne) eine Wachstumsresistenz in Leucin-Mangelmedium. Die Köderplasmide (GAL4 Bindedomäne) haben eine Wachstumsresistenz in Tryptophan Mangelmedium.

Subklone:

YFP (ohne Stopp) [pBS]

YFP wurde mit den Primern YFP-forw. und YFP(-Stop)-rev. amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den pBS Vektor über SmaI ligiert.

GFP (ohne Stopp) [pBS]

Das GFP aus dem Vektor pMyb5::GFP-GL3 wurde über 5´HindIII und 3´EcoRI in den pBS Vektor kloniert. Mit dem GFP wurde auch der 3´vom GFP liegende Alanin-Linker mit ausgeschnitten, der aus 10 Alaninen besteht.

Zellkompartiment-Marker:

GFP-ER [pEntr]

GFP-ER wurde mittels der Primer attB-GFP-ER-forw. und attB-GFP-ER-rev. (s.4.13), welche die attB-Gateway Rekombinationsstellen tragen, amplifiziert. Durch BP-Reaktion wurde das PCR-Produkt in den pDONR201 Vektor rekombiniert.

Der GFP-ER pEntr Klon wurde über LR-Reaktion in den pGL2 pAMPAT und pETC3 pAMPAT Vektor rekombiniert.

Tab. 4.6: Klonierungsvektoren.

Plasmidvektor	Verwendung
pBluescript KS (pBS)	Klonierungsvektor mit MCS für Subklonierungen (Stratagene).
pUC18	Klonierungsvektor mit MCS für Subklonierungen (GenBank L09136).
pDONR201	Gateway Klonierungsvektor mit attP-Kassette, geeignet für BP-Reaktionen (Invitrogen).
pENTR1A	Gateway Klonierungsvektor mit MCS in attL-Kassette, für Ligationen, geeignet für LR-Reaktionen (Invitrogen).
pENTR4	Gateway Klonierungsvektor mit MCS in attL-Kassette, für Ligationen, geeignet für LR-Reaktionen (Invitrogen).
p35S::pAMPAT	Binärer Vektor mit attR-Kassette, geeignet für LR-Reaktionen, enthält CaMV 35S Promotor (GenBank AY027531), Promotor austauschbar über AscI und XhoI Schnittstelle.
pAS 2.1	Hefevektor mit GAL4-Bindedomäne (BD) und 3' attR-Kassette für Gateway Klonierung, Köderplasmid (Clontech).
pAct	Hefevektor mit Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und 3' attR-Kassette für Gateway Klonierung, Beuteplasmid (Clontech).
pBridge / pMet::attR	Hefevektor mit Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und attR-Kassette für Gateway Klonierung 3' von Methionin-reprimierbaren Promoter (pMet).
pBridge	Hefevektor mit Gal4-Aktivierungsdomäne und Methionin-reprimierbaren Promoter (Clontech).
pRbc::pAMPAT	Hergestellt von Daniel Bouyer, binärer Vektor, Rubisco-Promoter (pRbc) trägt die ATRbcS2b Untereinheit (1777bp) und 3'attR-Gateway Kassette, geeignet für LR-Reaktionen.
pCPC::pAMPAT	Hergestellt von Martina Pesch, binärer Vektor, trägt den 5'Bereich des <i>Caprice</i> (CPC) Promotors (pCPC), 1000bp lang, 3'attR-Gateway Kassette, geeignet für LR-Reaktionen.
pTRY::pAMPAT	Hergestellt von Martina Pesch, binärer Vektor, trägt den 5'Bereich des <i>Triptychon</i> (TRY) Promotors (pTRY), 1414bp lang, 3'attR-Gateway Kassette, geeignet für LR-Reaktionen.
GUS-pEntr	Gateway Klonierungsvektor mit attL-Seiten, trägt GUS cDNA, geeignet für LR-Reaktionen (Invitrogen).
p35S::DRONPA-GFP	Binärer Vektor pAMPAT mit attR-Kassette, geeignet für LR-Reaktionen, enthält CaMV 35S Promotor, 3' von attR-Kassette ist DRONPA-GFP fusioniert. Von Daniel Bouyer hergestellt.
p35S::YFP-pENSG	Binärer Vektor pENSG-YFP für N-terminale YFP Fusionen, 3' von YFP attR-Kassette, geeignet für LR-Reaktionen. Basiert auf den Vektor pXCS (Gen Bank AY457636).
pMyb5::GFP-GL3	Vektor von David Marks. Die GFP-GL3 Fusion wurde für Klonierungen verwendet.

In der Tabelle sind Sub-Vektoren, Entry Vektoren (pEntr) und binäre Vektoren aufgelistet, die für Klonierungen verwendet wurden. Bei den Vektoren pAMPAT und pENS handelt es sich um binäre Vektoren.

ETC3-Vektoren:

ETC3 [pEntr]

Aus Columbia cDNA wurde die *ETC3* cDNA mit den Primern attB1-ETC3-forw. und attB2-ETC3-rev. (s. 4.13), welche die attB-Gateway Rekombinationsstellen tragen, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über BP-Reaktion in den pDONR201 Vektor rekombiniert.

GFP-ETC3 [pEntr] / YFP-ETC3 [pEntr]

Aus Columbia cDNA wurde die *ETC3* cDNA mit den Primern ETC3-XbaI-forw. und ETC3-SacI-rev. (s. 4.13), welche 5' die XbaI und 3' SacI Schnittstellen tragen, amplifiziert. Über die 5' XbaI und 3' SacI Schnittstelle wurde *ETC3* 3' von GFP „in frame“ in den GFP pBS Vektor kloniert. GFP-ETC3 diente als Matrize für die Amplifikation mit den Primern attB1-GFP-forw. und attB2-ETC3-rev. (s. 4.13), welche die attB-Gateway Rekombinationsstellen tragen. Das PCR-Produkt wurde über BP-Reaktion in den pDONR201 Vektor rekombiniert.

5'pETC3 [pUC18] / 5'pETC3 [pAMPAT]

Der *ETC3* Promotor wurde aus genomischer DNA von Columbia amplifiziert. Als Promotor wurden 2023bp aufwärts des Start-Codons von *ETC3* gewählt. Die Region wurde mit den Primern 5'Prom.ETC3-forw. und 5'Prom.ETC3-rev. amplifiziert (s. 4.13), welche 5' die Ascl und 3' die XhoI Schnittstellen tragen. Das PCR-Produkt wurde über „Blunt-End“ Ligation in den pUC18 Vektor über SmaI kloniert. Über die Ascl und XhoI Schnittstelle wurde das Promotorfragment in den pAMPAT Vektor kloniert.

Der *ETC3* Promotor wurde in einer zweiten Klonierung um 361bp verlängert. Als Matrize diente genomische DNA aus Columbia. Das Promotorfragment von 2384bp wurde mit den Primern pETC3-W-forw. und pETC3-W-rev. amplifiziert (s. 4.13), welche 5' die Ascl und 3' die XhoI Schnittstellen tragen. Das PCR-Produkt wurde über „Blunt-End“ Ligation über SmaI in den pUC18 Vektor kloniert. Über die Ascl und XhoI Schnittstelle wurde das Promotorfragment in den pAMPAT Vektor kloniert. Die *ETC3* Entry-Klone, wie auch die *ETC3* Promotor pAMPAT Klone wurden über LR-Reaktionen rekombiniert, wobei die in Tab. 4.7 aufgeführten binären Vektoren hergestellt wurden.

Tab. 4.7: Binäre ETC3 Vektoren.

ETC3 Überexpressions-Konstrukte [pAMPAT]	ETC3 Misexpressions-Konstrukte [pAMPAT]	ETC3 endogene Expressions-Konstrukte [pAMPAT]
p35S::ETC3	pRbc::ETC3	5'pETC3::ETC3
p35S::YFP-ETC3	pRbc::YFP-ETC3	5'pETC3::YFP-ETC3
p35S::GFP-ETC3	5'pCPC::ETC3	5'pETC3::GUS
	5'pTRY::ETC3	5'pETC3::GFP-ER
		5'pETC3-W::GUS

Das ETC3 Konstrukt, sowie die Fusionskonstrukte mit ETC3 wurden mittels LR-Reaktionen in die aufgelisteten pAMPAT Vektoren rekombiniert, welche unterschiedliche Promotoren tragen. Die Promotoren sind durch ein vorstehendes p gekennzeichnet.

Köder- und Beuteplasmide:

Alle Hybridvektoren außer AD-ETC3 wurden von Ullrich Hermann oder von mir in unserer Diplomzeit hergestellt. Alle Gene lagen als Entry-Klone vor und wurden *via* LR-Reaktion in die Hefevektoren kloniert.

Die pBridge Hybridplasmide wurden über Ligationen hergestellt. Die interessierenden Gene wurden über HpaI und PstI aus den entsprechenden pAS-Vektoren ausgeschnitten und in den pBridge Vektor hinter die GAL4 Bindedomäne (BD) „in frame“ fusioniert.

Bei den pBridge+attR Vektoren wurde zunächst über LR-Reaktionen die Trichom-Regulatorgene hinter den Methionin-sensitiven Promotor (pMet) rekombiniert. Anschließend wurde GL1Δ (C-terminal 81bp deletiert) aus dem entsprechenden pAS Vektor in alle pBridge Vektoren über HpaI und PstI hinein ligiert. Alle Hefe Hybridplasmide sind in Tab. 4.8 aufgeführt.

Tab. 4.8: Hefevektoren.

Köderplasmide [pAS2.1]	Beuteplasmide [pAct]	Köderplasmide [pBridge]	Köderplasmide [pBridge +attR]
BD-ETC1	AD-GL1	BD-ETC1	BD-GL1Δ / pMet::ETC1
BD-ETC2	AD-GL1Δ	BD-ETC2	BD-GL1Δ / pMet::ETC2
BD-ETC3	AD-MYB23	BD-ETC3	BD-GL1Δ / pMet::ETC3
BD-CPC	AD-GL2	BD-CPC	BD-GL1Δ / pMet::CPC
BD-TRY	AD-GL3 /-GL396/-GL3-400	BD-TRY	BD-GL1Δ / pMet::TRY
BD-GL1Δ	AD-TTG1	BD-GL1^	
BD-SnF1	AD-ETC1		
	AD-ETC2		
	AD-ETC3		
	AD-CPC		
	AD-TRY		
	AD-SnF4		

Alle aufgelisteten Trichom-Regulatorgene wurden über LR-Reaktionen in die aufgelisteten Hefevektoren rekombiniert. Bei den Hefevektoren handelt es sich um Köder- und Beuteplasmide. Bei GL1Δ handelt es sich um eine verkürzte cDNA, C-terminal 81bp deletiert. Bei GL3-96 sind N-terminal 96 AS deletiert. Bei GL3-400 sind 400 AS N-terminal deletiert.

CPC- und TRY-Mutagenese:

Die Serine in der *CPC* cDNA an Position 73-75, 85-87 und 88-90 wurden durch PCRs mit Mismatch-Primern mutagenisiert. Mit den Primern CPC-Muta-(3xSer/3xAla)-forw. und CPC-Muta-rev. wurden die Serine in drei Alanine (Ala) umgewandelt. Mit den Primern CPC-Muta-(3xSer/3xGlu)-forw. und CPC-Muta-rev. wurden die Serine in Glutamat (Glu) umgeschrieben, und mit den Primern CPC-Muta-(Del)-forw. und CPC-Muta-rev. wurden die Serine deletiert (Del) (Primersequenzen s. 4.13). Als Matrize für die PCRs diente der Entry Klon CPCpEntr.

Die Serine in der *TRY* cDNA an Position 58-60, 70-72 und 73-75 wurden durch PCRs mit Mismatch-Primern mutagenisiert. Mit den Primern TRY-Muta-(3xSer/3xAla)-forw. und TRY-Muta-rev. wurden die Serine in drei Alanine umgewandelt. Mit den Primern TRY-Muta-(3xSer/3xGlu)-forw. und TRY-Muta-rev. wurden die Serine in Glutamat umgeschrieben, und mit den Primern TRY-Muta-(Del)-forw. und TRY-Muta-rev. wurden die Serine deletiert (Primersequenzen s. 4.13). Als Matrize für die PCRs diente der Entry Vektor TRY pEntr.

Die PCRs wurden mit der Pfu-Polymerase durchgeführt, wobei jeweils das ganze Plasmid amplifiziert wurde. Die Primerpaare hybridisieren in der Nähe der drei Serine. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit DpnI verdaut, um den Matrix Vektor zu zerstören. Nach der Gelextraktion wurden die PCR-Produkte mittels der T4 Polynukleotid Kinase phosphoryliert und anschließend wieder religiert. Die relegierten Entry Klone wurden über LR-Reaktionen in binäre Vektoren unter die Kontrolle verschiedener Promotoren kloniert. Die binären Vektoren sind in Tab. 4.9 aufgeführt.

Tab. 4.9: Binäre CPC/TRY mutierte Vektoren.

Vektoren mit unveränderter cDNA [pAMPAT]	cDNA mutagenisiert 3x Serin zu 3x Alanin (Ala) [pAMPAT]	cDNA mutagenisiert 3x Serin zu 3x Glutamat (Glu) [pAMPAT]	cDNA mutagenisiert 3x Serin deletiert (Del) [pAMPAT]
p35S::CPC	p35S::CPC-Ala	p35S::CPC-Glu	p35S::CPC-Del
pCPC::CPC	pCPC::CPC-Ala	pCPC::CPC-Glu	pCPC::CPC-Del
pRBC::CPC	pRBC::CPC-Ala	pRBC::CPC-Glu	pRBC::CPC-Del
p35S::TRY	p35S::TRY-Ala	p35S::TRY-Glu	p35S::TRY-Del
pTRY::TRY	pTRY::TRY-Ala	pTRY::TRY-Glu	pTRY::TRY-Del
pRBC::TRY	pRBC::TRY-Ala	pRBC::TRY-Glu	pRBC::TRY-Del

Die *TRY* und *CPC* cDNA wurde an 3 Serinen (Ser) entweder durch Alanin (Ala) oder Glutamat (Glu) ersetzt, oder die Serine wurden deletiert (Del). Die *CPC*-mutagenisierten Konstrukte, sowie die *TRY*-mutagenisierten Konstrukte wurden mittels LR-Reaktionen in die aufgelisteten pAMPAT Vektoren rekombiniert, welche unterschiedliche Promotoren tragen. Die Promotoren sind durch ein vorstehendes p gekennzeichnet.

GL3 Klonierungen:

Aus dem Vektor pMyb5::GFP-GL3 (s. Tab. 4.6) wurde die Columbia *GL3* cDNA über 5'EcoRI und 3'XbaI ausgeschnitten und in den GFP pBS Vektor 3'von *GFP* „in frame“ kloniert. Über 5'NcoI und 3'EcoICRI (Blunt-Cutter) wurde *GL3* in den Entry Vektor pEntr4 ligiert (5'NcoI und 3'EcoRV). Über LR-Reaktion wurde *GL3* unter Kontrolle des p35S Promotors in den Vektor pAMPAT rekombiniert.

p35S::YFP-CPC [pENSG]:

Klonierung durch LR-Reaktion von *CPC* [pEntr] in den binären Vektor pENSG.

p35S::CPC-GFP-DRONPA:

Klonierung von DRONPA-GFP in den Vektor pAMPAT mit 35S-Promotor wurde von Daniel Bouyer durchgeführt: Die CPC cDNA ohne Stopp-Codon (von Martina Pesch hergestellt) wurde mittels LR-Reaktion 5' von DRONPA-GFP in "frame" kloniert.

4.8 Mikroskopie

Die Expression von fluoreszierenden Genfusionen im Blatt oder in Zwiebelepidermis wurde mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop von Leica (TCS SP2) analysiert, wobei die Bilder mit der Leica Konfokal Software angefertigt wurden.

Histologische Analysen wurden mit dem Leica DMRA2 UV-Mikroskop durchgeführt und die Bilder mit der DISKUS Software (DISKUS, technisches Büro Hilgers, Königswinter) angefertigt.

Für die Laser-Ablationen wurde das Multiphoton (2-Photon) Laser Scanning Mikroskop der AG Kloppenburg (Zoologisches Institut) verwendet, das aus dem folgenden Equipment zusammengesetzt ist. Das Multiphoton Mikroskop besteht aus einem Spektra Physics Mai Tai Ti:S Laser mit a 20W Argon pump (Spectra Physics, Mountain View, CA), einer Olympus Fluoview FV300 Scanbox und einem Aufrechtbühne Olympus BX51WI Mikroskop mit 40x LUMplan FI/IR 0.8 Objectiv (Olympus, Hamburg, Germany). Ein Hamamatsu HC125-02 Photomultiplier (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland).

4.9 GUS-Färbung

Das Expressionsmuster von ETC3 wurde histologisch durch die Aktivität des Reportergens GUS (β -Glucuronidase) analysiert, wie in Sessions and Yanofsky (1999) beschrieben. Damit die X-Gluc Lösung (s. 4.14) gut in das Blattmaterial eindringen kann, wurden die Proben in der Lösung für 20min bei 0,8 bar Vakuum-infiltriert. Anschließend wurden die Proben bei 37°C zwischen 5h und 15h inkubiert. Zum Auswaschen des Chlorophylls wurden die Blätter in 70% EtOH gewaschen.

4.10 Propidiumiodid-Färbung

Der Farbstoff Propidiumiodid (Sigma) wurde zum einen zur Erkennung ablatierter Zellen und zum anderen als Zellmembranmarker eingesetzt. Der Farbstoff kann nur die perforierte Zellmembran von toten Zellen durchdringen und färbt die Zellkerne an. Bei lebenden Zellen bleibt der Farbstoff an der intakten Zellmembran hängen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 488nm und das Emissionsmaximum bei 590nm. Propidiumiodid wurde als 200µM Lösung eingesetzt. Das Blattmaterial wurde 5min in der Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen.

4.11 Partikel-Beschuss

Der Beschuss von Pflanzenmaterial mit GFP- / YFP-Fusionsplasmiden wurde mit dem Biolistic Particle Delivery System von Bio-Rad durchgeführt. Der Beschuss diente zur transienten Expression von Fusionsproteinen, um deren Zelllokalisierung und/oder Mobilität im Zellgewebe zu analysieren. Weiterhin diente die Methode zur Überprüfung der Funktionalität von Fusionskonstrukten. Für einen Beschuss wurden 5µl Gold (1micron, 30mg/ml) eingesetzt. Je 300ng Plasmid-DNA, 10µl 2,5M CaCl₂ und 4µl 0,1M Spermidin wurden unter ständigem vortexen an die Goldpartikel gebunden. Anschließend wurde für 15min gevortext und dann für 10min bei RT inkubiert. Die Partikel wurden mit 50µl 70% EtOH und anschließend mit 20µl 100% EtOH gewaschen. Die Partikel wurden in 12ml 100% EtOH aufgenommen und auf die Membranen pipettiert. Der Beschuss erfolgte nach den Angaben des Herstellers bei 900psi.

4.12 Mikroinjektionsanlage

Für mechanische Zell-Ablationen wurde der hydraulische Mikromanipulator (Narashige, Japan), der mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop von Leica (TCS SP2) gekoppelt ist verwendet. Als Nadeln dienten Borosilikat-Glas Mikro-Kapillaren (Kwik-FilTM, 1mm Durchmesser, Spitz 1µM).

4.13. Primer-Sequenzen

ETC3-forw.	ATGGATAACCATCGCAGGAC
ETC3-rev.	CAATTTTTCATGACCCAAA
ETC3-1.-Exon-forw.	ATGGATAACCATCGCAGGAC
ETC3-2.-Exon-rev.	ATGCATTGAGAGACCAAAT
Aktin-forw.	TGCGACAATGGAAGTGAATG
Aktin-rev.	GGATAGCATGTGGAAGTGCATAC
YFP-forw.	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
YFP (-Stop)-rev.	CTTGTACAGCTCGTCCAT
attB1-GFP-ER-forw.	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGAAGACTAATCTT TTTCTCTTTCTCAT
attB2-GFP-ER-rev.	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAAGCTCATCATGT TT
attB1-ETC3-forw.	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGGATAACCATCG CAGGACTAAGCA
attB2-ETC3-rev.	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAATTTTTCATGAC CCAAAACCTC
ETC3-XbaI-forw.	TCTAGAATGGATAACCATCGCAGGAC
ETC3-SacI-rev.	GAGCTCTCAATTTTTCATGACCCAA
attB1 GFP-forw.	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGGTGAGCAAGGG CGAGGAGCTGT
5'-Prom. ETC3-forw.	ATTCTGGATTCCCTATACATAAC
5'-Prom. ETC3-rev.	GTCAAACGGCACCGTATTAC
pETC3-W-forw.	GGCGCGCCCGCAGCCCTGAAAACAGCTAAGAACAGTCTCT
pETC3-W-rev.	CTCGAGGCGATGGTTATCCATGTCAA
CPC-Muta-(Del)-forw.	GAAGAGGTGATCGAATGGGAAGCTGTGAAGATGTCA
CPC-Muta-(3xSer/3xAla)-forw.	GCCGAAGAGGTGGCCGCCATCGAATGGGAAGCTGTGAAGA
CPC-Muta-rev.	ACAAGAAGCCTTGGCTTTGC
CPC-Muta-(3xSer/3xGlu)-forw.	GAGGAAGAGGTGGAGGAGATCGAATGGGAAGCTGTGAAGA
TRY-Muta-(Del)-rev.	GAAGAAGTGAATCGAATGGGAGTTTATCAAC
TRY-Muta-(3xSer/3xAla)-forw.	GCCGAAGAAGTGGCCGCCATCGAATGGGAGTTTATCAA
TRY-Muta-(3xSer/3x Glu)-forw.	GAGGAAGAAGTGGAGGAGATCGAATGGGAGTTTATCAA
TRY-Muta-rev.	GTCATGGAGGGCGATTTTGTGT
ETC1 (ATG)-rev.	ATGAATACGCAGCGTAAGTCGA
ETC1 (+Stop)-forw.	TCAACGTAATTGAGATCTTCGATG
ETC2 B-forw.	ATGGATAATACCAACCGTCTTCG
ETC2 B-rev.	TTACAATTTTAGATTTTCTTGGAGATT
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG

JL202	CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC
Hyg-B-forw.	CTATTTCTTTGCCCTCGGAC
Hyg-B-rev.	CCTGACCTATTGCATCTCCC
genom. CPC (A)-forw.	TCATTTCTTAAAAAAGTCTCTTCGTCTG
genom. CPC (A)-rev.	ATGTTTCGTTTCAGACAAGGC
TRY genom-forw.	ATGGATAAACTGAC
TRY genom-rev.	CTAGGAAGGATAGAT
k GL3-forw..	CGCGCCTATGTTTCAGTACGG
GL3 (Ampl. -Stop)-rev.	ACAGATCCATGCAACCCTTT
EGL3-forw.	GCAGCAGAAGTCAAATTGACCAG
EGL3-rev.	ACCGTCTCCGGTTGACGACT

4.14 Lösungen / Medien

LB-Medium (engl. <u>lysogeny broth</u>) Nährmedium für E.coli	(400ml)	4g Pepton (Roth)
		2g Hefe Extrakt (Roth)
		4g NaCl (Roth)
	für Platten	+6,4g Micro Agar (Duchefa Biochemie)

Medium auf pH 7 mit NaOH eingestellt und für 20min autoklaviert. Bei Verwendung als Selektionsmedium wurde dem autoklavierten Medium das geeignete Antibiotikum (s. Tab. 4.2) zugefügt.

YEB-Medium (engl. <u>yeast extract with beef extract</u>) Nährmedium für Agrobakterien	(400ml)	2g Fleischextrakt (Merck)
		0,4g Hefe Extrakt (Roth)
		2g Pepton (Roth)
		2g Saccharose (Roth)
		8ml Magnesium Heptahydrat 1M (Roth)
	für Platten	+6,4g Micro Agar (Duchefa Biochemie)

Lösung für 20min autoklaviert. Bei Verwendung als Selektionsmedium wurde dem autoklavierten Medium das geeignete Antibiotikum (s. Tab. 4.2) zugefügt.

MS-Medium (engl. <u>Murashige & Skoog Medium</u>) Nährmedium für Arabidopsis	(400ml)	1,76g MS (Duchefa Biochemie)
		4g Saccarose (Roth)
	für Platten	+3,2g Plantagar (Duchefa Biochemie)

Medium auf pH 5,8 mit 2N KOH eingestellt und für 20min autoklaviert. Bei Verwendung als Selektionsmedium wurde dem autoklavierten Medium das geeignete Antibiotikum (s. Tab. 4.2) zugefügt.

10x Auftragspuffer (10ml) (für DNA Gelelektrophorese)	1ml	0,5M EDTA pH8 (Roth)
	5ml	100% Glycerin (Roth)
	25mg	Bromphenolblau (Biomol)
	25mg	Xylene Cyanol (Roth)

Mit H₂O_{dest} auf 10ml aufgefüllt.

X-Gluc Lösung (5ml) Lösung für GUS-Färbung	100µl	10% Triton X-100 (Roth)
	500µl	0,5M NaPO ₄ , pH7,2 (Roth)
	100µl	100mM K ₄ Fe(CN) ₆ 3H ₂ O (Sigma)
	100µl	100mM K ₃ Fe(CN) ₆ (Sigma)
	100µl	100mM X-Gluc (Fermentas)
	4100µl	H ₂ O

Lösung immer kurz vor Gebrauch angesetzt.

ψ-Medium (1L) Medium für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	20g	Trypton (Roth)
	5g	Hefe Extrakt (Roth)
	4g	MgSO ₄ *7H ₂ O (Roth)
	0,75g	KCl (Roth)

Medium mit 1M KOH auf pH 7,6 eingestellt und für 20min autoklaviert.

TFB1 (100ml) Medium für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	1,21g	RbCl ₂ (Roth)
	0,99g	MnCl ₂ *4H ₂ O (Roth)
	0,3g	KOAc (Roth)
	0,15g	CaCl ₂ (Roth)
	15ml	100% Glycerol (Roth)

Lösung mit 0,2M HOAc auf pH 5,8 eingestellt und steril filtriert. Bei 4°C gelagert

TFB2 (20ml) Medium für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	0,024g	RbCl ₂ (Roth)
	0,221g	CaCl ₂ (Roth)
	0,042g	MOPS (Biomol)
	3ml	100% Glycerol (Roth)

Lösung mit NaOH auf pH 7 eingestellt und steril filtriert. Bei 4°C gelagert

2xCTAB-Puffer (100ml) Puffer für Präparation von genomischer DNA	8,2g	NaCl (Roth)
	2g	CTAB (Sigma)
	10ml	1M Tris (Roth)
	5ml	0,5M EDTA (Roth)

Puffer auf pH 8,2 mit NaOH eingestellt und für 20 min. autoklaviert. Bei RT gelagert.

YPAD-Medium (engl. <u>Y</u> east <u>E</u> xtract- <u>P</u> eptone- <u>A</u> denine- <u>D</u> extrose) Nährmedium für Hefen	(400ml)	8g	Pepton (Roth)
		4g	Hefe Extrakt (Roth)
		40mg	Adenin (Sigma)
		20ml	40% Glucose, steril filtriert (Roth)
für Platten		7,2g	Agar (Invitrogen)

Medium auf pH 5,8 mit 25% HCl eingestellt und für 15 min. autoklaviert. Glucose anschließend bei ca. 55°C hinzugefügt.

SD-Medium (engl. <u>S</u> election- <u>D</u> rop <u>o</u> ut Medium) Selektionsmedium für Hefen	(400ml)	0,68g	Yeast Nitrogen Base w/o (NH ₄)SO ₄ (BD)
		2g	Ammoniumsulfat (Roth)
		0,24g	DO Supplement (Clontech)
			-Leu/-Trp/-His od. -Leu/-Trp/-His/-Met
		40mg	Leucin (Sigma)
		20mg	Tryptophan (Sigma)
		8mg	Histidine (Sigma)
		40mg	Adenin (Sigma)
		20ml	40% Glucose, steril filtriert (Roth)
für Platten		7,2g	Agar (Invitrogen)

Medium auf pH 5,8 mit 1M NaOH eingestellt und für 15min autoklaviert. Glucose anschließend bei ca. 55°C hinzugefügt.

Z-Puffer Puffer für ONPG Tests	(1L)	10,69g	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O (Roth)
		6,22g	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O (Roth)
		0,75g	KCl (Roth)
		0,246g	MgSO ₄ *7H ₂ O (Roth)

Puffer auf pH 7 eingestellt und für 20min autoklaviert. Bei RT gelagert.

Z-Puffer+ β-mercaptoethanol Puffer für ONPG Tests	(100ml)	0,27ml	β-mercaptoethanol (Roth)
			In Z-Puffer gelöst. Vor jeder Anwendung frisch angesetzt.

ONPG (<u>o</u> -Nitrophenyl β-D- Galactopyranosid)	(1ml)	4mg	ONPG (Sigma #N-1127)
			Pulver in Z-Puffer gelöst. Vor jeder Anwendung frisch angesetzt.

5. Literaturverzeichnis

Agrawal A, Conner J, Stinchcombe J. (2004): Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecology Letters* 7:1199-1208.

Agrawal AA, Conner JK, Johnson MT, Wallsgrove R. (2002): Ecological genetics of an induced plant defense against herbivores: additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. *Evolution* 56(11):2206-13.

Bouyer D, Geier F, Kragler F, Schnittger A, Pesch M, Wester K, Balkunde R, Timmer J, Fleck C, Hülskamp M. (2008): Two-dimensional patterning by a trapping/depletion mechanism: the role of TTG1 and GL3 in Arabidopsis trichome formation. *PLoS Biol.* 6(6):e141.

Bünning E. (1951): Über die Differenzierungsvorgänge in der Cruciferenwurzel. *Planta* 39:126-53.

Clough SJ, Bent AF. (1998): Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16, 735-43.

Crawford KM and Zambryski PC. (2000): Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr Biol.* 10: 1032–1040.

Crawford KM and Zambryski PC. (2001): Non-Targeted and Targeted Protein Movement through Plasmodesmata in Leaves in Different Developmental and Physiological States. *Plant Physiol.* 125, 1802-1812.

Di Cristina M, Sessa G, Dolan L, Linstead P, Baima S, Ruberti I, Morelli G. (1996): The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *Plant J.* 10(3):393-402.

Digiuni S, Schellmann S, Geier F, Greese B, Pesch M, Wester K, Dartan B, Mach V, Srinivas BP, Timmer J, Fleck C, Hülskamp M. (2008): A competitive complex formation mechanism underlies trichome patterning on Arabidopsis leaves. *Mol Syst Biol.* 4:217.

Dolan L, Duckett C M, Grierson C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poethig S and Roberts K. (1994): Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of Arabidopsis. *Development* 120: 2465-2474.

Dolan L. (2006): Positional information and mobile transcriptional regulators determine cell pattern in the Arabidopsis root epidermis. *J Exp Bot.* 57(1):51-4.

Esau K. (1965): Plant Anatomy. *New York: Wiley.* 2nd ed.

Esch JJ, Chen M, Sanders M, Hillestad M, Ndkium S, Idelkope B, Neizer J, Marks MD. (2003): A contradictory GLABRA3 allele helps define gene interactions controlling trichome development in Arabidopsis. *Development* 130(24):5885-94.

- Fields S, Song O.** (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-6.
- Galway ME, Masucci JD, Lloyd AM, Walbot V, Davis RW, Schiefelbein JW.** (1994): The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the Arabidopsis root. *Dev Biol.* 166(2):740–754.
- Habuchi S, Ando R, Dedecker P, Verheijen W, Mizuno H, Miyawaki A, Hofkens J.** (2005): Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(27):9433-4.
- Haywood V, Kragler F and Lucas WJ.** (2002): Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* 14:S303–S325.
- Hülkamp M and Schnittger A.** (1998): Spatial regulation of trichome formation in Arabidopsis thaliana. *Seminars in Cell and Dev. Biol.* 9, 213-220.
- Hülkamp M, Misera S and Jürgens G.** (1994): Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell* 76, 555-566.
- Hülkamp M, Schnittger A and Folfers U.** (1999): Pattern formation and cell differentiation: trichomes in Arabidopsis as a genetic model system. *Int. Rev. Cytol.* 186, 147-178.
- Hung CY, Lin Y, Zhang M, Pollock S, Marks MD and Schiefelbein J.** (1998): A Common Position-Dependent Mechanism Controls Cell-Type Patterning and GLABRA2 Regulation in the Root and Hypocotyl Epidermis of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117: 73-84.
- Hunter T, Karin M.** (1992): The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70(3):375-87.
- Imlau A, Truernit E, Sauer N.** (1999): Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 11(3):309-22.
- Ishida T, Hattori S, Sano R, Inoue K, Shirano Y, Hayashi H, Shibata D, Sato S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada T.** (2007): Arabidopsis TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell* 19(8):2531-43.
- Ishida T, Kurata T, Okada K, Wada T** (2008): A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu Rev Plant Biol.* 59:365-86.
- Johnson CS, Kolevski B and David R Smyth DR.** (2002): TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor. *The Plant Cell* 14, 1359-1375.

- Kaminuma E, Yoshizumi T, Wada T, Matsui M, Toyoda T.** (2008): Quantitative analysis of heterogeneous spatial distribution of Arabidopsis leaf trichomes using micro X-ray computed tomography. *Plant J.* 56(3):470-82.
- Kim JY, Rim Y, Wang L and Jackson D.** (2005). A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev.* 19: 788–793.
- Kim JY, Yuan Z and Jackson D.** (2003): Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in Arabidopsis. *Development* 130, 4351-4362.
- Kim JY, Yuan Z, Cilia M, Khalfan-Jagani Z and Jackson D.** (2002): Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of Arabidopsis. *PNAS USA* 99: 4103-4108.
- Kirik V, Lee MM, Wester K, Herrmann U, Zheng Z, Oppenheimer D, Schiefelbein J, Hülkamp M.** (2005): Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development* 132(7):1477-85.
- Kirik V, Schnittger A, Radchuk V, Adler A, Hülkamp M and Bäuml H.** (2001): Ectopic Expression of the Arabidopsis AtMYB23 Gene Induces Differentiation of Trichome Cells. *Developmental Biology* 235(2): 366-377.
- Kirik V, Simon M, Hülkamp M Schiefelbein J.** (2004a): The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis. *Developmental Biology* 268(2): 506-513.
- Kirik V, Simon M, Wester K, Schiefelbein J, Hülkamp M.** (2004b): ENHANCER of TRY and CPC 2 (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 55(3):389-98.
- Koornneef M, Dellaert LWM and Veen JHVD.** (1982). EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in Arabidopsis thaliana. *Mutat. Res.* 93, 109-123.
- Koornneef M.** (1981): The complex syndrome of ttg mutants. *Arabidopsis Information Service* 18, 45-51.
- Kragler F, Curin M, Trutnyeva K, Gansch A, Waigmann E.** (2003): MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol.* 132(4):1870-83.
- Kragler F, Monzer J, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ.** (2000): Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J.* 19(12):2856-68.
- Kurata T, Ishida T, Kawabata-Awai C, Noguchi M, Hattori S, Sano R, Nagasaka R, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Kato T, Sato S, Tabata S, Okada K, Wada T.** (2005): Cell-to-cell movement of the CAPRICE protein in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. *Development* 132(24):5387-98.

- Larkin JC, Brown ML and Schiefelbein J.** (2003): How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 403-30.
- Larkin JC, Marks MD, Nadeau J and Sack F.** (1997): Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell* 9, 1109-1120.
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Lloyd AM, Paparozzi ET and Marks MD.** (1994): Roles of the glabrous1 and transparent testa glabra genes in Arabidopsis trichome development. *Plant Cell* 6, 1065-1076.
- Larkin JC, Walker JD, Bolognesi-Winfield AC, Gray JC, Walker AR.** (1999): Allele-specific interactions between ttg and gl1 during trichome development in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 151(4):1591-604.
- Larkin JC, Young N, Prigge M, Marks MD.** (1996): The control of trichome spacing and number in Arabidopsis. *Development* 122(3):997-1005.
- Larkin, JC, Oppenheimer DG, Pollock S and Marks MD.** (1993): Arabidopsis GLABROUS1 gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell* 5, 1739-1748.
- Lee K, Avondo J, Morrison H, Blot L, Stark M, Sharpe J, Bangham A, Coen E.** (2006): Visualizing plant development and gene expression in three dimensions using optical projection tomography. *Plant Cell* 18(9):2145-56.
- Lee MM and Schiefelbein J.** (2001): Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in Arabidopsis. *Development* 128, 1539-1546.
- Maciejewski PM, Peterson FC, Anderson PJ, Brooks CL.** (1995): Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *J Biol Chem* 270(46):27661-5.
- Marks MD, Esch J, Herman P, Sivakumaran S and Oppenheimer D.** (1991): A model for cell-type determination and differentiation in plants. *Symp Soc Exp Biol.* 45, 77-87.
- Marks MD, Esch JJ.** (2003): Initiating inhibition. Control of epidermal cell patterning in plants. *EMBO* 4(1):24-5.
- Marks MD.** (1997): Molecular genetic analysis of trichome development in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:137-163.
- Masucci JD, Rerie WG, Foreman DR, Zhang M, Galway ME, Marks MD and Schiefelbein JW.** (1996): The homeobox gene GLABRA2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of Arabidopsis thaliana. *Development* 122(4): 1253-1260.

- Mauricio R, Rausher MD.** (1997): Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* 51:1435–1444.
- Meek DW, Street AJ.** (1992): Nuclear protein phosphorylation and growth control. *Biochem J.* 1;287 (Pt 1):1-15.
- Meinhardt H, Gierer A.** (1974): Applications of a theory of biological pattern formation based on lateral inhibition. *J Cell Sci.* 15(2):321-46.
- Meinhardt H, Gierer A.** (2000): Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* 22(8):753-60.
- Meyerowitz EM and Pruitt RE.** (1985): Arabidopsis thaliana and plant molecular genetics. *Science* 229, 1214-1218.
- Meyerowitz EM.** (1989): Arabidopsis, a useful weed. *Cell* 56, 263-269
- Morohashi K, Zhao M, Yang M, Read B, Lloyd A, Lamb R and Grotewold E.** (2007): Participation of the Arabidopsis bHLH Factor GL3 in Trichome Initiation Regulatory Events. *Plant Physiol.* 145, 736-746.
- Nadeau JA, Sack FD.** (2002): Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science* 296(5573):1697-700.
- Ohashi Y, Oka A, Ruberti I, Morelli G, Aoyama T.** (2002): Entopically additive expression of GLABRA2 alters the frequency and spacing of trichome initiation. *Plant J.* 29(3):359-69.
- Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J and Marks MD.** (1991): A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell* 67, 483-493.
- Payne CT, Zhang F and Lloyd AM.** (2000): GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* 156, 1349-1362.
- Perbal MC, Haughn G, Saedler H and Schwarz-Sommer Z.** (1996): Non-cell-autonomous function of the Antirrhinum floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 122(11): 3433-3441
- Pesch M, Hülkamp M.** (2004): Creating a two-dimensional pattern de novo during Arabidopsis trichome and root hair initiation. *Curr Opin Genet Dev.* 14(4):422-7.
- Raven JA.** (2002): Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* 153 (3), 371-386

- Rerie WG, Feldmann KA and Marks MD.** (1994): The *glabra2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in Arabidopsis. *Genes Dev.* 8, 1388-1399.
- Sachs T.** (1978): The development of spacing patterns in the leaf epidermis. In *The clonal basis of development*, ed. S Subtelny, IM Sussex, pp. 161-183.
- Schellmann S, Hülkamp M.** (2005): Epidermal differentiation: trichomes in Arabidopsis as a model system. *Int J Dev Biol.* 49(5-6):579-84.
- Schellmann S, Schnittger A, Kirik V, Wada T, Okada K, Beermann A, Thumfahrt J, Jürgens G and Hülkamp M.** (2002): TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *EMBO Journal* 21, 5036-5046.
- Schiefelbein J.** (2003): Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol.* 6(1):74-8.
- Schnittger A, Folkers U, Schwab B, Jürgens G and Hülkamp M.** (1999): Generation of a spacing pattern: the role of TRIPTYCHON in trichome patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 1105-1116.
- Schnittger A, Folkers U, Schwab B, Jürgens G and Hülkamp M.** (1999): Generation of a spacing pattern: the role of TRIPTYCHON in trichome patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* 11, 1105-1116.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D.** (2001): Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52:627-658.
- Schwab B, Mathur J, Saedler R, Schwarz H, Frey B, Scheidegger C, Hülkamp M.** (2003): Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: actin controls the spatial organization of microtubules. *Mol Genet Genomics* 269(3):350-60.
- Sessions A, Yanofsky MF, Weigel D.** (2000): Cell-Cell Signaling and Movement by the Floral Transcription Factors LEAFY and APETALA1. *Science* 289:779-781.
- Sessions A, Yanofsky MF.** (1999): Dorsoventral patterning in plants. *Genes Dev.* 3(9):1051-4.
- Simon M, Lee MM, Lin Y, Gish L, Schiefelbein J.** (2007): Distinct and overlapping roles of single-repeat MYB genes in root epidermal patterning. *Dev Biol.* 311(2):566-78.
- Szymanski DB, Jilk RA, Pollock SM and Marks MD.** (1998): Control of GL2 expression in Arabidopsis leaves and trichomes. *Development* 125, 1161-1171.

- Szymanski DB, Lloyd AM, Marks MD.** (2000): Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 5(5):214-9.
- Tominaga R, Iwata M, Sano R, Inoue K, Okada K, Wada T.** (2008): *Arabidopsis* CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to trichome and root hair formation. *Development* 135(7):1335-45.
- Wada T, Kurata T, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Tachibana T, Goto K, Marks MD, Shimura Y and Okada K.** (2002): Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 129, 5409-5419.
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y and Okada K.** (1997): Epidermal Cell Differentiation in *Arabidopsis* Determined by a Myb Homolog, CPC. *Science* 277, 1113-1116.
- Waigmann E, Chen MH, Bachmaier R, Ghoshroy S, Citovsky V.** (2000): Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* 19(18):4875-84.
- Waigmann E, Lucas WJ, Citovsky V, Zambryski P.** (1994b): Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4):1433-7.
- Waigmann E, Zambryski P.** (1994a): Plasmodesmata. Gateways for rapid information transfer. *Curr Biol.* 4(8):713-6.
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell T L, Esch J J, Marks MD and Gray JC.** (1999): The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11, 1337-1350.
- Wang S, Hubbard L, Chang Y, Guo J, Schiefelbein J and Chen JG.** (2008): Comprehensive analysis of single-repeat R3 MYB proteins in epidermal cell patterning and their transcriptional regulation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 8: 81.
- Wang S, Kwak SH, Zeng Q, Ellis BE, Chen XY, Schiefelbein J, Chen JG.** (2007): TRICHOMELESS1 regulates trichome patterning by suppressing GLABRA1 in *Arabidopsis*. *Development* 134(21):3873-82.
- William J, Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, Nguyen L, Baker L, Ding B, Hake S.** (1995): Selective Trafficking of KNOTTED1 Homeodomain Protein and Its mRNA Through Plasmodesmata. *Science* 270: 1980-1983.
- Winter N, Kollwig G, Zhang S, Kragler F.** (2007): MPB2C, a microtubule-associated protein, regulates non-cell-autonomy of the homeodomain protein KNOTTED1. *Plant Cell* 19(10):3001-18.

- Wolpert L, Stein WD.** (1984): Positional information and pattern formation. In *Pattern Formation: A Primer in Developmental Biology*, ed. GM Malacinski, SV Bryant, pp. 3-21. New York: Macmillan
- Wu X, Dinneny JR, Crawford KM, Rhee Y, Citovsky V, Zambryski PC and Weigel D.** (2003): Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex. *Development* 130: 3735-3745.
- Yang M, Sack FD.** (1995): The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in Arabidopsis. *Plant Cell* 7(12):2227-39.
- Zambryski P.** (2004): Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. *J Cell Biol.* 164(2): 165–168.
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne T and Lloyd A.** (2003): A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development* 130, 4859-4869
- Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A.** (2008): The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* 135(11):1991-9.
- Zimmermann IM, Heim MA, Weisshaar B, Uhrig JF.** (2004): Comprehensive identification of Arabidopsis thaliana MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J.* 40(1):22-34.

6. Anhang

Mathematisches Modell für die Modellierung von Signalreichweiten der Inhibitoren in Abhängigkeit von GL3

Der Effekt der Ausdünnung der Inhibitoren durch die Bindung an GL3 auf deren Mobilität wurde mit Hilfe eines mathematischen Modells analysiert. Der Inhibitor U wird in einer Zelle produziert (Quelle). Er diffundiert mit einer Ratenkonstante D in das Gewebe und wird mit einer Ratenkonstante λ abgebaut. U wird durch eine irreversible Bindung an GL3 (G) mit einer Ratenkonstante β verdünnt. Diese Annahmen führen zu folgender eindimensionaler Partial- Differentialgleichung für das Fließgleichgewichtsprofil von U :

$$D \frac{\partial^2 U}{\partial X^2} = U(\lambda + \beta G) \quad (1a)$$

$$U(X=0) = \kappa \quad (1b)$$

$$U(X=\infty) = 0. \quad (1c)$$

Die Konzentration von U an der Quelle ist κ , wie in der Randbedingung 1b dargestellt. Randbedingung 1c stellt sicher, dass das Profil von U gegen Null geht (mit $X \rightarrow \infty$), da die Quelle von U bei $X = 0$ die einzige Quelle im betrachteten Bereich darstellt. Im folgenden wird angenommen, dass GL3 räumlich uniform verteilt ist, d.h. $G(X) = \text{const.}$ Ein Skalierungsansatz wird benutzt, um Gleichung 1 dimensionslos darzustellen. Dies erlaubt es, nur die effektiven Parameter des Problems zu betrachten. Die Konzentrationen U und G , sowie die räumliche Koordinate X werden ersetzt:

$$u = U/\kappa, \quad g = G/\kappa, \quad x = X\sqrt{\lambda/D}.$$

Man beachte, dass der Faktor $\alpha = \sqrt{D/\lambda}$ die charakteristische Signalreichweite von U ist, wenn U nicht an G bindet, d.h. wenn $\beta = 0$. Bei einem Abstand α fällt die Konzentration von U auf 37% der Ausgangskonzentration. Werden die obigen Ersetzungen angewandt, läßt sich das jetzt dimensionslose System folgendermassen darstellen:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} = u\left(1 + \frac{\beta \kappa g}{\lambda}\right) \quad (2a)$$

$$u(x=0) = 1 \quad (2b)$$

$$u(x=\infty) = 0. \quad (2c)$$

Die Lösung von Gleichung 2 ist $u(x) = \exp(-x\sqrt{1+\gamma})$, worin $\gamma = (\beta\kappa g)/\lambda$ den einzigen effektiven Parameter des Problems darstellt. Dieser ist einfach zu interpretieren, da er das Verhältnis von zwei Zeitgrößen darstellt: die Halbwertszeit einer Einheit u für die Zeit, die eine Einheit u benötigt, κ Einheiten von g zu binden. Hier stellt κ die Konzentration von U an seiner Quelle dar. Der Parameter γ kann als Maß für die relative Bindungsaffinität von u and g interpretiert werden. Die kalkulierte Signalreichweite des Inhibitors ist $1/\sqrt{1+\gamma}$.

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 den angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Hülskamp betreut worden.

Katja Wester

Lebenslauf

Name: Wester

Vorname: Katja

Wohnort: Martinsfeld 31
50677 Köln

E-Mail: katwest@gmx.de

Geburtsdatum: 02.01.1974

Geburtsort: Bergisch Gladbach

08.1984 – 06.1990 Realschule in Overath

08.1990 – 07.1992 Ausbildung zur Fotolaborantin
bei Jobo-Labortechnik in Gummersbach

08.1992 – 06.1993 Fachoberschule für Technik in Köln,
Erlangung der Fachhochschulreife, Fachrichtung Druck

10.1993 – 12.1993 Sprachstudium in Cambridge, England

02.1994 – 05.1994 Sprachstudium am Institut Français de Cologne

08.1994 – 06.1996 Kolleg-Schule in Köln,
Erlangung der allg. Hochschulreife

07.1995 – 10.2001 Studentische Aushilfskraft bei Miltenyi Biotec in Bensberg

10.1996 – 03.2004 Studium an der Universität zu Köln,
Erlangung des Diplomgrades, Fachrichtung Biologie

04.2004 – 04.2009 Promotion an der Universität zu Köln,
Fachrichtung Botanik