

Untersuchungen zur Rolle des Gens  
*LATERAL SUPPRESSOR*  
in der Seitentriebentwicklung von *Arabidopsis thaliana* H.  
und der Tomate (*Lycopersicon esculentum* M.)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Thomas Greb**

aus Waldbröl

Köln 2003

Berichtersteller:

Priv. Doz. Dr. Klaus Theres  
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

14.1.2003

*für Lydia, Luise, Anton, Carla,...*

## **Danksagung**

Ohne die Unterstützung von vielen Seiten und das entsprechende Umfeld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich mich deswegen bei meiner Arbeitsgruppe für die durchgehend angenehme Arbeitsatmosphäre und die immer offenen Ohren bei Fragen und Diskussionen bedanken. Insbesondere gilt das für Klaus Theres, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Gruppe diese Arbeit durchzuführen und durch seine engagierte und offene Art entscheidend zum Entstehen beigetragen hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Peter Huijser, Martin Hobe und Rüdiger Simon für die fachlich exzellente Unterstützung bei der Etablierung der RNA in situ-Hybridisierungen. Ganz besonders danke ich auch Tim Soellick, der mit Anregungen und Erfahrungen zum Hefe-Zwei-Hybrid-System geholfen hat, Unklarheiten zu beseitigen und Ergebnisse einzuschätzen. Er war immer offen für Fragen und bereit diese intensiv zu besprechen. Hans Sommer und Csaba Koncz danke ich für die Bereitstellung der Hefe-Zwei-Hybrid-Banken.

Außerdem danke ich Christoph Rudolph, Gregor Bucher, Ilona Zimmermann, Marc Jakoby und Simona Masiero für ihre Hilfsbereitschaft.

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

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie. Luise, Anton und Carla danke ich für ihre Unerbittlichkeit mit der sie mich in der Freizeit auf komplett andere Gedanken gebracht haben. Lydia danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis während der gesamten Zeit, womit sie erst die Voraussetzung geschaffen hat, dass die Arbeit in der vorliegenden Form entstehen konnte. Meiner übrigen Familie danke ich für die große organisatorische Unterstützung im Alltag auf die man sich in allen Situationen verlassen konnte.

---

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Seitentriebentwicklung bestimmt die Architektur von Pflanzen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Für das Pflanzenwachstum sind Meristeme verantwortlich .....	1
1.1.2 Seitentriebe werden in Blattachseln angelegt.....	4
1.1.3 Die Funktion von <i>LATERAL SUPPRESSOR</i> ist konserviert zwischen <i>Arabidopsis</i> und Tomate.....	8
<b>1.2 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>12</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Chemikalien .....	13
2.1.2 Enzyme.....	13
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	13
2.1.4 Antikörper .....	13
2.1.5 Organismen.....	14
2.1.5.1 Bakterien .....	14
2.1.5.2 Hefen .....	14
2.1.5.3 Pflanzen.....	15
2.1.6 Vektoren .....	15
2.1.6.1 <i>E.coli</i> -Vektoren .....	15
2.1.6.2 Hefe-Vektoren .....	16
2.1.6.3 Pflanzen-Vektoren .....	16
2.1.7 Oligonukleotide.....	16
2.1.8 Lösungen und Kulturmedien .....	18
2.1.9 Computerprogramme und Datenbanken .....	18
2.1.10 Hefe-Zwei-Hybrid-Banken .....	19
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Isolierung von DNA.....	19
2.2.2 Isolierung von RNA aus Pflanzen.....	19
2.2.3 cDNA-Synthese / RT-PCR.....	19
2.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	19
2.2.5 Nick-Translation.....	20
2.2.6 Southern-Hybridisierung .....	20
2.2.7 Inkubationsbedingungen für Bakterien.....	21
2.2.8 Inkubationsbedingungen für Hefen .....	21
2.2.9 Wachstumsbedingungen für Pflanzen.....	21
2.2.10 Transformation und Selektion von Bakterien .....	21
2.2.11 Transformation und Selektion von Hefen .....	22
2.2.12 Transformation und Selektion von Pflanzen .....	22
2.2.13 Sequenzierungen.....	22
2.2.14 RNA <i>in situ</i> -Hybridisierungen .....	22
2.2.14.1 Beschreibung der Sonden.....	22
2.2.14.2 Präparationen und Durchführung der Hybridisierungen .....	23
2.2.15 Methoden zum Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	23
2.2.15.1 Proteinisolierung aus Hefen.....	23

2.2.15.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western.....	24
2.2.15.3	Durchsuchen einer Hefe-Zwei-Hybrid Bank.....	24
2.2.16	Methoden zum <i>in vitro</i> -Nachweis von Proteininteraktionen .....	25
2.2.16.1	Proteinexpression in <i>E.coli</i> .....	25
2.2.16.2	Native Aufreinigung von GST-fusionierten Proteinen.....	25
2.2.16.3	Denaturierende Aufreinigung von His <sub>(6)</sub> -fusionierten Proteinen und anschließende Renaturierung.....	26
2.2.16.4	Nachweis von Proteininteraktionen durch Protein-Overlay .....	26
2.2.17	Elektronenmikroskopie.....	27
<b>2.3</b>	<b>Verwendete Abkürzungen .....</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Analyse der LAS-Transkriptverteilung durch RNA <i>in situ</i>-Hybridisierung .....</b>	<b>29</b>
3.1.1	Allgemeine Bemerkungen zur Methode der RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	29
3.1.2	In der vegetativen Phase markiert die Transkription von LAS den Achselbereich von Blattprimordien.....	30
3.1.2.1	Die LAS-Transkriptverteilung in der vegetativen Phase von Columbia.....	31
3.1.2.2	Die LAS-Transkriptverteilung in der vegetativen Phase von Langsberg <i>erecta</i> .....	33
3.1.2.3	Analyse der LAS-Transkriptverteilung in der <i>las</i> -Mutante .....	33
3.1.3	In der generativen Phase findet sich die Transkription von LAS in den Achseln von Stängelblättern, Blüten und Sepalen.....	33
3.1.4	Analyse der Transkription von LAS in der Wurzel.....	35
3.1.5	Die <i>Ls</i> Transkriptionsdomäne in Tomate entspricht der LAS-Transkriptionsdomäne in <i>Arabidopsis</i> .....	36
3.1.6	Zusammenfassung der Analyse der Transkriptverteilung von <i>LATERAL SUPPRESSOR</i> in <i>Arabidopsis</i> und Tomate .....	37
<b>3.2</b>	<b>Integration der LAS-Funktion in die Entwicklung lateraler Meristeme.....</b>	<b>37</b>
3.2.1	LAS ist erforderlich für die Etablierung der Transkription von <i>STM</i> in Blattachseln.....	38
3.2.2	Die Transkription von <i>REVOLUTA</i> in Blattachseln ist abhängig von der Funktion von LAS.....	41
3.2.3	Die Domänen der Transkription von <i>CUC1</i> und <i>CUC2</i> entsprechen in weiten Bereichen der von LAS.....	43
3.2.3.1	Analyse der <i>CUC1</i> -Transkriptverteilung im Wildtyp und <i>las-4</i> .....	45
3.2.3.2	Analyse der <i>CUC2</i> -Transkriptverteilung im Wildtyp und <i>las-4</i> .....	46
3.2.4	Die LAS-Transkription ist nicht abhängig von <i>REV</i> , <i>CUC1</i> oder <i>CUC2</i> .....	47
3.2.5	Zusammenfassung der Integration von LAS in die Entwicklung lateraler Meristeme .....	48
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion des Las-Proteins durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System .....</b>	<b>49</b>
3.3.1	Allgemeine Bemerkungen zum Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	49
3.3.2	Herstellung von Konstrukten zur Proteinexpression in Hefe .....	52
3.3.3	Nachweis der Expression von LAS und weiteren Proteinen .....	53
3.3.4	GRAS-Proteine aktivieren die Transkription in Hefe .....	53
3.3.5	GRAS-Proteine zeigen Homo- und Heterodimerisierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	56
3.3.5.1	Untersuchungen zur Homodimerisierung von <i>Las</i> .....	56
3.3.5.2	Untersuchungen zur Heterodimerisierung zwischen verschiedenen GRAS-Proteinen .....	58

3.3.6	<i>Las</i> zeigt Interaktion zu Histidin-Rezeptor-Kinasen im Hefe-Zwei-Hybrid-System ....	60
3.3.6.1	Untersuchung der Interaktion von <i>GRAS</i> -Proteinen mit verschiedenen Rezeptor-Kinasen .....	60
3.3.6.2	Lokalisierung der Interaktionsdomänen zwischen <i>Las</i> und <i>Etr1</i> .....	63
3.3.7	Versuche zur Bestätigung der gefundenen Proteininteraktionen.....	64
3.3.7.1	Die Transkriptionsdomänen von <i>ETR1</i> und <i>LAS</i> überlappen.....	64
3.3.7.2	Analyse des Seitentriebphänotyps der <i>etr1 etr2</i> -Doppelmutante .....	64
3.3.7.3	Die in vitro Analyse von Proteininteraktionen .....	65
3.3.8	Das Durchsuchen von zwei Hefe-Zwei-Hybrid-Banken führt zur Isolierung potentieller Interaktionspartner von <i>Las</i> .....	66
<b>3.4</b>	<b>Die <i>LAS</i>-Funktion kann durch die Expression von <i>STM</i> in Blattachsen ersetzt werden.....</b>	<b>67</b>
3.4.1	Die Transkription von Genen wird von Promotoren gesteuert .....	67
3.4.2	Herstellung von Konstrukten zur Transformation .....	68
3.4.3	Untersuchungen zur Funktionalität des verwendeten Promotors.....	69
3.4.4	Expression von <i>STM</i> unter der Kontrolle des <i>LAS</i> -Promotors .....	71
3.4.4.1	Die Transformation der <i>las-4</i> -Mutante mit pTG46 führt zur Seitentriebabildung in den Achseln der Rosettenblätter .....	71
3.4.4.2	Analyse des Blattphänotyps der pTG46-Pflanzen.....	73
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Expressionsdomäne von <i>LAS</i> definiert den Achselbereich von lateralen Organen des SAMs.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Die <i>LAS</i>-Aktivität führt zur Etablierung von meristematischen Zellgruppen in Blattachsen .....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Ohne <i>LAS</i> geht die meristematische Aktivität in Blattachsen verloren.....	78
4.2.2	Die Funktion von <i>LAS</i> kann durch die Expression von <i>STM</i> in Blattachsen ersetzt werden .....	82
<b>4.3</b>	<b>Mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System finden sich Hinweise auf die Funktion des <i>Las</i>-Proteins.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>Abschließende Überlegungen.....</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>102</b>

# 1. Einleitung

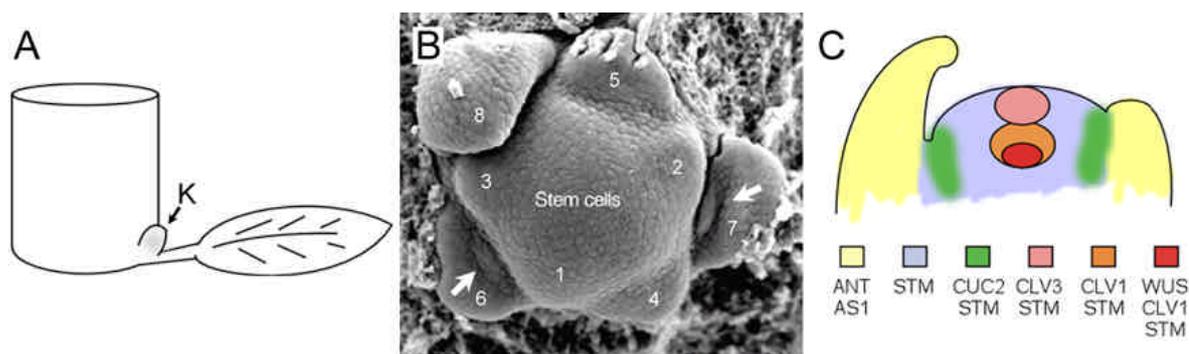
## 1.1 Seitentriebentwicklung bestimmt die Architektur von Pflanzen

### 1.1.1 Für das Pflanzenwachstum sind Meristeme verantwortlich

Die Vegetation unserer Umgebung wird zum großen Teil vom Erscheinungsbild der höheren Pflanzen geprägt. Dabei fällt zunächst die große Vielfalt der Wuchsformen und Strategien ins Auge, mit denen Pflanzen nahezu jede erdenkliche Nische besetzen. Betrachtet man das kurzlebige Gras am Fuße eines Baumes und das Efeu an seinem Stamm, wird die Bandbreite der Formen innerhalb des Pflanzenreichs deutlich. In naturbelassenen Lebensräumen, wie in den Urwäldern im Äquatorbereich, bestimmen die Umweltbedingungen und der Konkurrenzdruck über die Zusammensetzung der Vegetation. In Kulturlandschaften ist der Mensch der prägende Faktor, der Pflanzen nach Gesichtspunkten wie Attraktivität und Nutzen selektiert. Mit ein entscheidendes Kriterium ist dabei die Wuchsform, die uns Pflanzen zum einen als schön empfinden lässt, zum anderen deren Handhabbarkeit als Nutzpflanzen bestimmt.

Der Körper von höheren Pflanzen ist in der Regel aus bestimmten Modulen aufgebaut, die je nach Pflanzenart, Entwicklungsstadium oder Wachstumsbedingungen entsprechend abgewandelt werden (Steeves und Sussex, 1989; Sussex und Kerk, 2001). Das Modul, das sich im oberirdischen Spross immer wieder findet, wird als Phytomer oder Metamer bezeichnet und besteht aus Blatt, Seitenknospe, die für gewöhnlich aus der Blattachsel des Blattes entspringt, und zugehörigem Stängelabschnitt, dem Internodium (Abb.1-1 A, B; Lyndon, 1990). Insbesondere die Entwicklung der Seitentriebe hat einen bedeutenden Einfluss auf den gesamten Habitus der Pflanze, da die Etablierung neuer Wachstumsachsen als Multiplikator des Pflanzenwachstums dienen kann.

Auf zellulärer Ebene ist die Entwicklung mehrzelliger Organismen, wie die der höheren Pflanzen, auf das koordinierte Wachstum ihrer Einzelzellen angewiesen. Die Ontogenese der Pflanzen unterscheidet sich dabei in einem wesentlichen Punkt von der tierischer Organismen. Bei höheren Pflanzen ist die Wanderung von Zellen relativ zu ihren Nachbarzellen nicht zu finden. Im Gegensatz zur Entwicklung der Tiere, bei denen spezielle Organtypen aus gemeinsamen Vorläuferzellen entstehen können, die ihren Platz durch Wanderung im Körper erreichen, differenzieren sich pflanzliche Zellen je nach ihrer Position im Pflanzenkörper zu



**Abb.1-1:** **A:** Die Einheit des Sprosses, die als Phytomer zusammengefasst wird. K (laterale Knospe). **B:** SEM-Aufnahme einer Sprossspitze von *Arabidopsis thaliana*. Blattprimordien werden mit aufsteigender Nummerierung bezeichnet. Pfeile markieren laterale Meristeme. Aufnahme aus Clark (2001), Nummerierung nach Long und Barton (2000). **C:** Expressionsdomänen im apikalen Meristem nach Brand et al. (2001) und Byrne et al. (2000).

unterschiedlichen Organen. Somit bestimmen hier Positionsinformationen stärker über das Schicksal der Einzelzellen (Van Den Berg et al., 1995; Taylor, 1997).

Pflanzen können auf Umwelteinflüsse nicht durch das Wechseln ihres Standortes reagieren. Die als Reaktion auf diese Einflüsse deswegen notwendige Variabilität des Pflanzenkörpers wird hauptsächlich von proliferierenden Geweben mit embryonalem Charakter gesteuert, den Meristemen. Das Wachstum der Pflanzen beruht im Allgemeinen darauf, dass Spross- und Wurzelmeristeme an gegenüberliegenden Polen der Pflanze laufend Zellen an den Pflanzenkörper abgeben, die sich, je nach ihrer Position zu Nachbarzellen, zu unterschiedlichen Organen, wie Stamm, Wurzeln, Blättern, Seitentrieben oder Blüten entwickeln. Während der Organogenese entscheiden zum Teil Umwelteinflüsse über die zeitliche, räumliche und funktionelle Ausprägung der Organe (Westhoff, 1996). Auch darauf haben die Meristeme, vermittelt durch pflanzliche Hormone, einen steuernden Einfluss (Cline, 1997). Das Hauptsprossmeristem (shoot apical meristem, SAM), das während der Embryogenese angelegt wird, ist für das Wachstum des oberirdischen Teils der Pflanze verantwortlich (Abb.1-1 B, C). Meist folgt nach einer vegetativen Phase, in der die abgegebenen Zellen Laubblätter und Stamm bilden, der Wechsel zur generativen Phase in der das SAM reproduktive Organe, d.h. Blüten anlegt (Hempel und Feldmann, 1994). Zudem steuert das SAM insbesondere das Auswachsen der Seitentriebe hauptsächlich über die Wirkung des Hormons Auxin; eine Kontrolle, die als Apikaldominanz bezeichnet wird (Cline, 1997).

Entscheidend für die Funktion eines Meristems ist die Balance zwischen embryonalen Stammzellen im Zentrum und zur Differenzierung abgegebenen Zellen an dessen Peripherie. In *Arabidopsis thaliana* sind einige Gene beschrieben, die offensichtlich notwendig für die

Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts sind. So ist das Gen *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) (Long et al., 1996) möglicherweise entscheidend für die Inhibierung der Differenzierung innerhalb des SAMs (Lenhard et al., 2002; Gallois et al., 2002). Es ist exprimiert in allen undifferenzierten Zellen des SAMs (Abb.1-1 C; Long und Barton, 2000) und erfüllt seine Funktion offenbar unter anderem dadurch, dass es dort die Expression von Genen, die an der Differenzierung von lateralen Organen beteiligt sind, wie beispielsweise *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*), unterdrückt (Abb.1-1 C; Byrne et al., 2002; Byrne et al., 2000). Demgegenüber ist es in der Lage Gene, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, zu aktivieren (Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002). *STM* bildet mit *KNAT1*, *KNAT2* und *KNAT6* die Klasse 1 unter den acht in *Arabidopsis* existierenden *KNOX*-Transkriptionsfaktoren (Lincoln et al., 1994; Long et al., 1996; Semiarti et al., 2001), die sich über ihre Ähnlichkeit zu dem aus Mais isolierten Gen *Knotted1* definieren. Davon sind zumindest *KNAT1* und *KNAT2* ähnlich exprimiert wie *STM* (Lincoln et al., 1994) und erfüllen vergleichbare Funktionen (Byrne et al., 2002). Da ektopische Expression von *STM* zur Aktivierung von *KNAT1* und *KNAT2* in den entsprechenden Geweben führt, gelten beide Gene als *Downstream*-Gene von *STM* (Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002). Die ektopische Expression von *KNOX*-Genen wie *Knotted1* und *KNAT1* in Mais und *Arabidopsis* führt zur Sprossbildung auf der adaxialen Blattseite (Vollbrecht et al., 1991; Lincoln et al., 1994; Chuck et al., 1996). Darüber, ob dies auch durch die ektopische Expression von *STM* hervorgerufen wird, sind widersprüchliche Befunde beschrieben (Gallois et al., 2002; Lenhard et al., 2002; Williams, 1998; Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung). Bei der positiven Wirkung von *KNOX*-Genen auf den meristematischen Zustand von Zellen spielen möglicherweise Pflanzenhormone eine Rolle. Cytokinin ist in diesem Zusammenhang in der Lage, die Wirkung von *KNOX*-Genen zu unterstützen, wohingegen Ethylen und Gibberellinsäure als Antagonisten wirken können (Hay et al., 2002; Hamant et al., 2002).

Ein weiterer Faktor, der entscheidend für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Stammzellen und differenzierenden Zellen ist, ist die antagonistische Beziehung zwischen den *CLAVATA*-Genen (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*) und *WUSCHEL* (*WUS*) (Brand et al., 2000; Fletcher et al., 1999). Der Verlust von *CLV1*, *CLV2* oder *CLV3* führt zu einer Vergrößerung des Meristems, so dass beispielsweise mehr Organe in der Blüte gebildet werden. Der Verlust von *WUS* hat den gegenteiligen Effekt. Die *wus*-Mutante ist kaum in der Lage ein SAM zu initiieren oder aufrecht zu erhalten. *CLV1*, *CLV3* und *WUS* sind in wenigen Zellen im zentralen SAM exprimiert (Abb.1-1 C; Brand et al., 2000; Fletcher et al., 1999). Die Balance zwischen

Stammzellen und differenzierenden Zellen im SAM spiegelt sich unter anderem in der antagonistischen Wirkung dieser Gene wieder (Brand et al., 2001).

Zur Etablierung des SAMs während der Embryogenese sind neben *STM* (Long et al., 1996) ebenso die beiden redundanten *CUP-SHAPED COTYLEDON*-Gene (*CUC1*, *CUC2*) erforderlich. *cuc1 cuc2*-Doppelmutanten terminieren im Keimlingsstadium, da ähnlich wie bei *stm*-Mutanten während der Embryogenese kein SAM ausgebildet wird. Zudem sind ihre Keimblätter miteinander fusioniert (Abb.3-5, Aida et al., 1997). Die Einzelmutanten zeigen nahezu keinen Phänotyp. Da beide Gene während der Embryogenese an der gleichen Stelle wie *STM* exprimiert werden, aber in *cuc1 cuc2*-Embryos keine *STM*-Expression stattfindet, gelten die beiden *CUC*-Gene als Aktivatoren von *STM* (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001). In der weiteren Entwicklung des Embryos ist sowohl *CUC1*- als auch *CUC2*-Expression in den Achseln zwischen Keimblättern und SAM zu finden (Abb.1-1 C; Aida et al., 1999; Takada et al., 2001). Das Homolog von *CUC2* in Petunie *NO APICAL MERISTEM (NAM)* wird auch in späteren Entwicklungsstadien in den Achseln von lateralen Organen des SAMs exprimiert. (Souer et al., 1996). Ähnlich wie bei einigen *KNOX*-Genen führt zudem die ektopische Expression von *CUC1* zur Bildung von Adventivknospen auf der adaxialen Seite der Blätter (Takada et al., 2001). *Cuc1* und *Cuc2* gehören zu den NAC-Domänen-Proteinen, die ebenfalls mögliche Transkriptionsfaktoren darstellen.

### 1.1.2 Seitentriebe werden in Blattachseln angelegt

Der gesamte Habitus der höheren Pflanzen ist stark von der Entwicklung der Seitentriebe bestimmt. Die hier auftretenden Verzweigungsmuster können in monopodiales Wachstum und sympodiales Wachstum eingeteilt werden. Als Beispiel für beide Verzweigungstypen, werden bei Schmitz und Theres (1999) *Arabidopsis thaliana* und Tomate miteinander verglichen. Bei *Arabidopsis*, wo ein monopodiales Wachstum zu finden ist, dominiert der primäre Trieb während des gesamten Pflanzenlebens das Wachstum durch die ständige Produktion neuer Organe (Abb.1-2 C). Im Gegensatz dazu stellt der Hauptapex bei der Tomate nach seiner Umwandlung in einen Infloreszenzapex und der Anlage von 8 bis 12 Blüten seine Aktivität ein. Das eigentliche Wachstum der Pflanze wird von dem Seitentrieb direkt unterhalb des Infloreszenzapex übernommen, der als sympodialer Trieb bezeichnet wird und nach der Umwandlung in einen Infloreszenzapex ebenfalls terminiert (Abb.1-2 A). Das Wachstum wird wiederum vom Seitentrieb unterhalb der Infloreszenz übernommen. In der Achsel des sympodialen Triebes bildet

sich ein zusätzlicher akzessorischer Seitentrieb. Dieses Muster wird in der Regel während des gesamten Wachstums fortgeführt.

In dieser Arbeit wurden Aspekte der Etablierung und Entwicklung von lateralen Meristemen (LM) untersucht. Diese werden im Gegensatz zum SAM, das während der Embryogenese angelegt wird, post-embryonal in den Achseln der Laubblätter etabliert. Eine häufig diskutierte Frage ist dabei die Herkunft der meristematischen Zellen der lateralen Meristeme. Entstehen sie *de novo* aus schon differenzierten Zellen (Napoli et al., 1999; Shimizu-Sato und Mori, 2001) oder behalten einige Zellen nach ihrer Trennung vom Hauptmeristem ihre meristematische Identität bei und stellen ein *detached meristem* dar (Steeves und Sussex, 1989)? Histologische Untersuchungen geben nicht unbedingt Aufschluss über die Herkunft der lateralen Meristeme, da embryonale Zellen in den Achseln nicht zwangsläufig als solche zu erkennen sind. So findet sich zwischen der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und *Arabidopsis thaliana* ein Unterschied auf histologischer Ebene (Schmitz und Theres, 1999). In der Tomate sind Seitenknospen schon in unmittelbarer Nähe zum Hauptapex in den Blattachsen zu erkennen (Malayer und Guard, 1964). Bei *Arabidopsis* sind Seitenknospen im vegetativen Zustand erst in einigem Abstand in älteren Achseln auszumachen (Hempel und Feldmann, 1994). Ob dies ein prinzipieller Unterschied in der Initiierung der Seitenknospen darstellt oder nur eine zeitliche Verschiebung von Entwicklungsvorgängen, ist nicht klar. Long und Barton (2000) und ebenso Grbic und Bleecker (2000) versuchen die Frage in *Arabidopsis* mittels der Analyse der *STM*-Expression zu beantworten. *STM*-Expression dient hier als Marker für die meristematische Identität von Zellen. Die Autoren können zeigen, dass eine kontinuierliche *STM*-Expression in den Zellen der interprimordialen Region besteht, wozu auch der Bereich der Blattachsen gehört. In der weiteren Entwicklung ist allerdings nach Long und Barton (2000) nicht eindeutig nachzuweisen, ob die Zellen der lateralen Meristeme aus der *STM*-exprimierenden interprimordialen Region oder aus dem Bereich des relativ dazu abaxialen Blattes hervorgehen. Grbic und Bleecker (2000) interpretieren ihre Daten zu Gunsten des *detached meristem*-Konzepts.

Anatomische Untersuchungen, klonale Analysen und Expressionsstudien von Entwicklungsgenen in *Arabidopsis* lassen den Schluss zu, dass bezogen auf die Herkunft eine enge Verbindung der Seitenknospe zu dem darunter liegenden Tragblatt existiert. So zeigen Hempel et al. (1998), dass Blatt und Seitenknospe gemeinsam angelegt werden. In *Arabidopsis* scheint das LM zudem direkt aus der adaxialen Blattbasis hervorzugehen (Talbert et al., 1995). Klonale Analysen bestätigen ebenfalls die enge Verbindung beider Organe (Furner und Pumfrey, 1992;

Irish und Sussex, 1992). Gegenteilige Ergebnisse gibt es allerdings mit ähnlichen Experimenten in Mais, wo offenbar eine engere Verbindung der Achselknospen zu dem darüber liegenden Internodium besteht (McDaniel und Poethig, 1988). Die enge Verbindung zwischen Tragblatt und Achselknospe in *Arabidopsis* wird auch durch die Analyse der Blütenprimordien deutlich, die als spezielle Form der Seitentriebe gelten. Blüten besitzen in *Arabidopsis* kein sichtbares Tragblatt. Dennoch werden an der abaxialen Seite der frühen Blütenprimordien Gene exprimiert, die ansonsten spezifisch in Blättern exprimiert werden (Byrne et al., 2000; Long und Barton, 2000). In dem Fall wird die Existenz eines sogenannten kryptischen Blattes diskutiert, das vollkommen mit dem Blütenprimordium verwachsen ist und insofern morphologisch und histologisch nicht zu identifizieren ist.

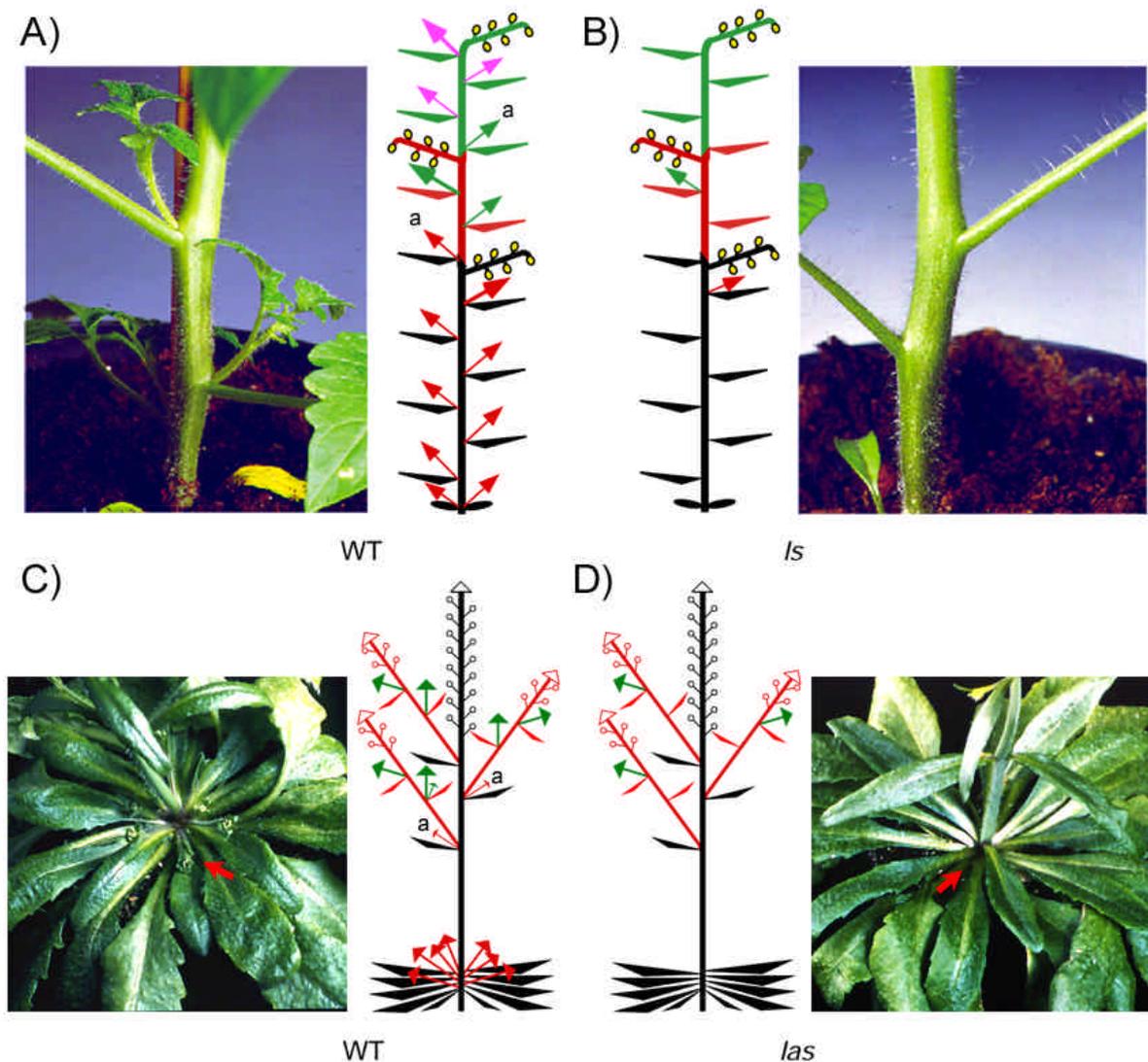
Dass die adaxiale Blattseite einen offenbar entscheidenden Einfluss auf die Seitentriebentwicklung hat, zeigt zunächst der Phänotyp der *phabulosa-1d* Mutante in *Arabidopsis thaliana*. Diese Mutante besitzt Blätter mit vollkommen adaxialisierter Oberfläche, die nicht nur im adaxialen, sondern ebenso im abaxialen Achselbereich Seitenknospen bilden (McConnell und Barton, 1998). Weiterhin wurde die Bildung von Adventivsprossen aufgrund der ektopischen Expression von *CUC1*, *KNAT1* und *Knotted1* in *Arabidopsis* und Mais vor allem auf der adaxialen Blattoberfläche schon erwähnt (Kap. 1.1.1, Takada et al., 2001, Vollbrecht et al., 1991). Diese Experimente zeigen darüber hinaus, dass der Bereich oberhalb der Leitbündel des Blattes offenbar eine positive Wirkung auf die Bildung von Meristemen hat, da diese vorzugsweise dort gebildet werden (Takada et al., 2001, Chuck et al., 1996).

In *Arabidopsis thaliana* sind entlang des primären Sprosses zwei Gradienten der Seitentriebentwicklung beschrieben (Grbic und Blecker, 2000; Hempel und Feldmann, 1994; Stirnberg et al., 1999). Während der vegetativen Wachstumsphase sind laterale Meristeme erst in einigem Abstand zum SAM in den Achseln älterer Blätter zu identifizieren, wobei die Entwicklung in älteren Achseln weiter fortgeschritten ist. Insofern findet sich hier ein akropetaler Gradient der Seitentriebentwicklung. Nach dem Übergang zur generativen Phase beginnen sich laterale Meristeme in den jüngsten Blattachsen schneller zu entwickeln als in älteren, was dazu führt, dass ab diesem Zeitpunkt der akropetale Gradient von einem basipetalen Gradienten der Seitentriebentwicklung überlagert wird. Ob sich die beschriebenen Gradienten nicht nur auf das Auswachsen, sondern auch auf die Anlage der lateralen Meristeme beziehen, bleibt zu analysieren.

Neben den beschriebenen Meristem-Mutanten (*stm*, *wus*, *clv1*, *clv2*, *clv3*, *cuc1* *cuc2*, Kap.1.1.1), sind mit *pinhead*/*zwille* (McConnell und Barton, 1995) und *argonaut1* (Bohmert et al., 1997) Mutanten beschrieben, die neben Defekten im Sprossmeristem, das häufig mit der Bildung einer nadelförmigen Struktur terminiert, einen stärkeren Defekt in der Anlage von lateralen Meristemen zeigen. Beide Gene codieren für ähnliche Translationsfaktoren und werden in überlappenden Domänen exprimiert (Lynn et al., 1999). Es existieren allerdings darüber hinaus Mutanten, die neben eher schwächeren zusätzlichen Effekten speziell in der Entwicklung der LMs gestört sind und nahezu keinen Defekt in der Entwicklung des SAMs zeigen. Dies zeigt, dass die Etablierung von lateralen Meristemen im Vergleich zur Etablierung des SAMs spezielle Faktoren benötigt, wovon allerdings nur wenige charakterisiert sind. So resultieren Mutationen im *REVOLUTA*-Gen in Pflanzen, die neben vergrößerten Blättern, Sprossen und Blütenorganen, eine verminderte Anzahl von lateralen Meristemen besitzen (Talbert et al., 1995). Die Mutation, die unabhängig als *interfascicular fiberless1* (*ifl1*) isoliert wurde, führt zudem zu Defekten in Leitbündeln (Zhong und Ye, 1999). *IFL1/REV*, das für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor codiert, wird in Leitbündeln, im SAM und in einer Zellgruppe in Blattachsen exprimiert und wird als Aktivator von *STM* diskutiert (Otsuga et al., 2001, Zhong und Ye, 1999). Weiterhin führt die Mutation des Gens *CARPEL FACTORY* (*CAF*), neben einer verstärkten Zellproliferation in Infloreszenz-Meristemen, zu einem Ausfall von LMs. Das wahrscheinlich an der RNA-Prozessierung beteiligte Gen wird ubiquitär exprimiert (Jacobsen et al., 1999).

In Tomate sind mit *Blind* und *Lateral suppressor* weitere Gene beschrieben, deren Ausfall zu Defekten in der Seitentriebbildung führt (Mapelli und Kinet, 1992; Williams, 1960). *Blind* stellt einen MYB-Transkriptionsfaktor dar, der auch in die Infloreszenz- und Blütenentwicklung involviert ist (Schmitz et al., 2002). Mutationen im *Lateral suppressor*-Gen führen sowohl in Tomate als auch *Arabidopsis* neben einem Defekt in der Anlage der Seitentriebe während der vegetativen Wachstumsphase, nur zu sehr moderaten weiteren Defekten (Abb.1-2; Kap.1.1.3; Schumacher et al., 1999; K. Theres, unveröffentlichte Daten). Insofern gehört die *lateral suppressor*-Mutante zu den spezifischeren Seitentriebmutanten.

Neben Mutanten, bei denen die Seitentriebbildung reduziert ist, zeigt eine weitere Gruppe von Mutanten eine vermehrte Bildung von Seitenknospen aus Blattachsen, wie in *Arabidopsis* *supershoot*/*bushy* (*sps*/*bus*, Tantikanjana et al., 2001; Reintanz et al., 2001), und die *max*-Mutanten (Stirnberg et al., 2002) oder eine reduzierte Apikaldominanz, wie *axr1* (Stirnberg et al., 1999),



**Abb.1-2:** Sprossarchitektur in Tomate (A) und *Arabidopsis* (C) und der Phänotyp der *lateral suppressor*-Mutante in Tomate (B) und *Arabidopsis* (D). a: akzessorischer Seitentrieb; Aufnahmen: M. Kalda, Schemata: G. Schmitz

*teosinte branched1* aus Mais (*tb1*; Doebley et al., 1997) oder die *dad*-Mutanten in Petunie (Napoli et al., 1996), was im Vergleich zum Wildtyp zu einem buschigeren Wachstum führt.

### 1.1.3 Die Funktion von *LATERAL SUPPRESSOR* ist konserviert zwischen *Arabidopsis* und Tomate

Als ein Gen, das sehr spezifisch an der Seitentriebentwicklung beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit die Rolle von *LATERAL SUPPRESSOR* in der Seitentriebentwicklung untersucht. Zunächst aufgetreten als spontane Mutation in Tomate (Williams, 1960), fehlen dort der *lateral suppressor*-Mutante (*ls*) die Seitentriebe in den meisten Blattachseln. Die Ausnahmen sind der Seitentrieb unterhalb der Infloreszenz und der sympodiale Trieb (Abb.1.2 B, Malayer und Guard, 1964; Tucker, 1977). In den übrigen Achseln sind keinerlei Strukturen zu erkennen, die auf eine

meristematische Aktivität hindeuten. Daneben zeigt die Mutante weitere lokale Defekte. Dazu gehört, dass in der Blüte keine Petalen ausgebildet werden (Szymkowiak und Sussex, 1993). Als weiterer Defekt wird eine reduzierte weibliche und männliche Fertilität beschrieben (Groot et al., 1994). Hinzu kommen ein Fehlen der Abszissionszone, die im Wildtyp zum Ablösen der Frucht dient (Schmitt, 1999) und eine verminderte Keimfähigkeit der Samen. Dies ist offenbar auf einen maternalen Effekt zurückzuführen (Taylor, 1979). Die Hormonkonzentrationen in *ls*-Pflanzen sind nach Sossountzov et al. (1988) und Tucker (1981) gegenüber dem Wildtyp verschoben. Es findet sich ein höherer Auxin- und Gibberellin Gehalt in der Sprossspitze und eine niedrigere Cytokininkonzentration in Stängel und Wurzel. Eine Erhöhung des Cytokininspiegels durch Einbringen des Isopentenyltransferase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Groot et al., 1995) führte aber nicht zur Aufhebung des Seitentriebdefekts. Somit ist der verminderte Cytokininingehalt eine Folge der Mutation und nicht ihre Ursache. Hormonmessungen mittels HPLC konnten die beschriebenen veränderten Hormonkonzentrationen nicht bestätigen (Klaus Theres, persönliche Mitteilung).

Sowohl das *Lateral Suppressor*-Gen aus Tomate (*Ls*) als auch das Homolog aus *Arabidopsis* (*LAS*) wurden isoliert (Schumacher et al., 1999; K. Theres, unveröffentlichte Daten), wobei mehrere Argumente für die Homologie der Gene aus den beiden Arten sprechen. So besteht nicht nur die höchste Sequenzähnlichkeit im Vergleich zu anderen Genen, sondern auch das Gen-Repertoire der genomischen Umgebung ist vergleichbar, so dass man davon ausgehen kann, dass beide Gene in der Evolution einen gemeinsamen Ursprung haben (Rossberg et al., 2001). Insbesondere führt der Ausfall von *Ls/LAS* zu einem vergleichbaren Phänotyp in der sympodial wachsenden Tomate und der monopodial wachsenden Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Ebenso wie in Tomate zeigt die *las*-Mutante in *Arabidopsis* einen Defekt in der Seitentriebentwicklung. In den während der vegetativen Phase gebildeten Achseln der Rosettenblätter werden keine Seitentriebe angelegt, Seitentriebe in den Achseln der Stängelblätter werden allerdings wie im Wildtyp gebildet (Abb.1-2 D; K. Theres, E. Schäfer, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zur *ls*-Mutante in Tomate sind die Petalen in *las* vorhanden. Eine Abszissionszone, die wie in Tomate zum Ablösen der Frucht dient, existiert in *Arabidopsis* nicht, es findet hier allerdings eine kontrollierte Abszission der Petalen statt. Dieser Vorgang scheint in *las* verspätet stattzufinden. Ein weiterer Phänotyp sowohl der *las*- als auch der *ls*-Mutante ist, dass sich beide in der Wachstumshöhe vom Wildtyp unterscheiden, was bedeutet, dass bei den Mutanten der primäre Trieb stärker gestreckt ist als der des Wildtyps. Weiterhin lässt sich in *las* eine Tendenz zur Concauleszenz beobachten, d.h. dass

Seitentriebe, die aus den Achseln der Stängelblätter hervorgehen, an ihrer Basis regelmäßig mit dem Stängel verwachsen sind (Oliver Clarenz, unveröffentlichte Daten).

Die hohe Konservierung der Funktion von *LATERAL SUPPRESSOR* innerhalb der Seitentriebentwicklung kommt nicht nur im Phänotyp der entsprechenden Mutanten in diesen zwei in der Evolution relativ weit entfernten Arten zum Ausdruck. Darüber hinaus ist ein genomisches Fragment aus *Arabidopsis* in der Lage das *Ls*-Gen aus Tomate funktionell zu ersetzen (Ruben Herrero, unveröffentlichte Daten).

Der Vergleich der Phänotypen der *lateral suppressor*-Mutanten in Tomate und *Arabidopsis* lässt eine genauere Betrachtung der Rolle von *LAS/Ls* in der Seitentriebentwicklung zu. In beiden Fällen führt der Gendefekt nicht zu einem kompletten Ausfall der Seitentriebentwicklung. In Tomate wird der sympodiale Trieb und der Seitentrieb unterhalb der Infloreszenz regelmäßig gebildet (Abb.1-2 B), in *Arabidopsis* gilt dies für Seitentriebe aus Achseln der Stängelblätter (Abb.1-2 D). In beiden Fällen sind also diejenigen Blattachsen nicht von einem Ausfall der *LATERAL SUPPRESSOR*-Funktion betroffen, die unmittelbar vor dem Übergang des SAMs von einem vegetativen zu einem generativen Apex gebildet wurden. In *Arabidopsis* wurde in der Seitentriebentwicklung der akropetale Gradient, während der vegetativen Phase, und der basipetale Gradient, nach dem Übergang zur generativen Phase, beschrieben (Kap.1.1.2). Der Phänotyp der *las*-Mutante lässt sich nun dahingehend interpretieren, dass die *LAS*-Funktion nur für die akropetale Seitentriebentwicklung der vegetativen Phase notwendig ist. In der schnelleren basipetalen Entwicklung der generativen Phase können entweder andere Faktoren die Rolle von *LAS* übernehmen oder diese Funktion ist dann zu entbehren. Der vergleichbare Phänotyp der *ls*-Mutante in Tomate lässt zudem vermuten, dass in Tomate prinzipiell ebenfalls zwei Gradienten der Seitentriebentwicklung existieren.

*LATERAL SUPPRESSOR* gehört zur *GRAS*-Protein Familie (Pysh et al., 1999). Diese Familie besteht aus ca. 35 Mitgliedern in *Arabidopsis*. Andere charakterisierte Mitglieder der Familie sind an sehr unterschiedlichen Prozessen beteiligt. *GAI* (Peng et al., 1997) und *RGA* (Silverstone et al., 1997) gelten als negative Regulatoren des GA-Signalwegs, *SCR* (Di Laurenzio et al., 1996) und *SHR* (Helariutta et al., 2000) sind in die radiäre Musterbildung der Wurzel und des Stängels involviert und *PAT1* ist an der Weiterleitung von Lichtsignalen beteiligt (Bolle et al., 2000). *HAM*, ein in Petunie beschriebenes *GRAS*-Gen, ist für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes des SAMs notwendig (Stuurman et al., 2002). Trotz der großen

Bandbreite der Prozesse lässt sich vermuten, dass *GRAS*-Proteine generell an Signaltransduktionen beteiligt sind. Untersuchungen an *RGA* zeigen, dass in diesem Fall das im Kern lokalisierte Protein nach GA-Applikation abgebaut wird (Silverstone et al., 2001), wobei offenbar die, bei *LAS* nicht vorhandene, DELLA-Domäne für die Sensitivität gegen GA verantwortlich ist (Dill et al., 2001). Im Falle von *SHR* findet ein Proteintransport zwischen zwei Gewebetypen statt. Je nach Gewebetyp ist das Protein im Zellkern oder im Cytosol lokalisiert (Nakajima et al., 2001).

Untersuchungen von Schmitt (1999) zeigen, dass unter den dort gewählten Versuchsbedingungen das *Ls*-Protein aus Tomate im Cytoplasma lokalisiert ist. Eine Analyse des Expressionsmusters findet sich bei Schmitt (1999) und Greb (1999). Hier wird die Expression durch das in Tomaten transformierte *GUS*-Reportergen unter der Kontrolle des *Ls*-Promoters untersucht. Die Untersuchungen zeigen, dass das *GUS*-Gen im Blütenboden, dem Fruchtknoten, Blattachseln, Abszissionszonen und den Wurzelspitzen exprimiert wird. Gerade in diesen Geweben wird ein veränderter Phänotyp in der Mutante beobachtet. Lediglich in der Wurzel ist kein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp beschrieben.

Wegen der oben erwähnten Kernlokalisierung einiger Mitglieder und dem Auftreten einer Kern-Lokalisierungs-Sequenz bei weiteren Vertretern, gelten die *GRAS*-Proteine als Transkriptionsfaktoren. Richards et al. (2000) nehmen Sequenz-Homologien der *GRAS*-Proteine zur SH2-Domäne von tierischen *STATs* (*signal transducers and activators of transcription*) zum Anlass über die molekulare Funktion der Protein-Familie zu spekulieren. *STATs* dimerisieren nach der Phosphorylierung durch eine liganden-abhängige membranständige Rezeptor-Kinase. Anschließend werden die *STATs* als Dimer in den Kern transportiert und aktivieren dort die Transkription von Genen. Durch nachfolgende Dephosphorylierung, Dissoziation, und aktiven Export in das Cytosol schließt sich der Kreis (Kisseleva et al., 2002). Richards et al. (2000) schlagen eine ähnliche Rolle der *GRAS*-Proteine in pflanzlichen Organismen vor.

## **1.2 Ziele der Arbeit**

Sprossarchitektur in höheren Pflanzen wird in einem hohen Maße von der Entwicklung der Seitentriebe geprägt. Ein entscheidender Faktor innerhalb der Seitentriebentwicklung über Artgrenzen hinweg ist das Gen *LATERAL SUPPRESSOR* (*LAS*). Das Ziel dieser Arbeit war es, durch die Analyse der Funktion von *LAS* die molekular kaum charakterisierte Anlage von Seitentrieben in höheren Pflanzen besser zu verstehen. Ein Teilziel bestand dabei zunächst in der detaillierten Analyse des Expressionsmusters von *LATERAL SUPPRESSOR* in *Arabidopsis thaliana* und Tomate durch RNA *in situ*-Hybridisierung, da dies entscheidende Hinweise über die Funktion des Gens liefert. Weiterhin sollte durch die Analyse der Expressionsmuster von an der Seitentriebentwicklung und Meristemetablierung beteiligten Genen *LAS* zu diesen in Beziehung gesetzt werden. Ziel war es hier, die Position der *LAS*-Funktion in dem Prozess der Seitentriebentwicklung zu bestimmen. Ein weiteres Teilziel war es mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems Hinweise für die molekulare Funktion des *Las*-Proteins in der Zelle zu finden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Im Folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Chemikalien aufgeführt.

Merck KgaA, Feinchemikalien und Laborbedarf Deutschland, Darmstadt  
Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Difco Laboratories, Detroit/Michigan, USA  
DuchEFA, Haarlem, Niederlande  
Sigma Chemical Co., St.Lois, USA  
Biozym, Hess.Oldendorf  
Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig  
Roche, Basel, Schweiz  
Pierce, Rockford, Illinois, USA

#### **2.1.2 Enzyme**

Im Folgenden sind die wichtigsten Bezugsquellen für Enzyme aufgeführt.

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

#### **2.1.3 Verbrauchsmaterialien**

Inkubationsröhrchen, Petrischalen: Greiner Lobortechnik  
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg  
Sarstedt AG & Co, Nümbrecht  
Kits zur Nukleinsäurebehandlung: Qiagen, Hildesheim  
Röntgenfilme: BioMax MR-1, Kodak Co., New York  
Nylonmembranen: Hybond<sup>TM</sup>-N+, Amersham International plc.  
PVDF-Membranen: Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren

#### **2.1.4 Antikörper**

Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragments (aus Schaf), Roche, Basel, Schweiz  
Anti-GAL4 (DBD) (RK5C1) (aus Maus), santa cruz biotechnology inc., Santa Cruz, California, USA  
Anti-GAL4AD: GAL-TA (C-10) (aus Maus) santa cruz biotechnology inc., Santa Cruz, California, USA

Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Coniugate (aus Ziege), Bio-Rad, München  
 Anti-Penta His-Antikörper (aus Maus), Qiagen, Hildesheim

## 2.1.5 Organismen

### 2.1.5.1 Bakterien

Folgende *Escherichia coli*-Stämme sind in den Experimenten verwendet worden. Zur Klonierung von in Vektoren legierten Fragmenten, wurden kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen (Hanahan, 1983) transformiert. Zur Proteinexpression wurde BL21 (Stratagene) verwendet.

DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , end A <sup>1</sup> , hsdR17 (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), gyrA96, relA1, supE44, L <sup>-</sup> , recA1, 80dlacZM15, $\Delta$ (lacZYA-argF)U196	Hanahan, 1983
BL21-CodonPlus(DE3)-RP-X	B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal I (DE3) endA Hte meta <sup>+</sup> ::Tn5(KanS <sup>r</sup> ) [argU proL Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene

Zur Pflanzen-Transformation wurde *Agrobacterium tumefaciens* verwendet.

GV3101	pMP90-Virulenz Plasmid	Koncz und Schell, 1986
--------	------------------------	------------------------

### 2.1.5.2 Hefen

Innerhalb des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden zwei Stämme unterschiedlichen Konjugationstyps verwendet. Die in dem Zusammenhang weitere wichtige Eigenschaft ist die Auxotrophie beider Stämme für Tryptophan, Leucin, Histidin und bei AH109 zudem für Adenin. Die Tryptophan und Leucin-Marker wurden zur Vektoretablierung nach erfolgter Transformation verwendet. Als Marker für Proteininteraktion diente hier das HIS3-Reporter gen und bei AH109 zusätzlich das ADE2-Reporter gen, die beide unter der Kontrolle der Gal4 Bindestelle des GAL1-Promotors stehen.

AH109:	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	James et al., 1996
--------	--	--------------------

Y187. MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, Harper et al., 1993  
112, gal4 $\Delta$ , met<sup>-</sup>, gal80 $\Delta$ , URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-  
lacZ

### 2.1.5.3 Pflanzen

Die beschriebenen Untersuchungen wurden zum Einen an Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* Heynh. vom Ökotyp Columbia und Langsberg *erecta* durchgeführt. Samenmaterial der verschiedenen Ökotypen und Mutanten wurde bezogen vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC). Als *las*-Mutante wurde die Mutante mit dem Allel *las-4* verwendet, das eine Deletion von 20 bp bei bp 365 des offenen Leserasters aufweist (K. Theres und E. Schäfer, unveröffentlichte Daten). Samen der *etr1-7etr2-3* Doppelmutante wurden von Elliot Meyerowitz zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden Samen der Tomatenlinie *MoneyMaker* vom *Tomato Genetics Stock Center*, Davis, CA bezogen.

### 2.1.6 Vektoren

#### 2.1.6.1 E.coli-Vektoren

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

pGEM3Z	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Transkription unter dem T7-Promotor	Promega
pGEM4Z	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Transkription unter dem T7-Promotor	Promega
pGEM-T	Vektor zu Klonierung von PCR-Produkten und deren Transkription unter dem T7-Promotor	Promega
pDONR201	Vektor zur Klonierung von DNA-Fragmenten zur Verwendung im Gateway System	Invitrogen
pET21a	Vektor zur Proteinexpression	Novagen
pET28a	Vektor zur Proteinexpression mit N-terminaler His <sub>(6)</sub> -Fusion	Novagen
pET42a	Vektor zur Proteinexpression mit N-terminaler GST-Fusion	Novagen

### 2.1.6.2 Hefe-Vektoren

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

pGADT7	Binärer Vektor zu Expression von Proteinen als Fusion mit der aktivierenden Domäne des <i>Gal4</i> -Faktors	Clontech
pGBKT7	Binärer Vektor zu Expression von Proteinen als Fusion mit der DNA-bindenden Domäne des <i>Gal4</i> -Faktors	Clontech
pCL1	Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für den <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktor	Clontech
pGBKT7-53	Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für Fusionsprotein zwischen p53 aus Maus und der <i>Gal4</i> -DNA bindenden Domäne	Clontech
pGADT7-T	Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für Fusionsprotein zwischen SV40 T-Antigen und der <i>Gal4</i> aktivierenden Domäne	Clontech
pGBKT7-Lam	Negativkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, codiert für Fusionsprotein zwischen Lamin C aus dem Menschen und der DNA-bindenden Domäne von <i>Gal4</i>	Clontech

### 2.1.6.3 Pflanzen-Vektoren

Zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde der Vektor pGII0229 und das Helferplasmid pSoup (Hellens et al., 2000) verwendet.

### 2.1.7 Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide von 5' nach 3'. Oligonukleotide wurden von *metabion*, Planegg-Martinsried oder von *MWG Biotech*, Ebersberg bezogen.

#### zu Kap. 3.1

Lsfo	ACCACCACCATCACTACCTC
Lsfoxt	CCAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCACCACCATCACTACCTC
Lsre	CGAAACTCCGAGTTGATAGCC
Lsrex	CCAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACGAAACTCCGAGTTGATAGCC

#### zu Kap. 3.2

CUC1F	CTAGAATTCTAAAGTTTGCTGAAAAGCGGCG
-------	---------------------------------

CUC1R	CTAAAGCTTACCGCATGGCGATCAGAGAGTAAAC
CUC2F	CTAGAATTCGTTTTCCAGAAAACCACTTTAGC
CUC2R	CTAAAGCTTTTCAGTAGTTCCAAATACAGTCAAGTCC
REVF	CTAGAATTCATCTTTGGTTCCGTGACTG
REVR	CTAAAGCTTCAAAAACAGAGACACCTAAAACAACAACC
stmfo	AGTTGCTTCTTCTTCTTCTCCTTC
stmre2	CATTGGGAAAGGATTGTCCAAG

**zu Kap. 3.3**

Bait01fo	CTAGAATTCCTTACTTCTTCAAATCCTC
Bait05re	CATGGATCCTCTCTTTGGATCATTTCCAC
Bait24re	CATGGATCCTAAACGGAGAAGAGGGGACGATTTTG
Bait25re	CATGGATCCTCATTTCCACGACGCAACGGAG
Bait26re	CATGGATCCTCATTTCCACGACGAAACGGCGAAG
Bait10re	CGAGGATCCAAGAAGTGACCGATCATATC
Bait09fo	CTAGAATTCCTCAGCGATCAAGAGCTTAAAC
Bait28fo	CATGAATTCCTGGTTCGGTAAGGAGATTTTGGAT
Bait27re	CATGGATCCTCAATCCAAAATCTCCTTACCGAACC
Bait23re	CATGGATCCTCTTCCAAAATCTCAAACCTCC
Yls1	CATTATCCTTCAGAAGGTTTTAATCTTC
Y420E	CATTATCCTTCAGAAGGTGAGAATCTTCAGTTC
R326Ef	CTCGTTCCTGAATGAATTCCTCGAGGC
R326Er	GCCTCAGAGAATTCATTCAAGAACGAG
ETR1.1188F	CTTGAATTCGGAACCTCAGGAAGAAAACCG
ETR1.3450R	CTTGAATTCCTTTACATGCCCTCGTACAG
ETR2.4036F	TAACTGCAGGCTTTCATGTTCTGATGCTTAC
ETR2.5937R	TAACTGCAGGAGATAACAACCTTAGAGAAGTTGG
ETR863re	CTAGTCGACTATTCCTCAACTCATGGACATGCC
ETR883fo	CTAGAATTCCTCGTTGAAGTCGTCGCTGA
ETR1805re	CTAGTCGACTAAAGTCCAGTGAAATTTGAATGTCGGG
ETR1814fo	CTAGAATTCCTCAATCAAATTTCACTGGACTTAAGGTTCTTGTG
AHK3.1rP	CTACTGCAGTCACGAGAATATGGGGCTGGTTGTTG
AHK3.1fN	CTACATATGGGAAGAAGATTGTGATAAAAATGAAGCAGCTC
Bri1fo	CTAGAATTCAGAGAGATGAGGAAGAGACGG
Bri1re	CTAGTCGACTCATAATTTTCTTTCAGGAACCTCTTTTATACTC
ers1.5fN	CTACATATGTTAACACAAAGAGGAGACTGGTAG
ers1.2rS	CTAGTCGACTCACCAGTTCACGGTCTGGTTTTG
ers2.5Ef	CTAGAATTCATGAAGCAGACTGAGACGAGTTTGCATGTTTC
ers2.2Sr	CTAGTCGACTCAGTGGCTAGTAGACGGAG
ein4.1fN	CTACCATGGAGAAGAGGCAGAAGGAAATGAGTG
ein4.2rB	CTAGGATCCTCACTCGCTCGCGGTCTG
ETR1.3450R2	CTTGGATCCCTTTACATGCCCTCGTACAG
ETR883fo	CTAGAATTCCTCGTTGAAGTCGTCGCTGA
Gal4AD2	GAAGATACCCCAACAAAACC
Gal4BD2	CCATCATGGAGGAGCAGAAG
Gal4BD3	GCGACATCATCATCGGAAGAG
Gal4AD3	GTTGGACGGACCAAACTGCGTATAACG
gai1Ef	CTAGAATTCAGAGAGATCATCATCATCATCAAG
gai2Br	CATGGATCCTAATTGGTGGAGAGTTTCCAAGC
gai6Br	CATGGATCCTCAGGTGGCTATGAGCGGTCTGTG
pacfor	TGCACGATGCACAGTTGAAG
pacfo2	CTCTGGCGAAGAAGTCCAAAAG
pasrev	AAATTCGCCCAGAAATAGCTTG
rga1Nf	CTACCATGGAGAGAGATCATCACCAATTCCAA
rga2Br	CATGGATCCTCAGTGCGCCGCGTTCGAGAGTTTC
rga6Br	CATGGATCCTCAGGTGGTAATGAGTGGGCGAGTG
scr1fE	CTAGAATTCGCGGAATCCGGCGATTTCAAC
scr2rX	CTACTCGAGCTAAGAACGAGGCGTCCAAG
scr6Xr	CTACTCGAGCTAAGCAGTGAGTAACGAAAGATCTTTC

**zu Kap. 3.4**

ActinATfo	TGGTGTCATGGTTGGGATG
ActinATre	CACCACTGAGCACAATGTTAC
AtLs1108F	GCTCTAGAGTAGGCACTCCCATACATACATAC
AtLs5855R	TAGGAGCTCGAGAGATACCTATGAACCACGAC
AtLs3650re	GCCCTAACACCAAAAAATTATCG
AtLs2858fo	CCTCCATCTCTCCGCATAAC
AtLsTRfo	CAAATGCTTACTTCCCTTCAAATCCTCTAGC
AtLsre	TCATTTCCACGACGAAACGG
AtLsTRre2	CATCCTAGGTCATTTCCACGACGAAACGG
stmfo	AGTTGCTTCTTCTTCTTCTCCTTC
stm3're	TGTTCCAAGTATACCGAGAACC
stmTRfo	CAAATGGAGAGTGGTTCCAACAGC
stmTRre2	CATCCTAGGTCAAAAGCATGGTGGAGGAGATG
TRAF1r	CTAGTTTAAACGATAGAAAAAGATGCTTTTGGTTCAAATG
TRAF6f	AAACTCCAAAAGAGAAGGACAAAAAACCTA

**2.1.8 Lösungen und Kulturmedien**YPD

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

TBS

0,02 M TrisHCL, pH7,6  
 150 mM NaCl (wenn nicht anders  
 angegeben)

YEP

1% Pepton  
 1% Yeast Extract  
 0,5% NaCl  
 0,5% Saccharose  
 (1% Bacto-Agar)

SD

Bacto-yeast nitrogen base, w/o amino acids  
 (0,67%)  
 Glukose (2%)  
 (Bacto-Agar (2%))  
 0,062% DO-Supplement (-Ade -His -Leu -Trp)  
 (Clontech)  
 je nach Selektion wurden 0,002% His, 0,01 % Leu,  
 0,002% Trp oder 0,02 % Ade zugeben

PBS

0,1 M NaP<sub>i</sub>, pH 8,0  
 0,1 M NaCl

**2.1.9 Computerprogramme und Datenbanken**

Als Software zur Sequenzanalyse und Verwaltung wurde das UWGCG Programmpaket benutzt (Genetics Computer Group, 1997). Für Sequenz-Suchen und -Vergleiche wurde die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, Bethesda, USA oder der *Arabidopsis Information Resource (TAIR)* (Huala et al., 2001) verwendet. Die Analyse von Proteindomänen wurde mittels der *ExpASY Proteomics tools* des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik in Genf durchgeführt.

### **2.1.10 Hefe-Zwei-Hybrid-Banken**

Zur Isolierung von Interaktionspartnern von *Las* wurden eine mittels *oligodT*-Oligonukleotid (CDS III) und eine mittels einer Mischung von zufälligen Oligonukleotiden (CDS III/6) von Hans Sommer nach dem Protokoll *MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit* (PT3529-1, Clontech) hergestellte, normalisierte Zwei-Hybrid-Banken aus vegetativen und generativen Sprossspitzen verwendet. Zur Normalisierung wurde die hergestellte cDNA mit sich selber hybridisiert und einzelsträngige cDNA über eine Hydroxylapatit-Säule isoliert (Sargent, 1987).

## **2.2 Methoden**

Alle nicht beschriebenen gängigen Labormethoden wurden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

### **2.2.1 Isolierung von DNA**

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

### **2.2.2 Isolierung von RNA aus Pflanzen**

Die Isolierung von RNA aus Pflanzen erfolgte mittels *RNeasy Plant Mini Kit* (*Qiagen*). Anschließend wurde die RNA einem DNase-Verdau unterzogen und durch Verwendung des *Protocols for RNA cleanup* (*Qiagen*) gereinigt.

### **2.2.3 cDNA-Synthese / RT-PCR**

Zur cDNA-Synthese aus zuvor isolierter RNA wurde die Superscript™ II Reverse Transkriptase von *Invitrogen* verwendet und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Es wurden generell ca. 1,5 µg RNA eingesetzt. 1 oder 2 µl der Reaktion wurde anschließend für eine PCR eingesetzt.

### **2.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)**

Wenn nicht anders angegeben, wurde eine PCR-Reaktion wie folgt angesetzt. 5 µl 10xPCR-Puffer (Sambrook und Rusell, 2001); 1,5 µl MgCl (50 mM), 0,2 µl dNTP (25 mM je Nukleotid), 0,2 µl

Taq-Polymerase und je 1 µl Primer (10 pmol/µl) wurden auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Als Vorlage wurde 1 µl der jeweiligen DNA (max. 20 ng) eingesetzt. Die Taq-Polymerase wurde von Elisabeth Schäfer nach dem Protokoll von Pluthero (1993) hergestellt.

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

1. Denaturierung bei 95°C für 3 min
2. Denaturierung bei 94°C für 20 sec
3. Annealing bei 58°C für 30 sec
4. Extension bei 72°C für 1 min
5. Extension bei 72°C für 5 min
6. Herunterkühlen auf 20°C

Die Schritte 2-4 wurden generell 32 mal wiederholt. Die verwendete PCR-Maschine war der T3 Thermocycler von *Biometra*. Bei Klonierungen für Proteinexpressionen in Hefen, Bakterien oder Pflanzen wurde die PfU-Polymerase von *Invitrogen* verwendet. Wurde eine PCR auf Hefekolonien durchgeführt, wurde ein Abstrich dieser Kolonien zunächst in 100 µl 0,02 M NaOH für 10 min inkubiert. 2 µl dieses Ansatzes wurde zur PCR eingesetzt.

### 2.2.5 Nick-Translation

Zur radioaktiven Markierung der jeweiligen Sonden für Hybridisierungen wurde die Methode der Nick-Translation angewendet. Hier wurde wie bei Sambrook und Russell (2001) vorgegangen. Abweichend dazu wurden 100 ng Sonden-DNA, meist PCR-Produkte, eingesetzt. Als radioaktives Nukleotid wurden 3 µl αdATP<sup>32</sup> (10 µCi/µl) eingesetzt. Anschließend wurde die markierte Sonde über eine Säule (Nick Columns, *Pharmacia*) durch Ausschlusschromatographie gereinigt. Die so erhaltene Sonde wurde wie unten beschrieben zur Hybridisierung eingesetzt.

### 2.2.6 Southern-Hybridisierung

Die Herstellung von DNA-Filtern zur Hybridisierung erfolgte wie bei Sambrook und Russell (2001) für den Kapillartransfer von DNA auf positiv geladene Nylonmembranen unter alkalischen Bedingungen beschrieben. Zuvor wurde das zu blottende Gel für 10 min in 1%iger HCl inkubiert. Als Transfer-Puffer wurde 0,4 M NaOH verwendet. Nach 4 Stunden war der DNA-Transfer erfolgt und die Nylonmembran wurde in 2xSSPE gewaschen.

Die eigentliche Hybridisierung wurde bei 65°C in einer Glasröhre in einem Hybridisierungssofen (400 HY, *Bachofer*) nach dem Protokoll des Membranherstellers durchgeführt. Abweichend wurde in nur 20 ml Lösung vorhybridisiert und 200 µg/ml Kalbs-Thymus-DNA (CT-DNA) zum

Blocken eingesetzt. Nach der Vorhybridisierung wurde die Lösung um ca. die Hälfte reduziert und die radioaktive Sonde (Kap.2.2.5) zugegeben und ÜN hybridisiert. Anschließend wurde ebenfalls nach Herstellerangaben gewaschen und der Filter einem Röntgenfilm exponiert.

### **2.2.7 Inkubationsbedingungen für Bakterien**

*E.coli* wurde generell mit LB-Medium bei 37°C ÜN (Sambrook und Russell., 2001) und Agrobakterien mit YEP-Medium bei 28°C für drei Tage inkubiert. Zur Platteninkubation wurde das jeweilige Medium mit 1% Agar verfestigt. Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

### **2.2.8 Inkubationsbedingungen für Hefen**

Hefen wurden auf Vollmedium (YPD) oder Selektionsmedium (SD) bei 30 °C inkubiert. Die Inkubationsdauer auf Festmedium belief sich auf 3-5 Tage. Anschließend wurden die Hefen bei 4 °C bis zu drei Monaten gelagert. Spätestens nach drei Monaten wurde ein neuer Ausstrich vorgenommen. Flüssigkulturen wurden generell ÜN auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert.

### **2.2.9 Wachstumsbedingungen für Pflanzen**

*Arabidopsis*-Pflanzen wurden bei einer Tagestemperatur von 20 - 25 °C und einer Nachttemperatur von 10 - 15 °C im Gewächshaus oder in einer Wachstumskammer gehalten, mit zusätzlichem Licht wenn erforderlich. Die ersten 28 Tage wurden jeweils Kurztagsbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) und anschließend Landtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angewendet. Tomaten wurden unter Standardbedingungen bei 25 °C am Tag und 16 °C in der Nacht im Gewächshaus (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen.

### **2.2.10 Transformation und Selektion von Bakterien**

Transformationen von Vektoren in *E.coli* wurden nach Hanahan (1983) durchgeführt. Zur Transformation von Agrobakterien wurde kompetenten Zellen ca. 1 µg DNA zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µl YEP wurden die Zellen für 3 h bei 28 °C gerollert und anschließend ausplattiert. Dem Medium für Bakterien wurde je nach Selektionsmarker der transformierten Vektoren Ampicilin (200 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Gentamycin (25

µg/ml), Rifampicin (100 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml) oder Tetracyclin (10 µg/ml) beigefügt.

### **2.2.11 Transformation und Selektion von Hefen**

Die Transformation von Hefe erfolgte nach der LiAc-Methode von Gietz und Woods (2002). Zur Einfach- und Doppeltransformation von GAL4-Expressionsvektoren wurden 1 µg des jeweiligen Vektors eingesetzt. Die Transformanten wurden auf entsprechendem Minimalmedium ohne Leucin und/oder Tryptophan selektiert. Zur Selektion auf Proteininteraktion fehlte dem Medium zusätzlich Histidin oder Histidin und Adenin. Um die Stringenz des Histidin-Reportergens zu erhöhen wurde der kompetitive Inhibitor 3-Aminotriazol (3-AT) in Konzentrationen von 0,5 mM bis 50 mM zugegeben.

### **2.2.12 Transformation und Selektion von Pflanzen**

Transformationen von *Arabidopsis*-Pflanzen wurden nach Bechtold et al. (2000) durchgeführt. Zur Selektion von transgenen Pflanzen in der T1 wurde 10 und 17 Tage nach Auslegen der Samen 250 mg/l Glufosinat (BASTA<sup>®</sup>, Hoechst) gesprüht. Zur Segregationsanalyse in der T2 wurde die gleiche Konzentration einmal nach der Identifikation des jeweiligen Phänotyps gesprüht.

### **2.2.13 Sequenzierungen**

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

### **2.2.14 RNA *in situ*-Hybridisierungen**

#### **2.2.14.1 Beschreibung der Sonden**

*REV*-Sonden enthielten die bp 682 bis 2611 und *LAS*-Sonden die bp 2 bis 1348 jeweils bezüglich des Startcodons auf der cDNA. *STM* Sonden beinhalteten die bp 78 bis 1122, *CUC1*-Sonden bp 501-961, *CUC2*-Sonden bp 496-1128 und *ETR1*-Sonden bp 409-2217 jeweils des

offenen Leserasters. Für *SCR*-Sonden wurde das gesamte offene Leseraster verwendet. Für das *Ls*-Gen aus Tomate wurde der Bereich von bp 112 bis bp 1224 des offenen Leserasters verwendet. Die Fragmente wurden entweder in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung relativ zum T7-Promotors in pGEM-Vektoren kloniert. Je 1 µg linearisierter Vektor wurde für die Transkription durch die T7-Polymerase eingesetzt. Eine Ausnahme bildeten die Sonden für das *Ls*-Gen der Tomate. Hier wurden PCR-Produkte mit Oligonukleotiden hergestellt, von denen eins je nach Orientierung der RNA den T7-Promotor enthielt (*Lsfoxt* + *Lsre* für die Sinn-Orientierung, *Lsfo* + *Lsrext* für die Gegensinn-Orientierung, Kap.2.1.7). Das PCR-Produkt wurde jeweils als Vorlage für die RNA-Synthese verwendet.

#### **2.2.14.2 Präparationen und Durchführung der Hybridisierungen**

Die Präparation des Pflanzenmaterials, die Herstellung der Schnitte (8 µm) und der Sonden und die Hybridisierung wurde nach Coen et al. (1990) mit einigen kleineren Änderungen durchgeführt. So wurde 0,03% Tween 20 zum Fixativ für das Pflanzenmaterial zugegeben. Das Entwässern nach der Fixierung wurde ohne NaCl durchgeführt. Zur Sondenherstellung wurde nur DIG-markiertes UTP verwendet. Die Zeit zur Sondenhydrolyse wurde nach Jackson (1991) für 150 nts ermittelt. Nach der Farbreaktion wurden die Schnitte mit 30% Glycerin bedeckt und mittels *Differential Interference Contrast* (DIC) unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Zum Fotografieren der Tomaten-Schnitte wurde einfaches Durchlicht verwendet.

#### **2.2.15 Methoden zum Hefe-Zwei-Hybrid-System**

##### **2.2.15.1 Proteinisierung aus Hefen**

Zur Bestätigung der Expression der transformierten Sequenzen wurden Proteinextrakte aus den jeweiligen Hefestämmen hergestellt. Dazu wurde zunächst mit einer 10 ml ÜN-Kultur in entsprechendem Selektionsmedium eine 50 ml Kultur YPD angeimpft und diese bei einer Dichte von 0,5 OD<sub>600</sub> auf Eis heruntergekühlt, abzentrifugiert, gewaschen und bei -70°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend in TCA-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8; 50 mM Ammoniumacetat; 2 mM EDTA, 5 µg/ml Pepstatin A; 1,5 µM Leupeptin; 7,25 mM Benzamidin; 18,5 µg/ml Aprotinin; 0,01742 % PMSF) aufgenommen und durch Vortexen mit 20 % TCA und Glasperlen aufgeschlossen. Nach Absetzen der Glasperlen wurde der Überstand abzentrifugiert, das resultierende Pellet in Laemmli-Auftragspuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen und nach 5 min bei 95 °C bei -70 °C gelagert.

### **2.2.15.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western**

5 µl der so entstandenen Proteinextrakte wurden auf einem denaturierenden PAA-Gel nach Laemmli (1970) aufgetrennt und mittels Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) nach Herstellerangaben auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese Membran wurde zunächst für 5 min in TBS (Kap.2.1.8) gewaschen, anschließend für 1 h in Blocking-Puffer (TBS + 5% Milchpulver) geblockt und daraufhin für 1 h in Blocking-Puffer mit 1:5000 verdünntem erstem Antikörper (Anti-GAL4BD oder Anti-GAL4AD, Kap.2.1.4) inkubiert. Nach 3 x 15 min in TBS-T (TBS + 0,1% Tween 20) und 1 x 15 min in TBS wurde die Membran für 1 h in Blocking-Puffer mit 1:5000 verdünntem zweiten Antikörper (Anti-Maus, Peroxidase gekoppelt, Kap.2.1.4) inkubiert. Nach 2 x 15 min in TBS-T, 2 x 10 min in TBS-T (300 mM NaCl) und 5 min in TBS erfolgte die Detektion der gebundenen Peroxidase mittels *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat* (Pierce) und der Exposition eines Röntgenfilms für 1 – 10 min. Alternativ wurden die Antikörper-Inkubationen bei 4 °C ÜN durchgeführt.

### **2.2.15.3 Durchsuchen einer Hefe-Zwei-Hybrid Bank**

Das Durchsuchen einer Hefe-Zwei-Hybrid-Bank wurde nach Soellick und Uhrig (2001) durchgeführt. Dafür wurden die von Hans Sommer in AH109 transformierten Banken (Kap.2.1.10) mit dem *Gal4BD::Las* exprimierenden Stamm Y187 konjugiert. Die Effizienz der Konjugation wurde durch das Ausstreichen eines Aliquots des Ansatzes auf SD-LW bestimmt. Zur Selektion von möglichen mit *Las* interagierenden Proteinen erfolgte dann der Ausstrich der resultierenden Zygoten auf SD-LWHA dem zur Unterdrückung der selbstaktivierenden Eigenschaften des *Las*-Proteins 50 mM 3-Aminotriazol zugefügt war. Zur Verifizierung der gefundenen Kandidaten wurden diese gepickt und nochmals auf Selektionsmedium ausplattiert. Anschließend wurde auf den gewachsenen Kolonien eine PCR mit den Primern *GAL4AD3* und *paco2* durchgeführt (Kap.2.2.4). Die resultierenden PCR-Produkte wurden zunächst auf einem Agarose-Gel kontrolliert und 5 µl des PCR-Ansatzes daraufhin zusammen mit 15 ng des mit *EcoRI* und *Sall* linearisierten und dephosphorylierten (1,5 µg DNA, 10 µl 10xPuffer, 3 µl *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, ad 100 µl H<sub>2</sub>O, 20 min bei 37 °C) pGADT7 in AH109 transformiert. Die Transformationsansätze wurden nach einer Inkubation von zwei Tagen in 100 µl SD-Leu auf SD-Leu gestempelt. Die Doppeltransformation führt dazu, dass die transformierten Hefen die PCR-Produkte durch eine homologe Rekombination in pGADT7 rekombinieren. Negativkontrollen, bei denen lediglich der linearisierte und dephosphorylierte pGADT7 transformiert wurde ergaben keine Transformanten. Die erhaltenen Transformanten

wurden anschließend wieder mit PCR getestet. Zur Kontrolle der DNA bindenden Aktivität der gefundenen Kandidaten wurden diese dann auf SD-LH (50 mM 3-AT) gestempelt. Als Positivkontrolle diente hier mit pCL1 transformierter AH109. Mit den übrigen in SD-Leu inkubierten Kulturen wurde eine Konjugation mit dem *Gal4BD::Las* exprimierenden Stamm Y187 durchgeführt. Dazu wurde aus einer ÜN-Kultur 100 µl auf die in SD-Leu inkubierten Kandidaten gegeben. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und für zwei Tage in YPD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und auf SD-LW gestempelt. Die resultierenden Hefen wurden wiederum mit PCR getestet und daraufhin auf SD-LWHA (50 mM 3-AT) gestempelt. Als Negativkontrolle diente hier *Gal4BD::Las* und *Gal4AD* exprimierender AH109. Wurden die Kandidaten über diese Prozedur bestätigt, wurden die jeweiligen PCR-Produkte sequenziert.

## 2.2.16 Methoden zum *in vitro*-Nachweis von Proteininteraktionen

### 2.2.16.1 *Proteinexpression in E.coli*

Zur Expression von Proteinen in *E.coli* wurde das pET-Vektorsystem von Novagen (Kap.2.1.6.1) verwendet. Nach Transformation von BL21-CodonPlus(DE3)-RP-X (Kap.2.1.5.1) mit dem entsprechenden Konstrukt und der Selektion auf Platte wurde eine 10 ml Kultur LB mit den entsprechenden Antibiotika ÜN inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 50 ml Kultur LB wiederum mit den entsprechenden Antibiotika 1:60 angeimpft. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden einige Aliquots abzentrifugiert und bei -70°C eingefroren. Die restliche Kultur wurde mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und nach 4 h weiterer Inkubation ebenfalls abzentrifugiert und eingefroren.

### 2.2.16.2 *Native Aufreinigung von GST-fusionierten Proteinen*

Zur nativen Aufreinigung von GST-fusioniertem *Las*-Protein wurden die in pET42a klonierten *Las*-Fragmente in BL21 transformiert und diese so entstandenen Stämme nach Kap.2.2.16.1 aufgearbeitet. Als Kontrolle diente ein nur mit pET42a transformierter Stamm, der lediglich GST exprimiert. Zunächst wurden die Zellen in 5 ml PBS aufgenommen und mittels Sonifizierung aufgeschlossen. Zu dem Ansatz wurde daraufhin 100 µl Triton X-100 gegeben, der dann 25 min leicht gerollert wurde. Nach dem Abzentrifugieren von Zellresten wurde der Überstand mit 100 µl in PBS vor-äquilibrierter Gluthation Agarose 4B (Fluka) versetzt und für 30 min leicht gerollert. Die Gluthation-Matrix wurde anschließend abzentrifugiert und nach dreimaligem

Waschen mit 500  $\mu$ l PBS zweimal mit 100  $\mu$ l frisch angesetztem reduziertem Gluthation (10 mM in 50 mM Tris/HCl pH 8,0) eluiert. Die gesamte Prozedur wurde auf Eis oder im 4 °C-Raum durchgeführt. Aliquots der verschiedenen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE untersucht.

### **2.2.16.3 Denaturierende Aufreinigung von His<sub>(6)</sub>-fusionierten Proteinen und anschließende Renaturierung**

Zur denaturierenden Aufreinigung von His<sub>(6)</sub>-fusioniertem *Las*-Protein wurde dieses, kloniert in pET28a, ebenso in BL21 transformiert und der so entstandene Stamm nach Kap.2.2.16.1 aufgearbeitet. Aus dem resultierenden Zellpellet wurde mittels HiTrap<sup>TM</sup> Säulen (amersham pharmacia) His<sub>(6)</sub>-fusionierte Proteine nach Herstellerangaben gereinigt. Diese Reinigung beruht auf der Eigenschaft der sechs aufeinander folgenden Histidine an Nickel zu binden, das seinerseits an die Säulen-Matrix gebunden ist. Der Aufschluss des Zellpellets erfolgte nachdem dieses in Lysis-Puffer (8 M Harnstoff; 0,02 M NaPO<sub>4</sub> pH7,4; 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol) aufgenommen worden war ebenso wie in Kap.2.2.16.2. Nach der Gabe der aufgeschlossenen Zellfraktion auf die Säule wurde diese mit 5 Säulenvolumen Lysis-Puffer mit 0,05 M Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte durch 3 ml Lysis-Puffer mit 0,5 M Imidazol. Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde durch Messen der OD<sub>260/280</sub> bestimmt ( $\text{mg/ml} = 1,55 \text{ OD}_{280} - 0,76 \text{ OD}_{260}$ ). Zur Renaturierung wurden das Eluat in eine Dialysekammer (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette<sup>®</sup>, Pierce) gegeben und durch schrittweise Dialyse gegen abnehmende Konzentrationen von Harnstoff in Lysis-Puffer ohne Harnstoff überführt (4 M; 2 M; 1 M; 0,5 M, 0 M, jeweils 1,5 h bei 4 °C, letzter Schritt über Nacht). Die dialysierte Proteinfraction wurde mit 25 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden wiederum mittels SDS-PAGE untersucht.

### **2.2.16.4 Nachweis von Proteininteraktionen durch Protein-Overlay**

Der Protein-Overlay-Assay wurde entsprechend den Beschreibungen von Owen et al. (1999) durchgeführt. Dazu wurde *ETR1* und *LAS* mit Stopcodon am C-Terminus in pET21a kloniert und in BL21 transformiert. Diese Stämme wurden wiederum wie in Kap.2.2.16.1 aufgearbeitet. Die resultierenden Zellpellets vor und nach der Induktion durch IPTG wurden in Lämmli-Auftragspuffer aufgenommen, und nach Erhitzen für 5 min bei 95 °C durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend unter renaturierenden Bedingungen (Novex EI9051 – XCELLII Blot Modul) nach Sambrook und Russell (2001) auf eine PVDF-Membran transferiert

(Glenney und Weber, 1983). Die Membran wurde anschließend in Blocking-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 1% Milchpulver) für 1 h geblockt und nach 2 x 5 min Waschen in 20 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit 2 µg/ml His<sub>6</sub>-fusioniertem *Las*-Protein in Blocking-Puffer für 1 h inkubiert. Nach 1 x 15 min und 4 x 5 min Waschen in TBS-T (50 mM NaCl) wurden die Proteine mit 0,3% Glutaraldehyd in 20 mM Tris/HCL, pH 7,6 ÜN kovalent verknüpft. Nach weiteren Waschsritten wurde His<sub>6</sub>-fusioniertes *Las*-Protein mittels Anti-Penta-His-Antikörper (0,2 µg/ml; Qiagen, Kap.2.1.4) detektiert der wiederum mit Anti-Maus-HRP (Bio-Rad, Kap.2.1.4) nachgewiesen wurde. Die Signalentwicklung erfolgte wie in Kap.2.2.15.2.

### 2.2.17 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) wurde mit Unterstützung von Rolf-Dieter Hirz an einem DSM 940 (Zeiss) durchgeführt. Pflanzenmaterial wurde dazu zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und im Vakuum mit einer Goldschicht bedampft.

## 2.3 Verwendete Abkürzungen

Verwendete Maßeinheiten richten sich nach dem System für internationale Maßeinheiten. Chemische Elemente werden mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet.

A	Adenosin / Adenin
Abb	Abbildung
AD	aktivierende Domäne des <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktors
ANT	<i>AINTEGUMENTA</i>
AS	Aminosäure
AS1	<i>ASYMMETRIC LEAVES 1</i>
AS2	<i>ASYMMETRIC LEAVES 2</i>
3-AT	3-Aminotriazol
BD	DNA-bindende Domäne des <i>Gal4</i> -Transkriptionsfaktors
bp	Basenpaar
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
CLV	<i>CLAVATA</i>
CTR1	<i>CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1</i>
CUC	<i>CUP-SHAPED COTYLEDON</i>
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIN	<i>ETHYLEN INSENSITIVE</i>
ERS	<i>ETHYLEN RESPONSE SENSOR</i>

---

<i>ETR</i>	<i>ETHYLEN RESPONSE</i>
G	Guanosin
GA	Gibberellinsäure
<i>GAI</i>	<i>GA INSENSITIVE</i>
GST	Gluthation-S-Transferase
H	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
<i>KNAT</i>	<i>KNOX</i> -Gene aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>KNOX</i>	<i>Knotted1</i> -ähnliche Homeobox-Gene
L	Leucin
<i>LAS</i>	<i>LATERAL SUPPRESSOR</i> aus <i>Arabidopsis</i>
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
LM	laterales Meristem
<i>LOB</i>	<i>LATERAL ORGAN BOUNDARIES</i>
<i>Ls</i>	<i>Lateral suppressor</i> aus Tomate
M	molar
mRNA	Boten-RNA
nts	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>REV</i>	<i>REVOLUTA</i>
<i>RGA</i>	<i>REPRESSOR OF GA1-3</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAM	Sprossapikalmeristem
SEM	Scanning Electron Microscopy
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
T	Thymin
TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
ÜN	über Nacht
UTP	Uridin-Triphosphat
W	Tryptophan
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 **Analyse der LAS-Transkriptverteilung durch RNA in situ-Hybridisierung**

##### 3.1.1 **Allgemeine Bemerkungen zur Methode der RNA in situ-Hybridisierung**

Entscheidende Hinweise zur Funktion eines Gens im Organismus lassen sich zum einen durch den Phänotyp der entsprechenden Mutante und zum anderen durch die Analyse des Expressionsmusters gewinnen. Der mutante Phänotyp gibt Auskunft darüber, an welchem Vorgang und in welchem Ausmaß daran das entsprechende Gen innerhalb des Organismus beteiligt ist. So macht sich im vorliegenden Fall der Ausfall des *LATERAL SUPPRESSOR* Gens hauptsächlich in Blattachsen bemerkbar, in denen ohne diese Genfunktion in der vegetativen Wachstumsphase keine Seitentriebe mehr gebildet werden. Die Analyse des Expressionsmusters lässt im Vergleich mit dem mutanten Phänotyp Rückschlüsse auf dessen Funktion zu. So lässt sich etwa die Frage beantworten, ob der Ort der Expression mit dem Ort der Wirkung identisch ist und ob insofern Transport für die Funktion eine Rolle spielt. Weiterhin kann der Frage nachgegangen werden, ob die Expression eine Eigenschaft einer bestimmten Zellgruppe ist und die lokale Wirkung schon durch die lokale Expression bedingt ist. Neben der räumlichen Beziehung zwischen Expression und Wirkungsort lässt auch die zeitliche Beziehung Rückschlüsse auf die Funktion des betrachteten Gens zu. Die Analyse des Expressionsmusters hilft insofern die biologische Rolle des untersuchten Gens innerhalb des Organismus weiter aufzuklären.

Methodisch lässt sich die Expression eines Gens auf zellulärer Ebene einmal durch die Verwendung von Reportergenen, wie zum Beispiel des GUS-Gens oder durch GFP unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors analysieren (Ziemienowicz, 2001). Hierbei geben die resultierenden Signale das Ergebnis von Transkription, Translation und jeglicher Art von Transport oder Diffusion des Reporterproteins oder dessen mRNA wieder. Weiterhin lassen sich Proteine *in situ* durch spezifische Antikörper lokalisieren (Lam et al., 2001). Im vorliegenden Versuchsteil wurde die Methode der RNA *in situ*-Hybridisierung (RNA-ISH) zur Analyse der Transkription des *LAS* Gens verwendet. Diese beruht auf dem Nachweis einer bestimmten mRNA in Gewebeschnitten durch die Hybridisierung mit der entsprechenden Gegensinn-RNA

die aufgrund des eingebauten mit Digoxigenin (DIG) markiertem UTPs mittels Anti-DIG-Antikörper nachgewiesen werden kann. Die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase lässt sich wiederum durch die Verwendung eines Substrates nachweisen, das von dem Enzym in ein farbiges Präzipitat umgesetzt wird. Die resultierende Farbentwicklung gibt insofern einen Überblick über die Verteilung der mRNA des untersuchten Gens im Gewebe (Jackson, 1991; Panoskaltis-Mortari und Bucy, 1995).

Die Frage der mit allen Ansätzen zur Untersuchung der Expression nachgegangen wird, ist die nach der Aktivität eines Gens im Organismus. Diese wird bedingt durch die Transkription, die Translation, mögliche für die Funktion des Proteins wichtigen Modifikationen und alle erdenklichen Formen des Transportes der RNA oder des Proteins von Zelle zu Zelle. Sowohl die Verwendung von Reportergenen und der immunologische Nachweis durch Antikörper als auch die RNA-ISH haben insofern ihre Limitierungen. Die Lokalisation des Reporterproteins kann sich von der des untersuchten Proteins aufgrund von unterschiedlichen Transporteigenschaften, Stabilität der RNA oder des Proteins oder durch Diffusion der Signale unterscheiden (Nakajima et al., 2001). Insofern stellt der Nachweis durch Antikörper den direkteren Weg zur Expressionsanalyse dar. Diese Methode wird allerdings häufig, wie auch im vorliegenden Fall, durch die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper beschränkt. Die Nachteile der hier verwendeten RNA-ISH liegen darin, dass lediglich die Transkript-Verteilung und nicht die Translation und der mögliche Transport des jeweiligen Proteins erfasst wird. Demgegenüber hat diese Methode den Vorteil, dass die mRNA im Gewebe direkt nachgewiesen wird und insofern die tatsächliche Situation im Organismus auf dieser Ebene wiedergibt.

### **3.1.2 In der vegetativen Phase markiert die Transkription von *LAS* den Achselbereich von Blattprimordien**

Der Verlust der Funktion von *LAS* hat bezüglich der Seitentriebentwicklung in der Pflanze eine Auswirkung in der vegetativen Phase, in der, im Gegensatz zur generativen Phase, die Entwicklung der Seitentriebe gestört ist. Um die Frage zu beantworten, ob sich die unterschiedliche Notwendigkeit der Genfunktion für die Seitentriebentwicklung auf der Ebene der Transkription wiederfindet, wurde diese in beiden Phasen analysiert. Da in der Literatur Unterschiede der Seitentriebentwicklung zwischen dem Ökotyp Columbia und dem Ökotyp Langsberg *erecta* beschrieben sind, wurde die *LAS*-Transkription in beiden Ökotypen untersucht.

Falls nicht besonders auf den Ökotyp eingegangen wird, handelt es sich hier um den Ökotyp Columbia.

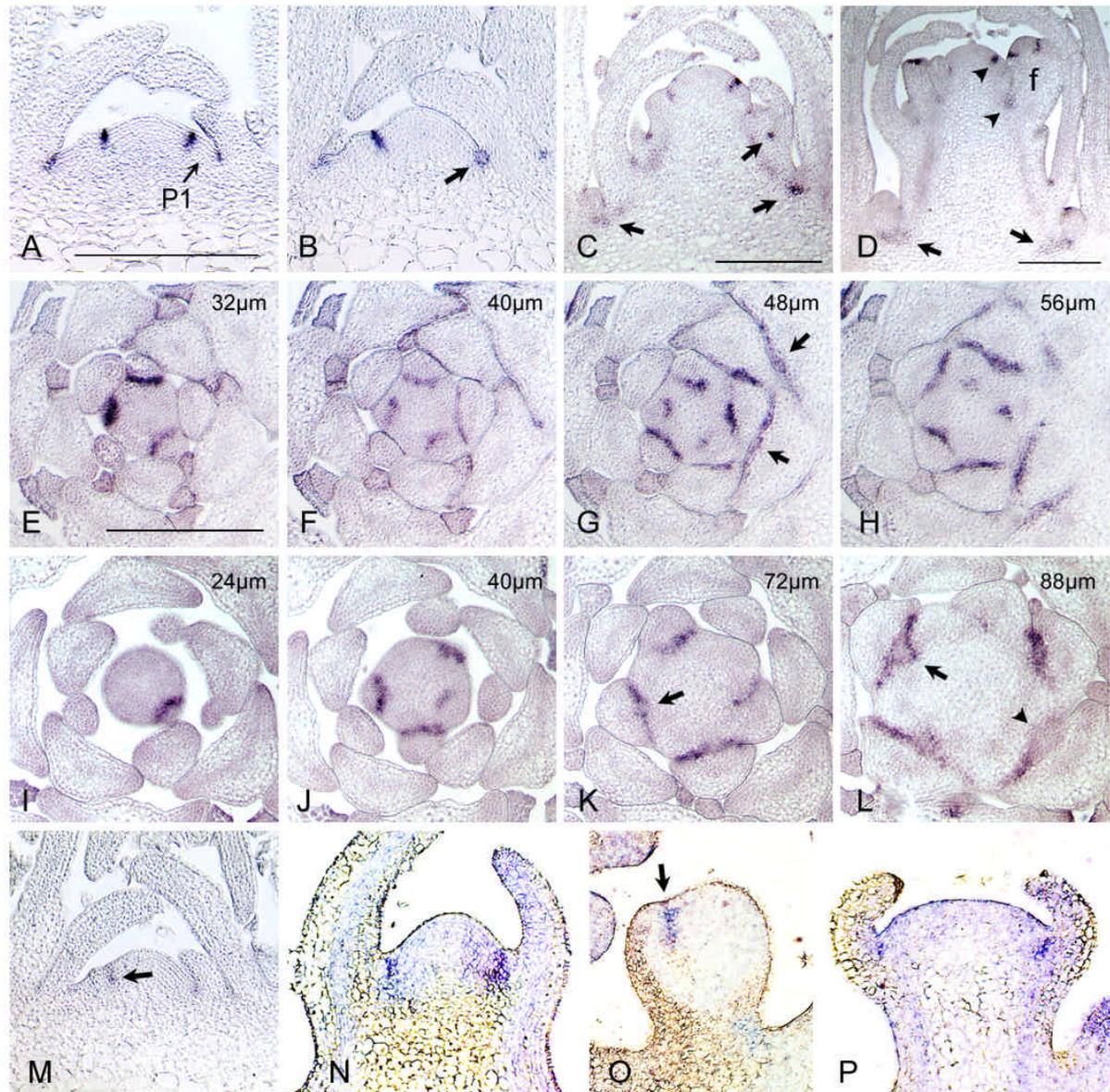
### **3.1.2.1 Die LAS-Transkriptverteilung in der vegetativen Phase von Columbia**

Die Expressionsdomäne von *LAS* wurde zunächst in vegetativen *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps Columbia in Längs- und Querschnitten analysiert. Hierzu wurden Pflanzen für 28 Tage im Kurztag angezogen, so dass sich diese bei der Ernte im vegetativen Zustand befanden. Die Präparation des Pflanzenmaterials, die Herstellung der Sonde und die eigentliche Hybridisierung wurde wie beschrieben durchgeführt (Kap.2.2.14).

Wie in Längsschnitten durch das Zentrum des vegetativen Sprossapikalmeristems (SAM) zu sehen, findet sich *LAS*-Transkript in diesem Entwicklungsstadium unterhalb der Einkerbung zwischen Blattprimordium und weiter zentral liegendem Gewebe (Abb.3-1 A). Querschnitte zeigen, dass sich diese Domäne entlang der gesamten adaxialen Basis der Primordien zieht (Abb.3-1 E-H). Dieser Bereich wird hier als Blattachsel bezeichnet. Zur Bezeichnung der Blattprimordien wurde auf die Nomenklatur von Long und Barton (2000) zurückgegriffen. Diese definiert das jüngste Primordium, das gerade als Vorwölbung an der Flanke des Meristems zu identifizieren ist, als P1 und alle älteren mit aufsteigender Nummerierung. Beginnend mit P1 (Abb.3-1 A, Pfeil) konnte in Querschnitten (Abb.3-1 E-H) das Transkript bis zu P20/21 detektiert werden. In Blattachsen älter als P22 war kein Transkript mehr nachzuweisen. Die adaxial-abaxiale Ausdehnung der Transkript-Verteilung beträgt zunächst ein bis zwei Zellschichten, wobei sich die Domäne über die L1, L2 und L3 Zellschicht des SAMs erstreckt (Abb.3-1 A). Die longitudinale Ausdehnung der Domäne reduziert sich von drei bis fünf Zellschichten in den jüngsten fünf Primordien auf ein bis zwei Zellschichten in älteren Primordien und ist ab P7 eher der Basis des Blattprimordiums zuzuordnen (Abb.3-1 G, Pfeile). Die hier gemachten Angaben wurden in vier unabhängigen Hybridisierungen mit insgesamt zehn auswertbaren Apices bestätigt.

Auf histologischer Ebene konnte in Columbia in zehn analysierten Apices ein laterales Meristem durchschnittlich ab P21/22 als Zellgruppe mit relativ zu ihrer Umgebung kleinen cytoplasmatischen Zellen identifiziert werden. Die gleiche Beobachtung machen auch Stirnberg et al. (2002) für 36 Tage alte vegetative Columbia-Pflanzen.

Zusammenfassend lässt sich die Domäne der *LAS*-Transkript-Akkumulation in der vegetativen Phase als bandförmiger Bereich entlang der adaxialen Basis der Blattprimordien von P1 bis P21/22 beschreiben.



**Abb.3-1: Analyse der Transkription von *LATERAL SUPPRESSOR* in *Arabidopsis* (A-M) und Tomate (N-P):** A-H Columbia, I-L Langsberg *erecta*, A: Längsschnitt durch ein 28 Tage altes vegetatives Meristem. Beginnend mit P1 ist das *LAS*-Transkript detektierbar unterhalb der Spalte zwischen Blattprimordium und adaxialem Gewebe. B-D: Pflanzen angezogen für 28 Tage im Kurztag und anschließend für 2 (B), 4 (C) und 6 (D) zusätzliche Tage im Langtag. E-L: Sukzessive Querschnitte von 28 Tage alten Columbia- (E-H) und Langsberg *erecta*-Pflanzen (I-L) angezogen im Kurztag. Die ungefähre Entfernung von der Spitze des Meristems bis zur Mitte der Schnitte ist in der rechten oberen Ecke der Abbildungen verzeichnet. Da Langsberg *erecta* zu diesem Zeitpunkt stärker gestreckt ist als Columbia, sind hier nicht alle seriellen Schnitte abgebildet. M: *LAS*-Transkription in *las-4*. N: Vergleichbar mit der Situation in *Arabidopsis* ist auch im vegetativen Tomaten-SAM Transkription in den Achseln der Blattprimordien zu finden. O: Ebenso ist die *Ls*-RNA in den Achseln von Tomaten-Blüten lokalisiert. P: *Ls*-RNA Detektion in den Achseln der Sepalen in der Blüte. Größenstandards: 200 µm, die selbe Dimension in A, B und M und die selbe Dimension in E-L. Weitere Beschreibung im Text.

### **3.1.2.2 Die LAS-Transkriptverteilung in der vegetativen Phase von *Landsberg erecta***

Ebenso wie Pflanzen vom Ökotyp Columbia wurden vegetative Pflanzen vom Ökotyp *Landsberg erecta* bezüglich *LAS*-Transkription analysiert. Auch in diesem Ökotyp findet sich *LAS*-Transkript entlang der adaxialen Basis der Blattprimordien von P1 bis P21/22 und ist insofern mit der Expression in Columbia vergleichbar (Abb.3-1 I-L). Ein auffälliger Unterschied zur Situation in Columbia ist jedoch, dass sich im zentralen Bereich der Expressionsdomäne ab P6/7 Zellen mit schwächerer, beziehungsweise ohne *LAS*-Transkription finden (Abb.3-1 K, L, Pfeile). Diese Zellen sind von Zellen umgeben, in denen weiterhin *LAS*-Transkript detektiert wird. Die Region in der die Transkription von *LAS* herunterreguliert wird, entspricht dem Bereich in dem sich in Achseln von Primordien ab P9/10 eine Gruppe von relativ zu ihrer Umgebung kleinen cytoplasmatischen Zellen identifizieren lässt (Abb.3-1 L, Pfeil, Pfeilspitze). Ab diesem Entwicklungsstadium lässt sich insofern in *Landsberg erecta* histologisch der erste Hinweis auf ein laterales Meristem (LM) finden. Dies bestätigt die Beobachtung von Long und Barton (2000) für 23 bis 25 Tage alte vegetative *Landsberg erecta* Pflanzen.

### **3.1.2.3 Analyse der *LAS*-Transkriptverteilung in der *las*-Mutante**

Um eine mögliche Wirkung des *LAS*-Proteins auf die Transkription des *LAS*-Gens selber zu ermitteln, wurde zudem die Transkription in ebenfalls 28 Tage alten vegetativen *las-4*-Pflanzen untersucht. Es wurde hierbei kein Unterschied in der Ausdehnung der Transkriptionsdomäne festgestellt (Abb.3-1 M, Pfeil). Allerdings ist das Signal im Vergleich zum Wildtyp deutlich schwächer (vergl. Abb.3-1 A). Hier kann nicht entschieden werden, ob der Grund dafür in der wegen der vorzeitig abgebrochenen Translation höheren Instabilität der mRNA oder in einem positiven Rückkopplungseffekt des *Las*-Proteins auf die *LAS*-Transkription liegt.

### **3.1.3 In der generativen Phase findet sich die Transkription von *LAS* in den Achseln von Stängelblättern, Blüten und Sepalen**

Durch die Änderung der Lichtbedingungen von Kurztag zu Langtag (Kap.2.2.9) tritt *Arabidopsis thaliana* von der vegetativen in die generative Wachstumsphase. Dies ist an der Umstellung des SAMs von der Anlage von Blättern auf reproduktive Organe, den Blüten, und die Streckung des primären Sprosses zu erkennen. Hempel und Feldmann (1994) beschreiben, dass es sich bei den unmittelbar nach der Überführung in den Langtag angelegten Primordien bereits um

Blütenprimordien handelt und bei *Arabidopsis* insofern keine erkennbare Übergangsphase existiert.

Um die Transkription von *LAS* und deren mögliche Änderung während des Wechsels von vegetativer zu generativer Wachstumsphase analysieren zu können, wurden Pflanzen zwei, vier und sechs Tage nach der Überführung in den Langtag geerntet und wie beschrieben analysiert.

Zwei Tage nach der Überführung in den Langtag unterscheidet sich der Sprossapex morphologisch nicht wesentlich von vegetativen Sprossspitzen. Es ist lediglich eine etwas stärkere Streckung in Längsrichtung zu erkennen (Abb.3-1 B). Die mRNA von *LAS* findet sich auch hier in den Achseln der Blattprimordien mit einer vergleichbaren Ausdehnung wie unter reinen Kurztagbedingungen. Einen qualitativen Unterschied stellt jedoch der Befund dar, dass sich in einigen Achseln in der Nähe des SAMs *LAS*-Transkriptionsdomänen finden in deren Zentrum Zellen mit geringerer *LAS*-Transkription lokalisiert sind (Abb.3-1 B, Pfeil). Diese Beobachtung wurde in der vegetativen Phase lediglich in Langsberg *erecta* Pflanzen gemacht (Kap.3.1.2.2), in Columbia wurde dies vor der Überführung in den Langtag nie gefunden.

Bei vier Tage unter Langtagbedingungen gehaltenen Pflanzen ist eine deutliche Streckung des primären Sprosses gegenüber vegetativen Pflanzen zu erkennen (Abb.3-1 C). Bis zu diesem Zeitpunkt kann morphologisch noch nicht eindeutig entschieden werden, ob es sich bei den neu angelegten Primordien des SAMs noch um Blatt- oder bereits um Blütenprimordien handelt. Die mRNA von *LAS* ist allerdings auch vier Tage nach der Überführung in den Langtag und des nun deutlich erkennbaren Wechsels zur generativen Wachstumsphase in den Achseln der lateralen Organe des SAMs zu finden. Weiterhin wird *LAS*-Transkript an der Basis von Seitentrieb-Knospen in den Achseln von Blattprimordien entlang des sich streckenden Sprosses und der Rosette detektiert (Abb.3-1 C, Pfeile). Das Vorhandensein von Knospen in dieser Nähe zum SAM wurde an vegetativen Pflanzen nicht beobachtet (Kap.3.1.2.1). Insofern findet sich spätestens vier Tage nach der Überführung der beschriebene basipetale Gradient der Seitentriebentwicklung in der generativen Phase wieder (Hempel und Feldmann, 1994; Grbic und Blecker, 2000).

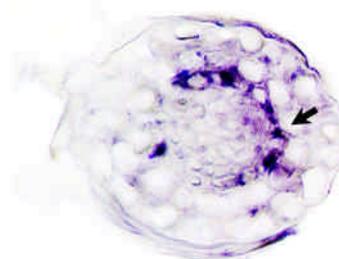
Nach sechs Tagen unter Langtagbedingungen hat sich die Streckung des primären Sprosses weiter verstärkt. Zudem sind die lateralen Primordien nun eindeutig als Blütenprimordien zu identifizieren (Abb.3-1 D, f). Auch hier akkumuliert die mRNA von *LAS* in den Achseln der

lateralen Organe des SAMs, d.h. in diesem Fall eindeutig in den Achseln von Blütenprimordien (Abb.3-1 D, Pfeilspitzen). Die Transkription in diesem Bereich hält zumindest bis zu Stadium 3-4 der Blütenentwicklung an. Wie schon nach vier Tagen unter Langtagbedingungen wird auch nach sechs Tagen *LAS*-RNA an der Basis von sich entwickelnden Seitentriebknospen entlang des Sprosses und in der Rosette detektiert (Abb.3-1 D, Pfeile). Die Domäne besitzt hier die Form einer die Basis der Knospe umfassenden Schale, deren Boden in Richtung Hauptspross ausgezogen ist. Aus dem Bereich der *LAS*-Transkriptionsdomäne zwischen Tragblatt und etablierter Knospe entspringen teilweise akzessorische Seitentriebe. Da die *las*-Mutation zu einer Reduktion der Bildung von akzessorischen Seitentrieben führt, hat *LAS* offenbar auch eine Funktion nachdem die primäre Knospe etabliert ist (O. Clarenz, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich zur Transkription in den Achseln der lateralen Organe des primären Sprosses wird *LAS* in den Achseln der Sepalen der Blüte transkribiert (Abb.3-1 D, f). Die Transkription in der Blüte ist bis zum Auswachsen der Petalen im Stadium 3-4 der Blütenentwicklung zu finden.

Die Analyse der Transkription von *LAS* während der Transition von *Arabidopsis*-Pflanzen von der vegetativen zu generativen Phase zeigt also, dass zu allen analysierten Zeitpunkten Transkription in den Achseln von lateralen Organen des SAMs zu finden ist. Zusätzlich findet sich die Transkription in der Blüte in den Achseln der Sepalen.

### 3.1.4 Analyse der Transkription von *LAS* in der Wurzel

RT-PCR Experimente zur Transkription von *LAS* weisen diese in Sprossspitzen, Blüten und Wurzeln nach. In Blättern und Internodien wird keine Expression gefunden (G. Schmitz, unveröffentlichte Daten). Die bisherigen RNA *in situ*-Experimente bestätigen diese Befunde für Sprossspitzen und Blüten. Mittels RNA-ISH wurde ebenso versucht die Expression des Gens in der Wurzel zu analysieren. Trotz mehrerer Versuche konnte allerdings kein spezifisches Signal in der Wurzel detektiert werden, obwohl eine RT-PCR auf dem gleichen Gewebe positiv war. Analysiert wurden hier Wurzeln von Keimlingen, ebenso wie ältere Wurzeln. Besonderes Augenmerk wurde auf die Wurzelspitze und die Verzweigungspunkte der Wurzel gelegt. Zudem wurden verschiedene Fixierungszeiten getestet. Als Positivkontrolle



**Abb.3-2:**  
**Nachweis der SCR-RNA in der Wurzel.** In Querschnitten der Wurzel konnte die RNA von *SCR* in der Endodermis nachgewiesen werden (Pfeil).

für ein in der Wurzel exprimiertes Gen diene hier das ebenfalls aus der *GRAS*-Familie stammende *SCR* (Helariutta et al., 2000). Die Expression von *SCR* konnte wie beschrieben in der Endodermis nachgewiesen werden (Abb.3-2, Pfeil). Insofern wird hier davon ausgegangen, dass die Transkription von *LAS* in der Wurzel für die Methode der RNA *in situ*-Hybridisierung, deren Sensitivität geringer als die der RT-PCR ist, zu schwach ist.

### **3.1.5 Die *Ls* Transkriptionsdomäne in Tomate entspricht der *LAS*-Transkriptionsdomäne in *Arabidopsis***

Der Vergleich der Phänotypen der *lateral suppressor*-Mutanten in *Arabidopsis* und Tomate lässt eine vergleichbare Funktion des *LATERAL SUPPRESSOR* Gens in beiden Arten vermuten. Um die Frage zu klären, ob sich dies auch in vergleichbaren Transkriptionsmustern wiederfindet, wurde die *Ls*-Transkription in Tomate analysiert. Dazu wurden RNA *in situ*-Hybridisierungen mit vegetativen Sprossspitzen und Infloreszenzen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich auch in Tomate die Transkription in den Achseln der Blattprimordien von vegetativen Sprossspitzen findet (Abb.3-1 N). In Gegensatz zu *Arabidopsis* wird das SAM in Tomate nach dem Übergang zur generativen Phase durch die Anlage von 8 – 12 Blütenprimordien aufgebraucht. Die Infloreszenzentwicklung wird bei Tomate mit einer Teilung des infloralen Meristems in ein Blüten- und wiederum ein Infloreszenzmeristem beschrieben (Allen und Sussex, 1996). In infloralen Apices der Tomate wurde *Ls*-RNA in den Achseln von Blütenprimordien detektiert (Abb.3-1 O, Pfeil). In Tomate ist es in diesem Stadium schwieriger diese Primordien als Blütenprimordien zu identifizieren, da sobald diese morphologisch als solche zu identifizieren sind, die Phase der *Ls*-Transkription vorüber zu sein scheint. Aufgrund der im Vergleich zum vegetativen SAM veränderten Form des Apex wird hier aber davon ausgegangen, dass es sich im Fall des Apex in der Abb.3-1 O um einen infloralen Apex handelt und insofern die Transkription in diesem Fall vergleichbar mit der Transkription von *LAS* in den Achseln der Blütenprimordien in *Arabidopsis* ist. Weiterhin konnte *Ls*-RNA ähnlich wie in *Arabidopsis* in den Blüten in den Achseln der Sepalen nachgewiesen werden (Abb.3-1 P).

### **3.1.6 Zusammenfassung der Analyse der Transkriptverteilung von *LATERAL SUPPRESSOR* in *Arabidopsis* und Tomate**

Die Analyse des Expressionsmusters des *LATERAL SUPPRESSOR* Gens in *Arabidopsis* und seines Homolog in Tomate durch RNA *in situ*-Hybridisierung ergibt ein vergleichbares Muster der Transkription beider Gene. Während der gesamten Wachstumsphase findet sich die Expression entlang der adaxialen Grenze aller lateralen Organe des SAMs, d.h. sowohl der Blattprimordien in der vegetativen als auch der Blütenprimordien in der generativen Phase. Unmittelbar nach der Festlegung der Identität von Zellen als Primordienzellen findet sich *LAS*-Transkript unterhalb der Einkerbung zwischen Primordium und weiter zentral liegendem Gewebe (s. P1 in Abb.3-1 A) und markiert insofern den Bereich der hier als Achsel bezeichnet wird. Die Expression kann zeitlich über die Bildung von lateralen Meristemen hinausgehen, wie in vegetativen Langsberg *erecta*- und generativen Columbia-Pflanzen zu sehen (Abb.3-1 D, L). Sie wird aber in den Zellen des lateralen Meristems selber herunterreguliert und findet sich nur an dessen Peripherie. Zusätzlich zu der Expression in den Achseln von Organen des SAM findet sich auch in der Blüte Expression in den Achseln der Sepalen.

### **3.2 Integration der *LAS*-Funktion in die Entwicklung lateraler Meristeme**

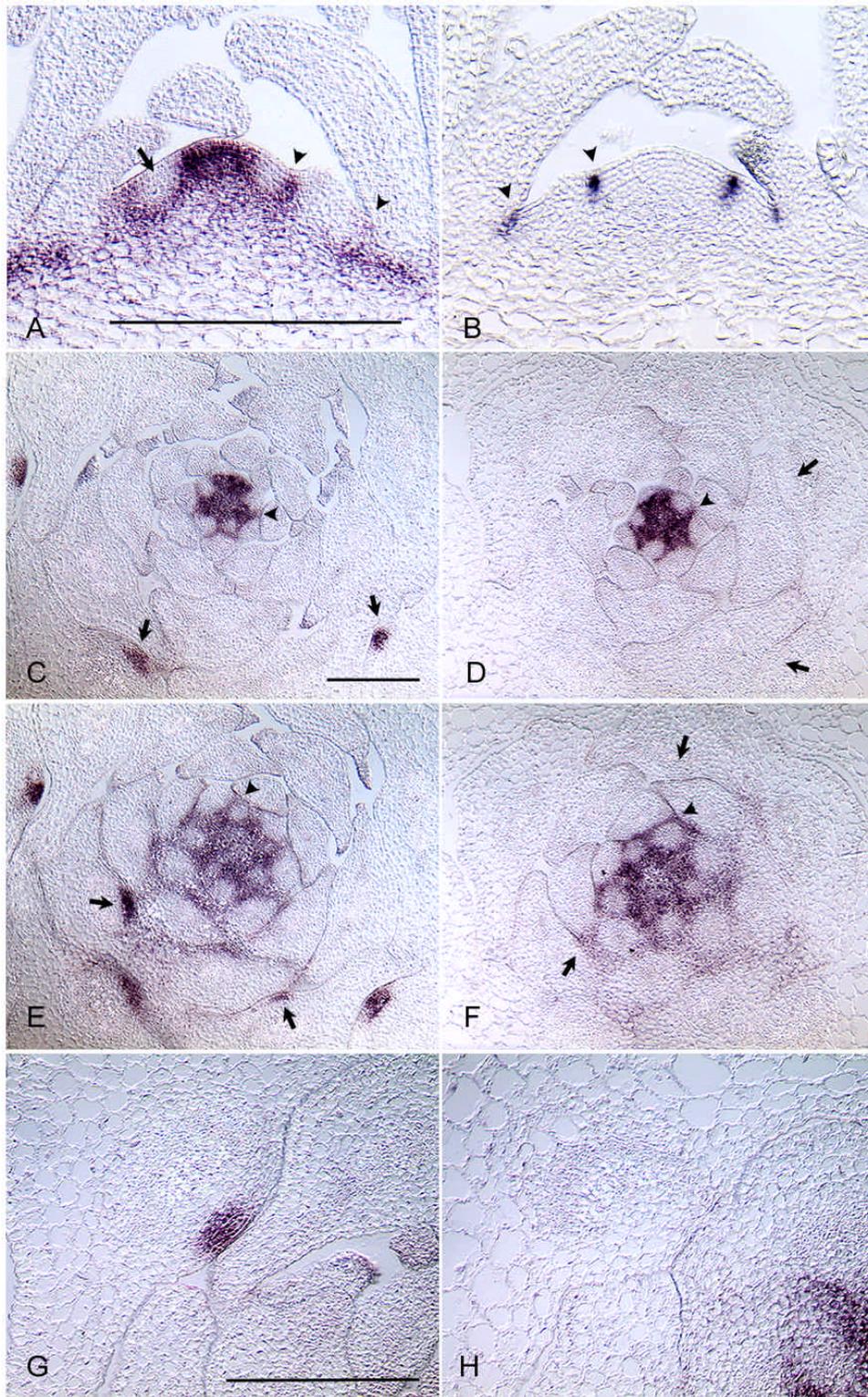
Die Voraussetzung zur Etablierung und Aufrechterhaltung eines organisierten Meristems ist das Zusammenspiel zahlreicher Gene innerhalb eines zeitlich und räumlich geordneten Rahmens. Einige der beteiligten Gene sind charakterisiert (Clark, 2001). Offensichtlich ist im speziellen Fall der lateralen Meristeme von *Arabidopsis* und Tomate darüber hinaus die Funktion von *LAS* eine Voraussetzung für deren Etablierung während der vegetativen Wachstumsphase. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde im folgenden Versuchsteil versucht, die *LAS*-Funktion zu einigen beschriebenen an der Organisation von Meristemen beteiligten Genen in Beziehung zu setzen. Hierzu wurde deren Expressionsmuster im Wildtyp mit dem in der *las*-Mutante verglichen. So konnte die Frage beantwortet werden, ob die Funktion von *LAS* eine Voraussetzung für die Transkription der betrachteten Gene ist oder diese etwa quantitativ reguliert. Umgekehrt wurde auch die Transkription von *LAS* in den entsprechenden Mutanten analysiert und so der Frage nachgegangen, ob die jeweiligen Gene an der Regulation der Transkription von *LAS* beteiligt sind.

### 3.2.1 **LAS ist erforderlich für die Etablierung der Transkription von *STM* in Blattachsen**

Die Funktion des Gens *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* ist eine Voraussetzung zur Etablierung und Aufrechterhaltung des meristematischen Zustandes von Zellen. Dies wird vor allem an dem Phänotyp der *stm*-Mutante deutlich, die während der Embryogenese kein Apikalmeristem etabliert und aus diesem Grund nicht fähig ist sich über das Keimlingsstadium hinaus zu entwickeln (Lenhard et al., 2002; Long et al., 1996). *STM* gehört zur Familie der Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren und ist spezifisch in allen Geweben des Sprosses mit meristematischem Charakter transkribiert. Aus diesem Grund dient *STM* als molekularer Marker für die meristematische Identität von Zellen im oberirdischen Teil der Pflanze (Long und Barton, 2000).

Die Funktion von *LAS* ist die Voraussetzung für die Entwicklung von lateralen Meristemen in Blattachsen während der vegetativen Wachstumsphase. Hier ist es prinzipiell möglich, dass die *LAS*-Funktion für die Etablierung der meristematischen Identität der Achselzellen oder deren weitere Entwicklung entscheidend ist. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten wurde durch den Vergleich der Transkription von *STM* in vegetativen Wildtyp- und in *las-4*-Pflanzen entschieden.

Im Wildtyp wurde die Transkription von *STM* im Bereich des SAMs nachgewiesen (Abb.3-3 A, C, E). Innerhalb des SAMs lassen sich Zellen ohne *STM*-Transkription identifizieren, die von den *STM* transkribierenden Zellen durch eine relativ scharfe Grenze getrennt sind und die bereits die Identität von Primordiumzellen besitzen (Abb.3-3 A, Pfeil). Auf diese Weise lassen sich Blattprimordien bereits identifizieren, bevor sie morphologisch als Vorwölbung an der Flanke des Meristems zu erkennen sind und werden insofern als P0 bzw. als P-1 bezeichnet (Long und Barton, 2000). Zwischen den Blattprimordien, in der interprimordiären Region, bleibt *STM* Transkription über einen längeren Zeitraum erhalten (Abb.3-3 A, C, E, Pfeilköpfe). Diese Befunde bestätigen die Beobachtungen von Long und Barton (2000). Die Transkriptionsdomäne schließt den Bereich, der hier als Blattachsel bezeichnet wird und durch die Transkription von *LAS* charakterisiert ist, ein (Abb.3-3 A, B, Pfeilköpfe). Analysiert man die Transkription von *STM* in diesem Bereich weiter, lässt sich in Columbia ab P16 eine Fokussierung der *STM*-Transkription im Zentrum der Blattachsen erkennen (Abb.3-3 C, E, Pfeile). Dies wird bei Long und Barton (2000) für Langsberg *erecta* für Primordien älter als P4 beschrieben. In der erwähnten Arbeit kann allerdings nicht entschieden werden, ob die Zellen, die diese fokussierte *STM*-Transkription zeigen, aus schon *STM* transkribierenden Zellen der interprimordiären Region



**Abb.3-3: Detektion des *STM*-Transkripts im Wildtyp (A, C, E, G) und *las-4* (D, F, H).** C, E und D, F stellen jeweils aufeinander folgende Querschnitte des selben Apexes dar. **A:** Längsschnitt durch einen vegetativen Apex. **B:** Vergleich mit dem Transkriptionsmuster von *LAS*. **C, E:** Da das Meristem im Zuge seiner Entwicklung immer weiter nach oben auswächst, ist in weiter oben liegenden Schnitten nur in den Achseln der älteren Blattprimordien diese Zellgruppe getroffen (C). **G:** Im Wildtyp ist die Gruppe der *STM*-transkribierenden Zellen ab P21 auch histologisch von den Zellen ihrer Umgebung zu unterscheiden. Die Zellen in diesem Bereich sind kleiner und cytoplasmareicher. **H:** Im Gegensatz zum Wildtyp finden sich in *las-4* keine kleinen, cytoplasmareichen, *STM*-transkribierenden Zellen im Bereich der Blattachsen. Hier sind die Zellen histologisch nicht von denen ihrer Umgebung zu unterscheiden. Größenstandards: 200  $\mu$ m, jeweils dieselbe Dimension in **A, B**; in **C, E, D, F** und in **G, H**. Weitere Beschreibung im Text.

oder aus Zellen ohne *STM*-Transkription des darunter liegenden Blattprimordiums hervorgehen. Die Fokussierung der *STM* Transkription lässt sich in Columbia mit P16 ca. vier bis fünf Blattprimordien früher feststellen als die histologische Identifizierung von einer cytoplasmatischen Zellgruppe möglich ist (P21, Kap.3.1.2.1). Gleiches gilt für Langsberg *erecta* wo im Unterschied zu Columbia diese Entwicklungen insgesamt früher stattfinden (P4 und P9-11, Long und Barton, 2000). Die Fokussierung der *STM* Transkription markiert eben jenen Bereich in dem in älteren Achseln eine Gruppe relativ kleiner, cytoplasmatischer Zellen zu identifizieren ist, die so ein auf histologischer Ebene erkennbares laterales Meristem darstellen (Abb.3-3 G).

Der Vergleich der Transkription von *STM* in *las-4* mit der im Wildtyp zeigt, dass sich die Transkription im Bereich des SAMs und im Bereich der interprimordiären Region nicht unterscheidet (Abb.3-3 D, F, Pfeilköpfe). Ein Unterschied wird in Blattachsen älter als P16 erkennbar, in denen im Wildtyp die Fokussierung der *STM* Transkription zu beobachten ist. Diese ist in *las-4* nicht zu erkennen (Abb.3-3 D, F, Pfeile). Bezüglich der *STM*-Transkription bleiben alle Zellen der Blattachsen in der Mutante uniform. Das Signal der interprimordiären *STM*-Transkription wird in älteren Blattachsen immer schwächer und ist schließlich nicht mehr zu erkennen. Über den Verlust der *STM*-Transkription hinaus, sind in *las-4* in älteren Achseln keine Zellen auszumachen, die sich in ihrer Größe und dem Grad ihrer Vakuolisierung von den umliegenden Zellen unterscheiden (Abb.3-3 H).

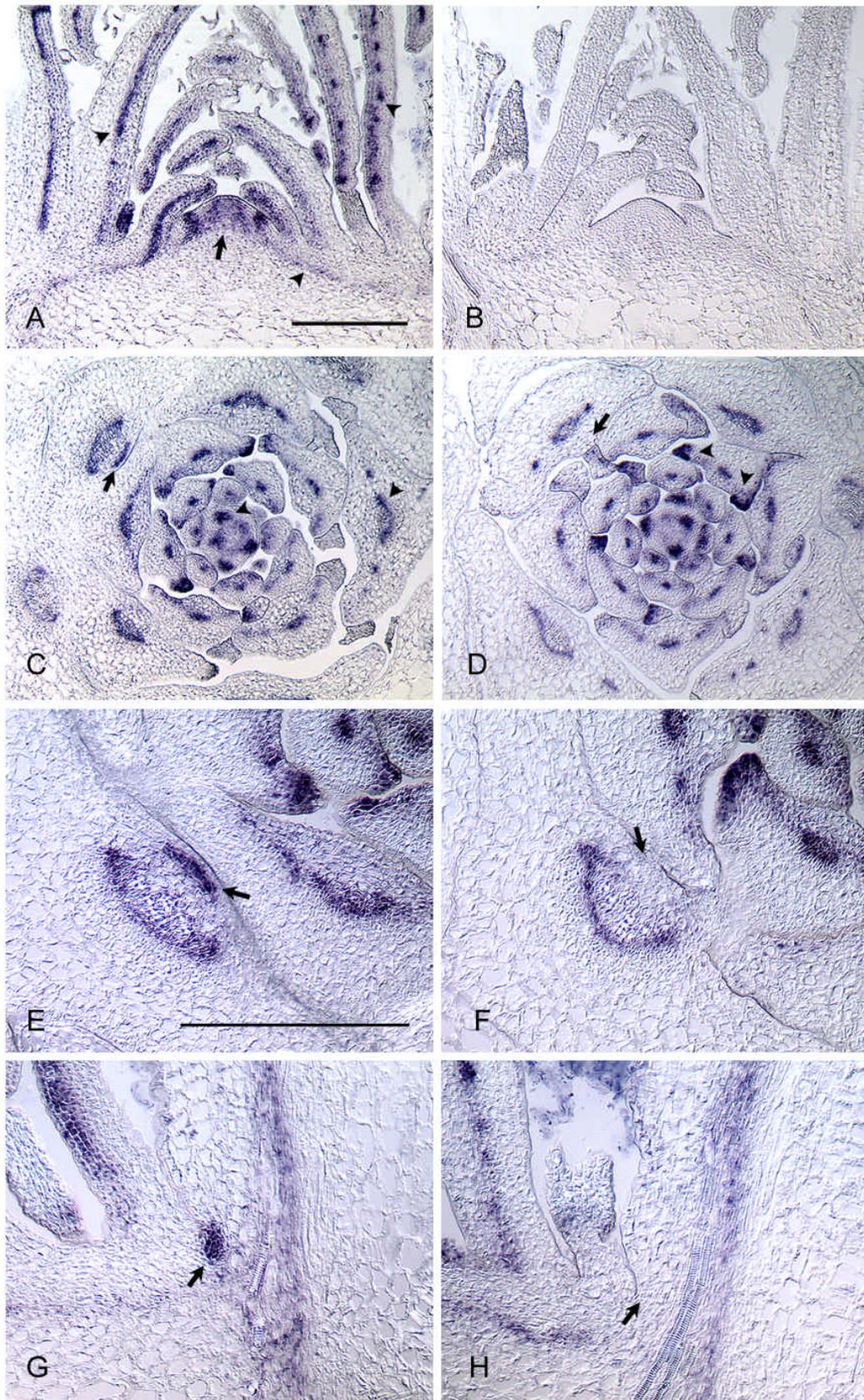
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bezüglich der Transkription von *STM* die *las*-Mutante eine Abweichung gegenüber dem Wildtyp aufweist. Diese Abweichung lässt sich ab dem Zeitpunkt beobachten zu dem in den Blattachsen des Wildtyps eine Fokussierung der Transkription von *STM* stattfindet. Diese ist in *las-4* nicht zu erkennen. Insofern lassen sich in der *las*-Mutante nicht nur keine auf histologischer Ebene identifizierbaren meristematischen Zellgruppen in den Blattachsen beobachten, sondern es findet schon die zeitlich frühere Etablierung einer fokussierten *STM*-Transkription in diesem Bereich nicht statt. Der Vergleich der Transkriptionsdomänen von *LAS* und *STM* zeigt, dass in der interprimordiären Region nahezu eine vollständige Überlappung besteht. Während der Etablierung eines organisierten Meristems, für die die *LAS*-Funktion eine Voraussetzung ist, wird die Transkription von *LAS* in diesem Bereich offenbar herunter reguliert. Die hier erbrachten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *LAS* während der vegetativen Phase an der Etablierung der meristematischen Identität der Zellen im zentralen Bereich der Blattachsen entscheidend beteiligt ist.

### 3.2.2 Die Transkription von *REVOLUTA* in Blattachsen ist abhängig von der Funktion von *LAS*

Neben der *las*-Mutante zeigt ebenso die *interfascicular fiberless1/revoluta*-Mutante eine Störung in der Anlage von Seitentrieben. Diese betrifft allerdings im Gegensatz zur *las*-Mutante nicht nur die vegetative, sondern auch die generative Wachstumsphase. Weiterhin sind die Blätter im Vergleich mit dem Wildtyp vergrößert, der primäre Stamm ist verkürzt und verdickt, die Phylotaxis ist gestört, Blüten sind oft missgebildet und Leitbündel haben Defekte (Talbert et al., 1995; Zhong und Ye, 1999). *IFL1/REV* gehört zur Familie der HD-ZIP-Transkriptionsfaktoren und wird außer in Leitbündeln und im SAM selber, in den Achseln von Blattprimordien transkribiert und markiert hier sich entwickelnde LMs (Otsuga et al., 2001; Zhong und Ye, 1999). Insofern besteht eine Überlappung der *REV*-Transkriptionsdomäne mit der von *STM* in Meristemen. Da *REV* ebenso wie *LAS* an der Entwicklung von Seitentrieben beteiligt ist und in den entsprechenden Geweben transkribiert wird, wurde im folgenden Versuchsteil der Frage nachgegangen, ob und mit welcher Hierarchie eine Abhängigkeitsbeziehung bezüglich ihrer Transkription zwischen beiden Genen besteht. Zunächst wurde dazu die *REV*-Transkription im Wildtyp und *las-4* miteinander verglichen.

In Längs- und Querschnitten des Wildtyps findet sich *REV*-mRNA in den Leitbündeln der Blätter und des Sprosses und in provaskulären Zellen der Blattprimordien (Abb.3-4 A, C, Pfeilköpfe). Zudem ist die Transkriptionsdomäne in der Form einer umgekehrten Schale innerhalb des SAMs zu finden (Abb.3-4 A, Pfeil). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Otsuga et al. (2001). Ab ca. P17 ist weiterhin die Transkription im zentralen Bereich der Blattachsel etwas oberhalb des Insertionspunktes in einem Bereich festzustellen, in dem auch die Fokussierung der *STM*-Transkription zu beobachten ist (Abb.3-4 C, E, G, Pfeile). In älteren Blattachsen lassen sich die *REV* transkribierenden Zellen ebenfalls bezüglich ihrer Größe und ihrem Grad der Vakuolisierung vom umgebenden Gewebe unterscheiden (Abb.3-4 G, Pfeil). Häufig und mit unterschiedlichsten Sonden trat ein Signal in den Stipeln und an der Blattperipherie auf (Abb.3-4 D, Pfeilköpfe; Abb.3-7 C, D), das wegen seiner fehlenden Spezifität allerdings als Hintergrundsignal angesehen wird.

Der Vergleich der *REV*-Transkription in *las-4* mit der im Wildtyp zeigt, dass sich die Transkriptionsdomänen in den Leitbündeln der Blätter, den provaskulären Zellen und dem SAM entsprechen (Abb.3-4 D). Demgegenüber ist die Transkription in den Blattachsen ab P17 in *las-4*



**Abb.3-4: Analyse der Transkription von *REV* im Wildtyp (A, C, E, G) und *las-4* (D, F, H).** **A:** Hybridisierungen eines Längsschnittes des Wildtyps mit der *REV* Gegensinn-Sonde. **B:** Die Hybridisierung mit der Sinn-Sonde zeigt die Spezifität der Signale in A. **C, E:** Querschnitte des Wildtyps. **G:** Längsschnitt des Wildtyps. **D, F, H:** entsprechende Schnitte der *las-4*-Mutante. Größenstandards: 200  $\mu\text{m}$ , die selben Dimensionen in **A-D** und in **E-H**. Weitere Beschreibung im Text.

nicht zu finden. Die Zellen in diesem Bereich unterscheiden sich bezüglich der *REV*-Transkription nicht von den umgebenden Zellen des zugehörigen Blattes (Abb.3-4 F, H, Pfeile).

Aus diesen Befunden wird deutlich, dass die *LAS*-Funktion ebenso wie für die Fokussierung von *STM*, eine Voraussetzung für die Transkription von *REVOLUTA* im zentralen Bereich der Blattachsen darstellt.

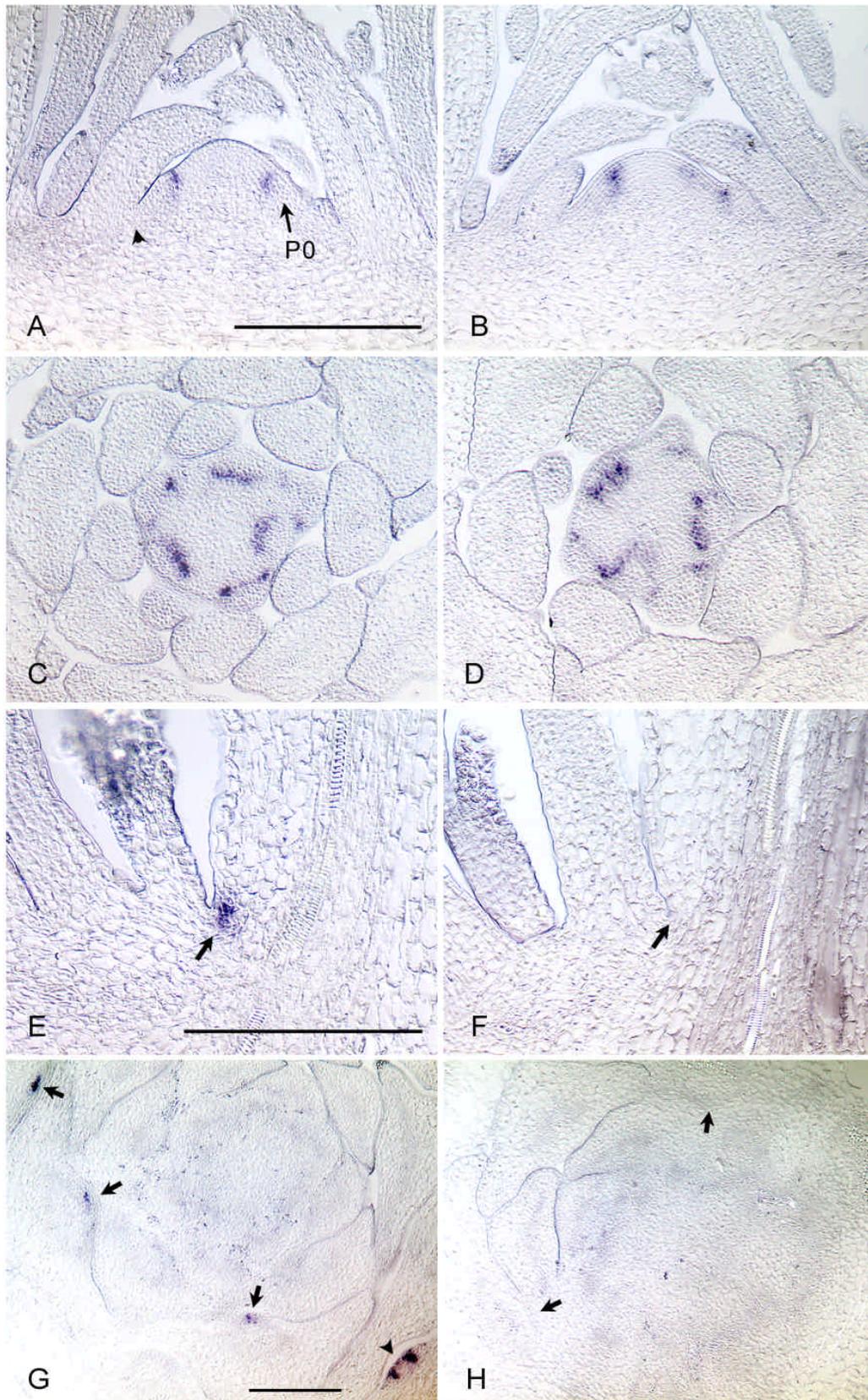
### 3.2.3 Die Domänen der Transkription von *CUC1* und *CUC2* entsprechen in weiten Bereichen der von *LAS*

*CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)* und *CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2)* stellen zwei sehr ähnliche und im hohen Maße funktionell redundante Gene dar, deren gemeinsame Aktivität die Voraussetzung für die Etablierung von Meristemen ist (Aida et al., 1997). Wo in der Einzelmutante nahezu kein Phänotyp zu beobachten ist, zeigt die Doppelmutante für beide Gene den namensgebenden Phänotyp der tassenförmigen Fusion beider Keimblätter (Aida et



**Abb.3-5: Der Phänotyp der *cuc1cuc2* Doppelmutante.** Zu sehen sind die Nachkommen einer Elternpflanze mit dem Genotyp *cuc1/cuc1 CUC2/cuc2*. Von 49 ausgelegten Pflanzen zeigten 11 den *cup-shaped cotyledon*-Phänotyp (Pfeil), 37 waren vom Wildtyp nicht zu unterscheiden (Mitte) und eine Pflanze zeigte einen schwächeren *cuc*-Phänotyp (rechts).

al., 1997; Abb.3-5). Ein SAM wird in der Doppelmutante nicht angelegt, ebenso ist *STM* im Embryo nicht exprimiert (Aida et al., 1999). Zudem wird die im Vergleich mit dem *LAS*-Transkriptionsmuster interessante Beobachtung beschrieben, dass beide Gene, die zur Familie der NAC-Domänen-Gene gehören, in den Achseln von Keimblättern transkribiert werden (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001). Da diese Befunde nahe legen, dass bezüglich der Etablierung von Meristemen *CUC1* und *CUC2* der Funktion von *STM* übergeordnet sind, wurde im folgenden Versuchsteil analysiert, ob dies ebenso für die Funktion von *LAS* gilt. Es wurden zunächst wiederum Längs- und Querschnitte des Wildtyps und der *las-4*-Mutante auf *CUC1* und *CUC2*-Transkription untersucht. Ein prinzipielles Problem bei der Analyse und der Interpretation der Ergebnisse stellt hier die hohe funktionelle Redundanz zwischen *CUC1* und *CUC2* dar. Die Doppelmutante kann nicht bezüglich Seitentriebentwicklung und *LAS*-Transkription untersucht werden, da hier die Entwicklung der Pflanze auf dem Stadium des Keimlings stehen bleibt.



**Abb.3-6: *CUC1*-Transkription im Wildtyp (A, C, E, G) und *las-4* (B, D, F, H).** A, C: *CUC1*-Transkription in Längsschnitten (A) und Querschnitten (C) durch das SAM des Wildtyps. E, G: Ab P22 findet sich in Längs- (E) und Querschnitten (G) des Wildtyps *CUC1*-Transkription in einer Zellgruppe in den Blattachsen. B, D, F, H: Entsprechende Schnitte der *las-4*-Mutante. Größenstandards: 200  $\mu$ m, die selben Dimensionen in A, B und die selben Dimensionen in C, D. Weitere Beschreibung im Text.

### 3.2.3.1 Analyse der *CUC1*-Transkriptverteilung im Wildtyp und *las-4*

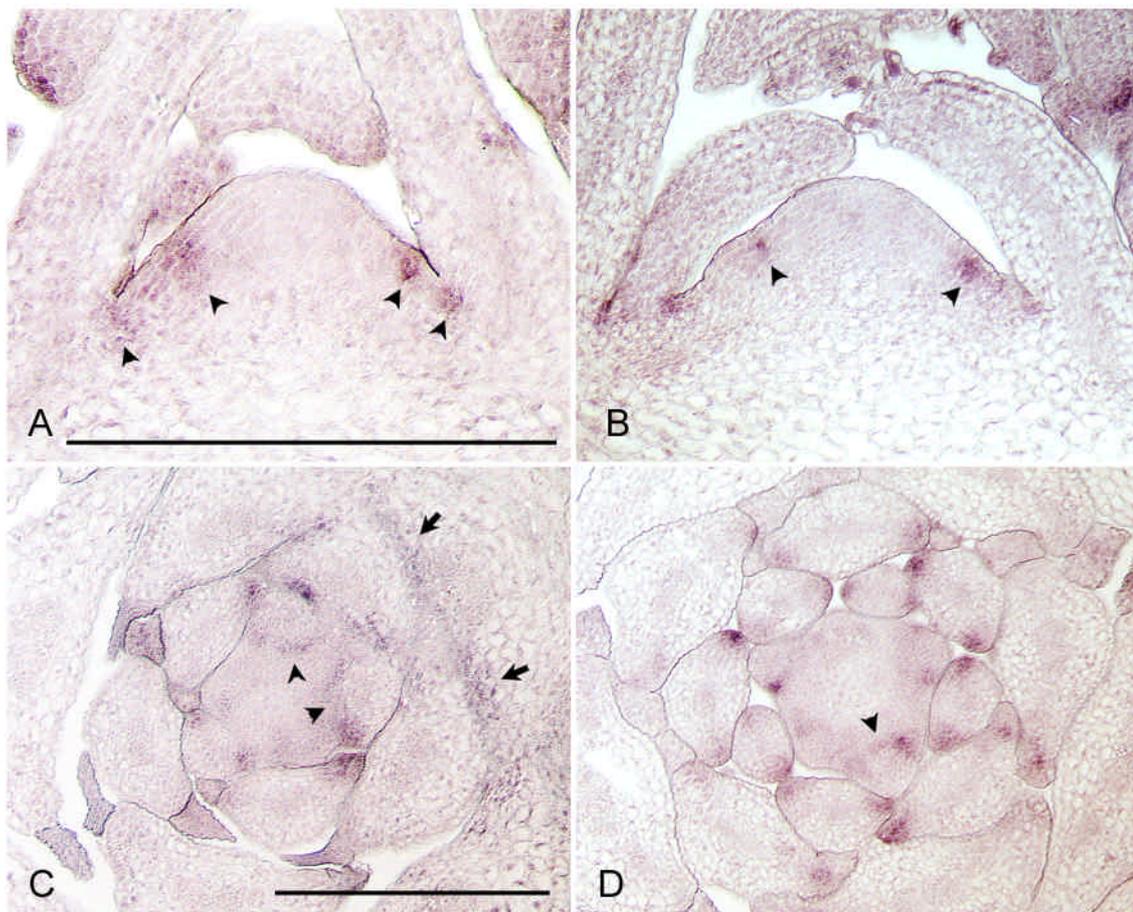
Wird die Transkript-Akkumulation von *CUC1* in 28 Tage alten vegetativen Wildtyp-Pflanzen analysiert, fällt zunächst die hohe Übereinstimmung der Transkriptionsdomäne mit der von *LAS* in den Achseln der Blattprimordien auf. Ebenso wie *LAS* wird *CUC1* entlang der adaxialen Grenze von Blattprimordien in deren Achselbereich transkribiert. Die Dimension der Domäne ist dabei der der *LAS*-Transkription vergleichbar (Abb.3-6 A, C). Im Gegensatz zur mRNA von *LAS* konnte die mRNA von *CUC1* allerdings schon in den Achseln von Primordien detektiert werden, die noch nicht als Vorwölbung an der Flanke des SAMs morphologisch zu identifizieren sind (P0, Abb.3-6 A). Demnach ist *CUC1* etwas früher in der Entwicklung von Blattachsen in diesem Bereich transkribiert. Einen weiteren Unterschied stellt die Beobachtung dar, dass die Transkription nur in den Achseln von Blattprimordien bis P6/7 gefunden wird. In Blattachsen zwischen P7/8 und P22 ist die Transkription nicht detektierbar (Abb.3-6 A, Pfeilkopf). *CUC1*-Transkription lässt sich allerdings ab P22 wieder in Blattachsen nachweisen und hier in einem Bereich, der vergleichbar ist mit der *REV*-Transkriptionsdomäne in den Achseln ab P17 (Abb.3-6 E, G, Pfeile). Auch in diesem Fall werden kleine, cytoplasmareiche Zellen durch die *CUC1*-Transkript-Akkumulation markiert (vgl. Abb.3-4 G, Pfeil). Im Gegensatz zur *REV*-mRNA wird die *CUC1*-mRNA allerdings in der weiteren Entwicklung des LMs nicht mehr in dessen Zentrum detektiert, sondern findet sich, vergleichbar mit der Situation im SAM, lediglich im Achselbereich von neu angelegten Blattprimordien des LMs (Abb.3-6 G, Pfeilkopf).

Die Situation der *CUC1*-Transkription in der *las-4*-Mutante stellt sich so dar, dass sich diese in den Achseln bis P22 nicht von der im Wildtyp unterscheidet (Abb.3-6 B, D). *CUC1* wird in *las-4* entlang der adaxialen Grenze von Blattprimordien von P0 bis P6/7 in deren Achseln transkribiert. Ein Unterschied zur Transkription im Wildtyp lässt sich in den Achseln von Primordien älter als P22 beobachten. Hier lässt sich das *CUC1*-Transkript in *las-4* nicht detektieren (Abb.3-6 F, G, Pfeile).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *CUC1* in den Blattsachsen von P0 bis P6/7 transkribiert wird und die Transkriptionsdomäne ab P1 bis P6/7 vollkommen mit der von *LAS* übereinstimmt. In diesem Bereich ist die Transkription nicht abhängig von der *LAS*-Funktion. Ab P22 ist *CUC1* im zentralen Achselbereich transkribiert und markiert hier in älteren Achseln eine Gruppe von kleinen, cytoplasmatischen Zellen. Ab P22 ist die Funktion von *LAS* eine Voraussetzung für die Transkription von *CUC1*.

### 3.2.3.2 Analyse der *CUC2*-Transkriptverteilung im Wildtyp und *las-4*

Aufgrund der Analyse der *CUC2*-Transkription lässt sich sagen, dass die Transkriptionsdomäne von *CUC2* der von *CUC1* sehr ähnlich ist. Auch im Falle von *CUC2* konnte das Transkript im Wildtyp in den Achseln von Blattprimordien ab P0 detektiert werden (Abb.3-7 A, C, Pfeilköpfe). Im Gegensatz zu *CUC1* wird allerdings die Transkription in Blattachsen älter als P6/7 nicht herunterreguliert, sondern ist auch in den Achseln bis zu P17 nachzuweisen (Abb.3-7 C, Pfeile). Zudem wurde kein Signal in dem Bereich beobachtet, in dem sich eine Gruppe meristematischer Zellen vom umgebenden Gewebe abgrenzt. Insofern ähnelt die Transkriptionsdomäne in diesem Bereich eher der von *LAS*. Die Analyse der *CUC2*-Transkription wurde durch den Umstand erschwert, dass das Transkriptionslevel in diesem Fall offensichtlich niedriger als das von *CUC1* ist. Aus diesem Grund sind die Signale nicht von der Deutlichkeit der *CUC1*-Signale. Da aber das *CUC2*-Homolog aus Petunie eine vergleichbares Expressionsmuster zeigt (Souer et al., 1996), wird hier davon ausgegangen, dass die hier dargestellten Ergebnisse die tatsächliche Situation in

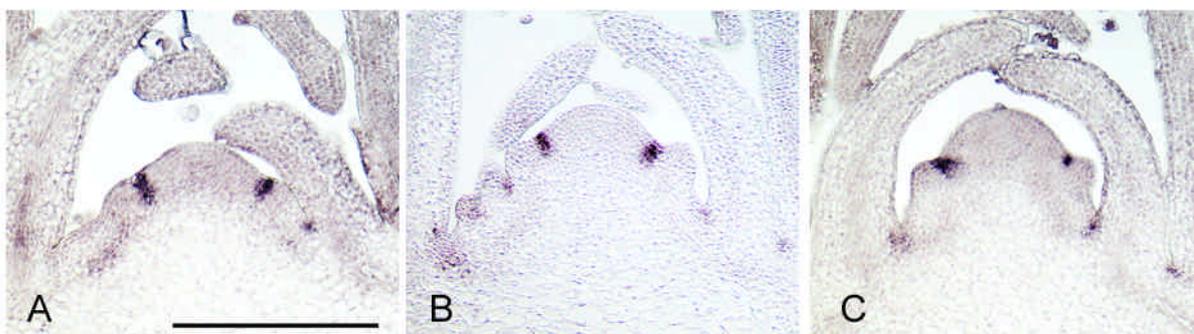


**Abb.3-7: Vergleich der *CUC2*-Transkription im Wildtyp (A, C) und *las-4* (B, D).** A, C: Wie in Längs- (A) und Querschnitten (C) des Wildtyps zu sehen ist, ist *CUC2* ebenso wie *CUC1* in den Achseln der Blattprimordien transkribiert (Pfeilköpfe). Im Gegensatz zu *CUC1* ist die *CUC2*-Transkription über P6/7 hinaus entlang der gesamten Achsel älterer Blattprimordien zu finden (C, Pfeile). B, D: Kein Unterschied zur Transkription im Wildtyp in der *CUC2*-Transkription ist in Längs- (B) und Querschnitten (D) von *las-4* zu beobachten (Pfeilköpfe).

der Pflanze wiedergeben.

In *las-4* konnte kein Unterschied in der Transkription von *CUC2* im Vergleich zum Wildtyp ausgemacht werden. Auch in *las-4* findet sich Transkription in den Achseln der Blattprimordien von P0 bis P17 (Abb.3-7 B, D, Pfeilköpfe).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *CUC1* und *CUC2* sehr ähnliche, aber nicht identische Transkriptionsdomänen aufweisen. Dass die Transkriptionsmuster beider Gene nicht identisch sind, belegen auch Ergebnisse von RT-PCRs (Takada et al., 2001). Im Vergleich mit *LAS* zeigt *CUC2* ein nahezu identisches Transkriptionsmuster in Blattachsen von vegetativen Pflanzen. Die Transkription scheint lediglich etwas früher in deren Entwicklung starten. Im Falle von *CUC2* ist die Funktion von *LAS* keine Voraussetzung für dessen Transkription.



**Abb.3-8: Analyse der *LAS*-Transkription in verschiedenen Mutanten.** Die Hybridisierung von Längsschnitten vegetativer Sprossspitzen von *rev-5* (A), *cuc1-1* (B) und *cuc2-1* (C) mit der *LAS* Gegensinn-Sonde zeigt, dass in keinem Fall eine Abweichung der *LAS*-Transkription von der im Wildtyp festgestellt werden kann. In allen Mutanten wird *LAS* entlang der Achseln von Blattprimordien transkribiert. Größenstandard: 200  $\mu$ m.

### 3.2.4 Die *LAS*-Transkription ist nicht abhängig von *REV*, *CUC1* oder *CUC2*

Abschließend wurde die Abhängigkeit der Transkription von *LAS* von den Funktionen von *REV*, *CUC1* und *CUC2* untersucht indem die entsprechenden Mutanten daraufhin analysiert wurden. Die Abhängigkeit der *LAS*-Transkription von der *STM*-Funktion lässt sich, ebenso wie die Abhängigkeit von beiden *CUC*-Genen gemeinsam, auf diese Weise nicht analysieren, da die entsprechende Null-Mutante im Keimlingsstadium das Wachstum wegen des fehlenden Meristems einstellt.

Abb.3-8 zeigt, dass sich sowohl in *rev-5* als auch in *cuc1-1* und *cuc2-1* die Transkription von *LAS* nicht von der im Wildtyp unterscheidet. In allen drei analysierten Mutanten findet sich die *LAS*-

Transkription entlang der gesamten adaxialen Grenze von Blattprimordien bis zu einem Entwicklungsstadium, das vergleichbar mit dem des Wildtyps ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass zumindest der Verlust eines der untersuchten Faktoren nicht ausreicht, die Transkription von *LAS* zu beeinflussen.

### **3.2.5 Zusammenfassung der Integration von *LAS* in die Entwicklung lateraler Meristeme**

Die Analyse der Transkription von *STM*, *REV* und *CUC1* in vegetativen Wildtyp- und *las-4*-Pflanzen ergibt in allen drei Fällen eine Abhängigkeit der Transkription von der *LAS*-Funktion. Alle drei Gene werden ab P16/17 für *STM* und *REV* und ab P22 für *CUC1* in Columbia in einer Zellgruppe im zentralen Bereich der Blattachsen transkribiert und markieren hier die Position eines lateralen Meristems, das ab ca. P21 histologisch als solches zu identifizieren ist. Die Transkription der drei Gene findet in diesem Bereich in *las-4* nicht statt. In jüngeren Blattachsen lässt sich bei *STM*, *CUC1* und *CUC2* eine vollkommene Überlappung der Transkriptionsdomänen mit der von *LAS* feststellen, die im Falle von *CUC1* und *CUC2* sogar nahezu identisch ist. Eine Abhängigkeit der Transkription von *STM*, *REV*, *CUC1* sowie von *CUC2* von der *LAS*-Funktion lässt sich in diesem Bereich allerdings nicht beobachten. Ebenso ist umgekehrt die Transkription von *LAS* nicht abhängig von lediglich *REV* oder *CUC1*. Gleiches gilt für *CUC2*, das eine nahezu identische Transkriptionsdomäne mit *LAS* auch in älteren Blattachsen aufweist. Die Abhängigkeit der *LAS*-Transkription von *STM* wurde hier aufgrund des Phänotyps der *stm*-Mutante nicht analysiert.

### **3.3 Untersuchungen zur Funktion des Las-Proteins durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System**

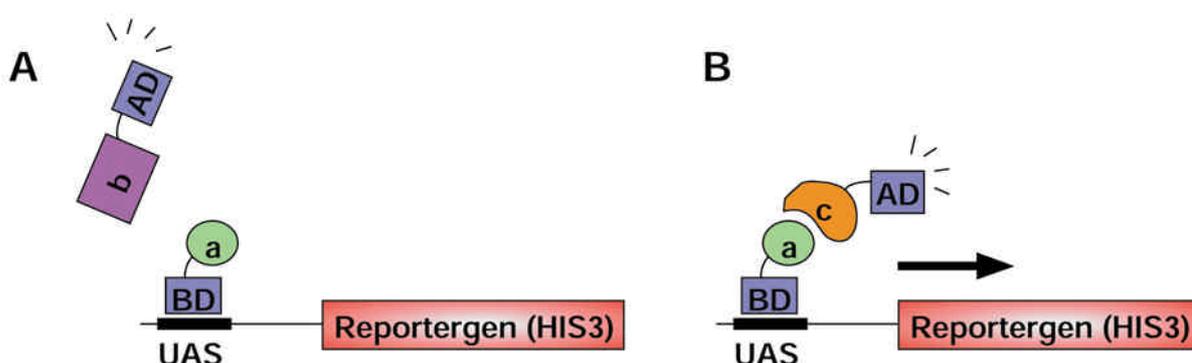
#### **3.3.1 Allgemeine Bemerkungen zum Hefe-Zwei-Hybrid-System**

Bei der Analyse des mutanten Phänotyps und des Expressionsmusters eines Gens, die dazu dient dessen biologische Rolle innerhalb eines Prozesses verstehen zu lernen, bleiben Fragen zur tatsächlichen molekularen Funktion des entsprechenden Proteins in der Zelle unbeantwortet. Im Gegensatz zu anderen Proteinen gibt im vorliegenden Fall die Proteinsequenz von *Las* keine eindeutigen Hinweise auf die Funktion des Proteins in der Zelle. Der Nachweis der Kernlokalisierung bei einigen Mitgliedern der *GRAS*-Familie und die schwache Homologie zur SH2-Domäne von Proteinen aus tierischen Organismen sind Grundlage für die Hypothese, dass es sich bei *GRAS*-Proteinen um Faktoren handelt, die als Reaktion auf ein extrazelluläres Signal aus dem Cytosol in den Zellkern transportiert werden und dort ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren erfüllen (Richards et al., 2000; Silverstone et al., 2001).

Der vorliegende Versuchsteil diente dazu, experimentelle Hinweise zur Proteinfunktion von *Las* zu ermitteln, indem mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Fields und Song, 1989) die Interaktion des *Las*-Proteins mit sich selber und mit anderen Proteinen analysiert wurde. Dabei wurden zum einen gezielt Interaktionen getestet, die sich unter anderem aus den Überlegungen von Richards et al. (2000) ergeben, zum anderen wurden Zwei-Hybrid-Banken aus *Arabidopsis* nach Interaktionspartnern von *Las* durchsucht.

Das Ziel des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist es, die tatsächlichen Interaktionspartner von Proteinen innerhalb ihrer angestammten Umgebung und Funktion zu finden und zu analysieren. Das System basiert auf der *in vivo*-Analyse der Interaktionen von Fusionsproteinen in Hefe. Genutzt werden hierbei die Eigenschaften des *Gal4*-Proteins als Transkriptionsfaktor der Hefe, der originär in der Hefe an den *GAL1*-Promotor bindet. Keegan et al. (1986) konnten zeigen, dass die DNA-bindende (BD) und die Transkriptions-aktivierende Domäne (AD) von *Gal4* jeweils unabhängig vom restlichen Protein fähig sind, ihre Funktion zu erfüllen. Diese Eigenschaft wird innerhalb des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ausgenutzt indem zwei zu untersuchende Proteine in der Hefe als Fusionsproteine exprimiert werden. Dabei ist der eine Partner an die DNA-bindende Domäne (AS 1-147) („Bait“) und der zweite Partner an die

Transkriptions-aktivierende Domäne (AS 768-881) („*Prey*“) fusioniert (Fields und Song, 1989). Beide *Gal4*-Domänen zugleich können nur dann ihre angestammten Funktionen ausführen, wenn *Bait*- und *Prey*-Protein miteinander interagieren und so die aktivierende Domäne von *Gal4* in die Nähe des Transkriptionsstartpunktes eines Reportergens gebracht wird, das im Promotor *Gal4*-Bindestellen besitzt (Abb.3-9). Als Reportergene dienen hier Prototrophie vermittelnde Gene für essentielle Aminosäuren (HIS3, ADE2). Auf Minimalmedium ohne die entsprechenden Aminosäuren wachsen insofern lediglich Hefen, die miteinander interagierende *Bait*- und *Prey*-Proteine exprimieren. Wachstum gilt hier als Nachweis der Interaktion.



**Abb.3-9: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.** **A:** Die Expression von zwei nicht miteinander interagierenden Fusionsproteinen (a+b) führt zu keiner Aktivierung des Reporters. **B:** Interagieren zwei in der Hefe exprimierte Fusionsproteine (a+c), aktiviert die aktivierende Domäne von Gal4 die Transkription des Reportergens. UAS (*upstream activating sequence*): Gal4 Bindestelle des GAL1-Promotors.

Aufgrund dieses Mechanismus zeigt das Hefe-Zwei-Hybrid-System bezüglich der Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen seine Limitierungen. Eine grundsätzliche Voraussetzung für die Anwendung ist die Exprimierbarkeit von heterologen Proteinen in der Hefe. Diese muss zunächst durch immunologischen Nachweis bestätigt werden (Kapp.3.3.3). Weiterhin ist die Analyse eines Proteins mit DNA-bindenden oder Transkriptions-aktivierenden Eigenschaften problematisch, da diese zur unspezifischen Aktivierung des Reporters führen. Beide Fälle von Autoaktivierung müssen stets parallel durch Expression des Fusionsproteins zusammen mit der *Gal4*-Domäne des anderen Partners getestet werden (Bartel et al., 1993). Zeigt das zu untersuchende Protein, wie im vorliegenden Fall, Autoaktivierung, können entweder die Stringenz des Mediums erhöht oder die kritischen Aminosäuren identifiziert und entfernt werden (Kap.3.3.4). Einen weiteren problematischen Gesichtspunkt stellt die Heterologie des Systems dar. Wohingegen zum Beispiel im vorliegenden Fall *Las* seine eigentliche Funktion in einer ganz bestimmten Zellgruppe (Kap.3.1) in der Pflanze erfüllt, werden hier Interaktionen in Hefezellen untersucht. Die Frage, die sich hier und generell stellt ist, ob die Bedingungen in der Hefe

geeignet sind, tatsächliche funktionell bedeutsame Proteininteraktionen nachzuweisen. So ist denkbar, dass für die Interaktion entscheidende Modifikationen des Proteins in der Hefe nicht durchgeführt werden, oder die Konformation des Proteins in dem heterologen Organismus Hefe nicht der in seiner ursprünglichen Umgebung entspricht.

<b>Insert</b>	<b>Vektor</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>verwendete Primer</b>
Las (AS 2-445)	pGBKT7	pTG2.1	Bait01fo / Bait05re
Las (AS 2-441)	pGBKT7	pTG2.2	Bait01fo / Bait24re
Las (S442A)	pGBKT7	pTG2.4	Bait01fo / Bait25re
Las (S440A)	pGBKT7	pTG2.6	Bait01fo / Bait26re
Las (AS 2-445)	pGADT7	pTG4.1	Bait01fo / Bait05re
Gai	pGBKT7	pTG40.1	gai1Ef / gai2Br
Gai (-SAW)	pGBKT7	pTG40.2	gai1Ef / gai6Br
Rga	pGBKT7	pTG41.1	rga1Nf / rga2Br
Rga (-SAW)	pGBKT7	pTG41.2	rga1Nf / rga6Br
Scr	pGBKT7	pTG42.1	scr1fE / scr2rX
Scr (-SAW)	pGBKT7	pTG42.2	scr1fE / scr6Xr
Las (AS 2-298)	pGBKT7	pTG2.7	Bait01fo / Bait10re
Las (AS 299-445)	pGBKT7	pTG2.5	Bait09fo / Bait05re
Las (AS 299-445)	pGADT7	pTG4.5	Bait09fo / Bait05re
Las (AS 299-387)	pGBKT7	pTG2.23	Bait09fo / Bait23re
Las (AS 299-366)	pGADT7	pTG4.22	Bait09fo / Bait27re
Las (AS 359-445)	pGADT7	pTG4.29	Bait28fo / Bait05re
Las (AS 2-445, Y420F)	pGADT7	pTG4.2	Yls1 / pasrev
Las (AS 2-441, Y420F)	pGBKT7	pTG2.8	Yls1 / pasrev
Las (AS 2-445, Y420E)	pGADT7	pTG4.25	Y420E / pasrev
Las (AS 2-441, Y420E)	pGBKT7	pTG2.25	Y420E / pasrev
Las (AS 2-445, R326E)	pGADT7	pTG4.28	Bait01fo / R326Er
Las (AS 2-441, R326E)	pGBKT7	pTG2.28	R326Ef / Bait05re
Etr1 (AS 137-738)	pGBKT7	pETR1	ETR1.1188F / ETR1.3450R
Etr2 (AS 172-772)	pGBKT7	pETR2	ETR2.4036F / ETR2.5937R
Ers1 (AS 137-613)	pGBKT7	pTG37	ers1.5fN / ers1.2rS
Ers2 (AS 169-645)	pGBKT7	pTG38	ers2.5Ef / ers2.2Sr
Ein4 (AS 160-766)	pGBKT7	pTG39	ein4.1fN / ein4.2rB
Bri1 (AS 905-1197)	pGBKT7	pTG25	Bri1fo / Bri1re
Ahk3 (AS430-740)	pGBKT7	pTG59	AHK3.1rP / AHK3.2fN
Gai	pGADT7	pTG27	Fragment aus pTG40.1
Rga	pGADT7	pTG28	Fragment aus pTG41.1
Scr	pGADT7	pTG29	Fragment aus pTG42.1
Etr1 (AS 137-294)	pGBKT7	pTG22	ETR1.1188F / ETR863re
Etr1 (AS 295-610)	pGBKT7	pTG23	ETR883fo / ETR1805re
Etr1 (AS 604-738)	pGBKT7	pTG24	ETR1814fo / ETR1.3450R
Las	pET28a	pTG13	Fragment aus pTG4.1
Las	pET42a	pTG15	Fragment aus pTG4.1
Las (AS 299-445)	pET42a	pTG58	Fragment aus pTG4.5
Las	pET21a	pTG65	Fragment aus pTG2.1
Etr1 (AS 137-738)	pET21a	pTG67	Fragment aus pETR1

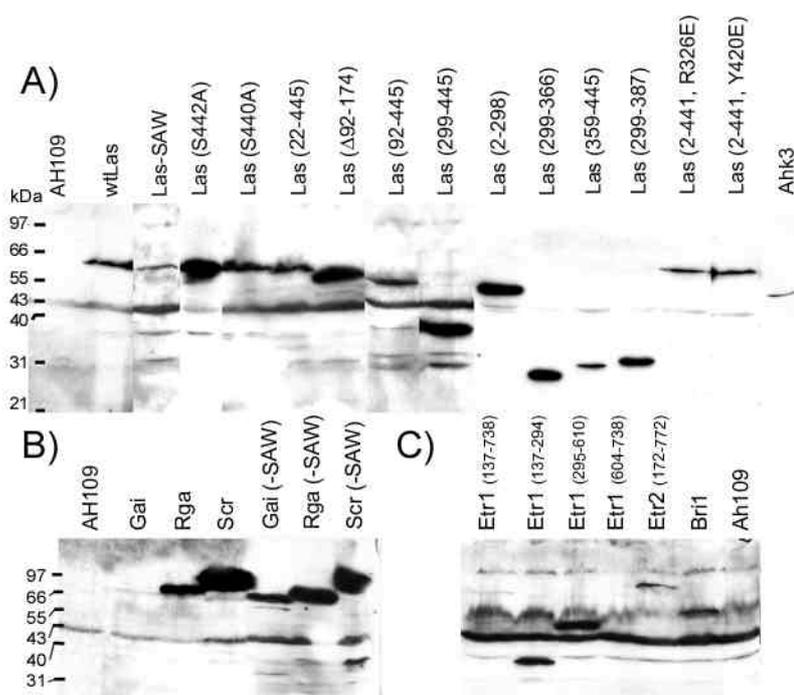
**Tab.3-1: Innerhalb der Versuche mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System hergestellte Konstrukte.**

Neben diesen Limitierungen, die von Protein zu Protein sehr unterschiedlich stark ins Gewicht fallen, bietet das Hefe-Zwei-Hybrid-System den Vorteil der guten Handhabbarkeit, der Möglichkeit *in vivo* zahlreiche Proteinwechselwirkungen parallel zu testen und zudem Zwei-

Hybrid-Banken nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern zu durchsuchen (Legrain et al., 2001). Zudem lassen sich, vorausgesetzt die Konformation des Proteins wird dadurch nicht entscheidend beeinträchtigt, Interaktionsdomänen durch Deletionskonstrukte und den gezielten Austausch von Aminosäuren relativ einfach lokalisieren (Fields und Sternglanz, 1994).

### 3.3.2 Herstellung von Konstrukten zur Proteinexpression in Hefe

Zur Expression von Fusionsproteinen in Hefe und *E.coli* wurden verschiedene Konstrukte hergestellt. Die jeweilige Sequenz wurde dazu zunächst mit Oligonukleotiden, an deren 5'-Ende eine geeignete Schnittstelle vorhanden war, mittels PCR amplifiziert. Als Vorlage diente cDNA aus *Arabidopsis*-Blättern oder eine cDNA-Bank aus Zellsuspension (Salchert, 1997). Nach erfolgter Klonierung des offenen Leserasters von *LAS* in pGBKT7 (pTG2.1) diente dieses Konstrukt als Vorlage zur PCR für weitere Konstrukte. Die PCR-Produkte wurden in die entsprechenden Schnittstellen von pGBKT7, als *Bait*-Vektor, oder pGADT7 als *Prey*-Vektor kloniert. Zur Kontrolle wurden die inserierten Fragmente jeweils sequenziert. Zum Austausch einer Aminosäure wurde eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die einen Basenaustausch aufwiesen. Bei pTG2.8, pTG4.2, pTG2.25 und pTG4.25 wurde das PCR-Fragment anschließend in die interne *Eco*NI- und die *S*alI-Schnittstelle des Vektors kloniert. Die Klonierungen von *ETR1* (pETR1) und *ETR2* (pETR2) wurden von Elisabeth Schäfer durchgeführt. Die Bezeichnung der so hergestellten Konstrukte ist Tab.3-1 verzeichnet.



**Abb.3-10: Immunologischer Nachweis der innerhalb des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems analysierten Proteine.** Beschreibung im Text. Bei ca. 43 kDa ist in allen Spuren eine prominente Hintergrundbande zu erkennen.

### 3.3.3 Nachweis der Expression von *LAS* und weiteren Proteinen

Die Expression von Proteinen wurde wie beschrieben nachgewiesen (Kap.2.2.15.2). Proteinfractionen der transformierten Hefestämme wurden dabei im Vergleich zu Proteinfractionen aus untransformiertem AH109 analysiert. In allen analysierten Fällen konnte die Expression der jeweiligen Proteine auf diese Weise gezeigt werden (Abb.3-10). Eine Ausnahme bildet *Gal4BD::Etr1* (AS604-738). Hier läuft die bei 43 kDa erwartete Bande auf der gleichen Höhe wie eine dort auftretende Hintergrundbande und ist deswegen nicht nachzuweisen. Darüber hinaus wurde die Expression von *Ers1*, *Ers2* und *Ein4* nicht analysiert. Die Expression von *Gai* und *Etr1* (AS 137-738) konnte nur schwach nachgewiesen werden (Abb.3-10).

### 3.3.4 GRAS-Proteine aktivieren die Transkription in Hefe

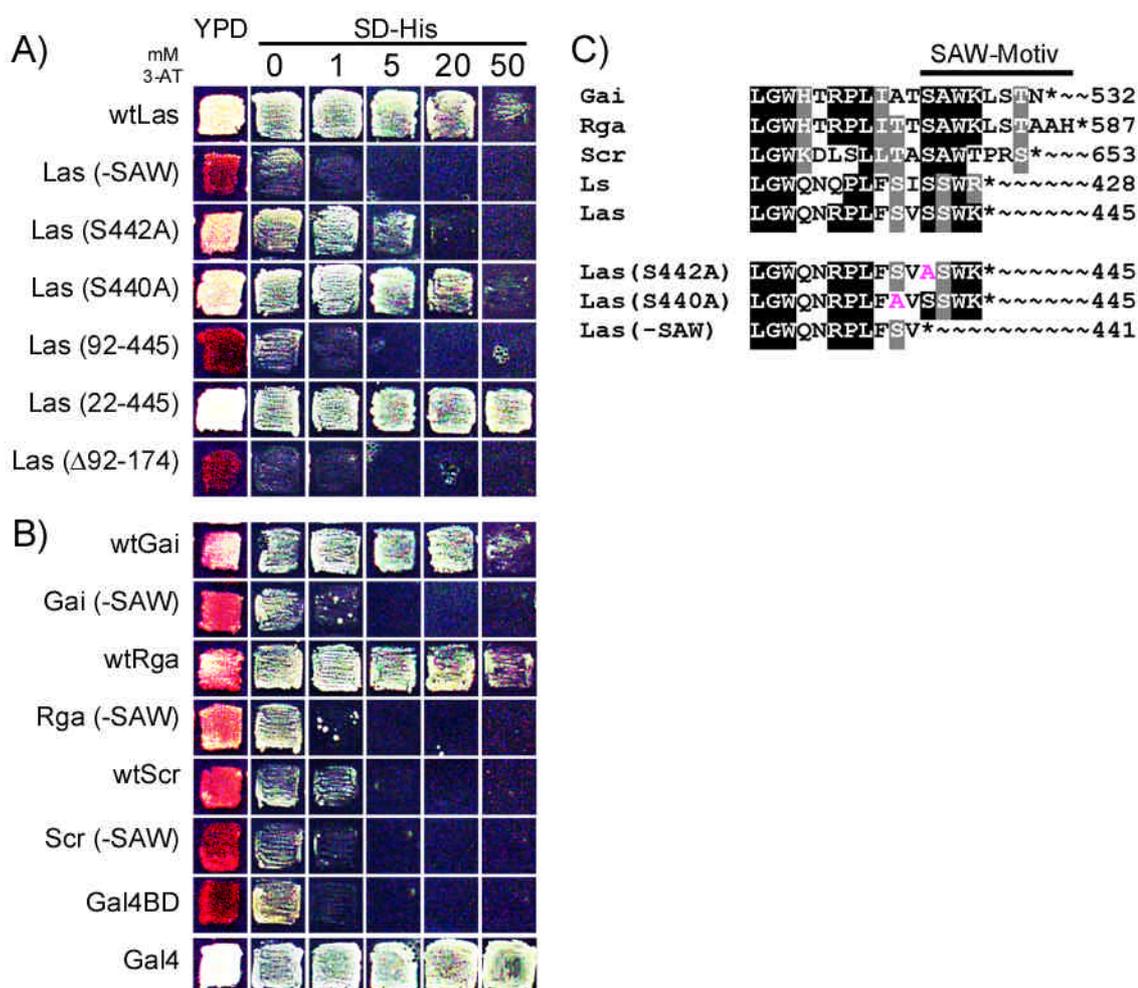
Zur Etablierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde zunächst die Selbstaktivierung des *Las*-Proteins untersucht. Dazu wurde AH109 mit den in Tab.3-2 verzeichneten Plasmid-Kombinationen transformiert. Die resultierenden Stämme wurden anschließend auf SD-His und SD-LWH jeweils mit 5 mM 3-AT ausgestrichen.

	<b>BD-Plasmid</b>	<b>AD-Plasmid</b>	<b>SD-Trp</b>	<b>SD-Leu</b>	<b>SD-H(5)</b>	<b>SD-LW</b>	<b>SD-LWH(5)</b>
<b>A</b>	pTG2.1		+	-	+	-	-
<b>B</b>		pTG4.1	-	+	-	-	-
<b>C</b>	pGBKT7		+	-	-	-	-
<b>D</b>		pGADT7	-	+	-	-	-
<b>E</b>	pTG2.1	pGADT7	+	+	+	+	+
<b>F</b>	pGBKT7	pTG4.1	+	+	-	+	-
<b>G</b>	pGBKT7-53	pGADT7-T	+	+	+	+	+
<b>H</b>	pGBKT7-Lam	pTG4.1	+	+	-	+	-

**Tab.3-2: Untersuchungen zur Etablierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.** *Las* fusioniert an die DNA-bindende (pTG2.1) und fusioniert an die aktivierende Domäne (pTG4.1) wurde alleine (A+B) und in Kombinationen mit jeweils den entsprechenden *Gal4*-Domänen (E+F) parallel zu Kontrollen getestet.

Das Wachstum von Stämmen, die *Las* fusioniert an die DNA-bindende Domäne von *Gal4* exprimieren (Tab.3-2 A+E), auf Medium ohne Histidin, zeigt, dass *Las* in der Hefe die Transkription des Reporters ohne die Interaktion mit einem *Prey*-Protein aktiviert. Demgegenüber zeigt *Las* keine unspezifische DNA-bindende oder Protein-bindende Aktivität (Tab.3-2 B, F, H).

Um *Las* trotz seiner autoaktivierenden Eigenschaft mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems untersuchen zu können, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde durch die Erhöhung der 3-AT-Konzentration im Medium versucht, die Autoaktivierung zu unterdrücken. Dazu wurde AH109 durch pTG2.1 und parallel durch die Negativkontrolle pGBKT7, die lediglich für die DNA-bindende Domäne von *Gal4* codiert, und die Positivkontrolle pCL1, die für das gesamte *Gal4* codiert, transformiert und die resultierenden Stämme auf Histidin-freiem Medium mit verschiedenen 3-AT-Konzentrationen ausgestrichen. Es zeigte sich, dass die Autoaktivierung ab 50 mM 3-AT im Gegensatz zur Positivkontrolle (Abb.3-11 B, letzte Zeile) nahezu vollständig unterdrückt werden kann (Abb.3-11 A, erste Zeile).



**Abb3-11: Analyse der Autoaktivierung von GRAS-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System.** **A:** Analyse der Autoaktivierung von *Las*. **B:** Analyse der Autoaktivierung weiterer *GRAS*-Proteine. Negativkontrolle: s. B, vorletzte Zeile; Positivkontrolle: B, letzte Zeile (s. Text). Die unterschiedliche Rotfärbung der Stämme auf Vollmedium (YPD) rührt von dem weiteren Markergen *ADE2* her. Wird dessen Transkription nicht aktiviert, reichert sich in den Stämmen eine rötliche Vorstufe des Adenins an (s. B, vorletzte Zeile). Wird dessen Transkription aktiviert, wird die Vorstufe weiter zu Adenin verarbeitet und die Stämme bleiben weiß (s. B, letzte Zeile). **C:** Vergleich des C-Terminus der analysierten *GRAS*-Proteine. Das C-terminale SAW-Motiv ist das namensgebende Motiv für die SAW-Domäne (Pysh et al., 1999).

Zum anderen wurde versucht durch Modifikationen des Proteins die kritischen Aminosäuren zu identifizieren und zu eliminieren. Richards et al. (2000) beschreiben die Sequenzähnlichkeiten der GRAS-Proteine zu Proteinen der STAT-Familie aus tierischen Organismen. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen ihre aktivierende Domäne am C-Terminus (Wen et al., 1995). Aus diesem Grund wurde zunächst *Las* ohne die letzten vier C-terminalen Aminosäuren, die hier das konservierte SAW-Motiv bilden, in pGBKT7 kloniert (Kap.3.3.2: pTG2.2). Das SAW-Motiv enthält bei *Las* anstelle des charakteristischen Alanins ein Serin (Abb.3-11 C). Es zeigte sich, dass die autoaktivierende Eigenschaft von *Las* durch die Deletion des SAW-Motivs eliminiert werden kann (Abb.3-11 A, zweite Zeile). Das Wachstum des transformierten Stammes auf Histidin-freiem Medium entspricht dem der Negativkontrolle (Abb.3-11 B, vorletzte Zeile). Spezifischer zeigt der Austausch eines Serins gegen ein Alanin einmal innerhalb (S442A) und einmal außerhalb des SAW-Motivs (S440A), dass dieses Motiv bezüglich der Autoaktivierung einen entscheidenden Teil des Proteins darstellt. Der Austausch innerhalb des SAW-Motivs führt zu einer Schwächung der Autoaktivierung, der Austausch unmittelbar vor diesem Motiv zeigt keinen Effekt (Abb.3-11A, C). Die Autoaktivierung geht allerdings ebenso verloren, wenn mindestens 91 Aminosäuren des N-Terminus oder die Aminosäuren 92-174 entfernt werden (Abb.3-11A, Zeile 5, 7). Werden hingegen nur 22 Aminosäuren des N-Terminus entfernt, verstärkt sich die Autoaktivierung (Abb.3-11A, Zeile 6).

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die Autoaktivierung eine generelle Eigenschaft der GRAS-Proteine darstellt und ob die SAW-Domäne auch in diesen Fällen entscheidend ist. Dazu wurden *GAI*, *RGA* und *SCR* (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Di Laurenzio, 1996) jeweils mit und ohne das SAW-Motiv in pGBKT7 kloniert (Kap.3.3.2) und die so entstandenen Konstrukte wie oben beschrieben getestet. Abb.3-11B zeigt, dass die vollständigen Proteine *Gai* und *Rga* ebenso wie *Las* Autoaktivierung zeigen und dass, vergleichbar mit *Las*, auch hier die Autoaktivierung mit 50 mM 3-AT weitgehend reduziert werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt das vollständige *Scr* nur eine schwache Autoaktivierung. Allen drei in diesem Versuchsteil getesteten GRAS-Proteinen ist gemeinsam, dass jegliche Autoaktivierung durch die Eliminierung des SAW-Motivs verloren geht (Abb.3-11B, C). Diese Ergebnisse zeigen, dass alle hier getesteten GRAS-Proteine in der Lage sind die Transkription in Hefe zu aktivieren und dass das SAW-Motiv in allen Fällen ein notwendiger Bestandteil für diese Aktivität ist.

Der immunologische Nachweis aller hier getesteten Proteine (Kap.3.3.3) zeigt, dass die hier dargestellten Ergebnisse ihren Ursprung nicht in der fehlenden Expression einzelner Proteine

haben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für Untersuchungen im Hefe-Zwei-Hybrid-System bei Fusionen mit der DNA-bindende Domäne, *Las* nur ohne das SAW-Motiv oder mit anderen Deletionen verwendet. Bei Analysen zur Interaktion mit anderen Proteinen wurde das vollständige *Las* nur eingesetzt, wenn es an die aktivierende Domäne von *Gal4* fusioniert war (Kap.3.3.6). Zudem wurden Hefe-Zwei-Hybrid-Banken mit hoher Stringenz unter Verwendung von 50 mM 3-AT durchsucht.

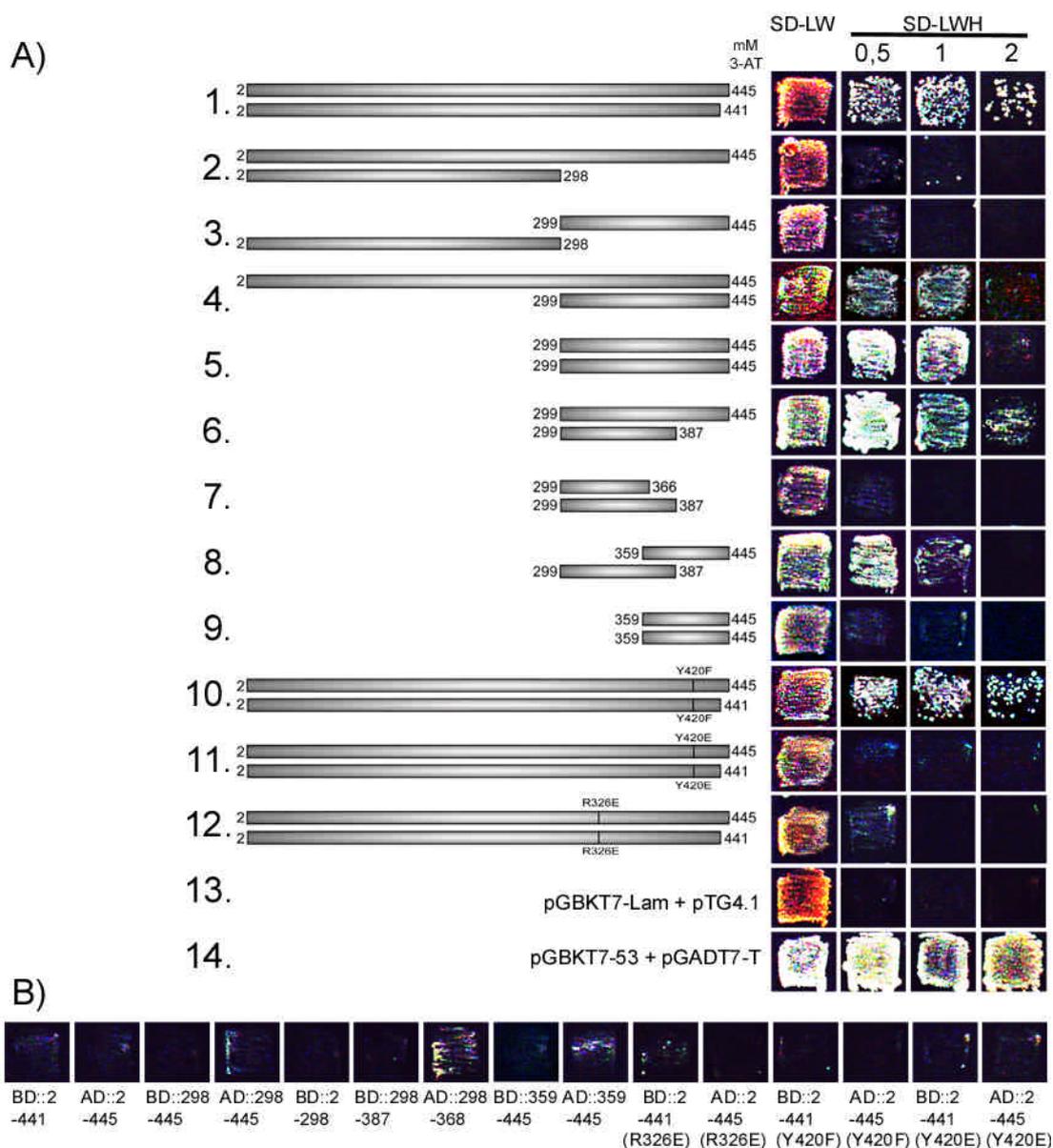
### **3.3.5 GRAS-Proteine zeigen Homo- und Heterodimerisierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System**

#### **3.3.5.1 Untersuchungen zur Homodimerisierung von *Las***

Im folgenden Versuchsteil wurde die Eigenschaft von *Las* zur Homo- und Heterodimerisierung getestet. Richards et al. (2000) implizieren mit ihrem Vergleich der *GRAS*-Proteine mit tierischen *STATs* diese Eigenschaft. Zudem beschreiben Itoh et al. (2002) die Fähigkeit eines weiteren Mitglieds der *GRAS*-Familie zur Homodimerisierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Zunächst wurde dazu AH109 mit pTG2.2 und pTG4.1 (Kap.3.3.2) transformiert und der resultierende Stamm auf Histidin-freiem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen 3-AT ausgestrichen. Abb.3-12 zeigt, dass im Gegensatz zur Negativkontrolle (Abb.3-12 A, vorletzte Zeile) der mit pTG2.2 und pTG4.1 transformierte Stamm die Fähigkeit hat, auf Histidin-freiem Medium mit bis zu 2 mM 3-AT zu wachsen (Abb.3-12 A, erste Zeile). Bei höheren 3-AT-Konzentrationen wurde dieses Wachstum nicht beobachtet. Dieses Ergebnis deutet auf eine schwache Homodimerisierung von *Las* im Hefe-Zwei-Hybrid-System hin.

Um die Domänen, die an der Homodimerisierung beteiligt sind, zu bestimmen, wurden weitere Deletionskonstrukte hergestellt (Kap.3.3.2 und Abb.3-12) und die Hefe ebenfalls durch verschiedene Kombinationen dieser Konstrukte transformiert. Dabei zeigte sich zunächst, dass der Bereich der 147 C-terminalen Aminosäuren für die Homodimerisierung verantwortlich ist, da alle getesteten Stämme, bei denen mindestens einem Partner dieser Teil fehlt, kein Wachstum zeigen (Abb.3-12 A, 2. und 3. Zeile). Demgegenüber wachsen Stämme, bei denen beide Partner diesen Teil enthalten (Abb.3-12 A, 4. und 5. Zeile). Dabei zeigt der Stamm, der das gesamte *Las*-Protein in Kombination mit den 147 C-terminalen Aminosäuren exprimiert, ein etwas schwächeres Wachstum als der Stamm, bei dem beide Partner lediglich aus den C-terminalen 147 AS bestehen. Der Test von Proteinen mit weiteren Deletionen legt nahe, dass der Bereich AS 298-387 mit dem Bereich AS 359-445 interagiert, da lediglich Stämmen mit dieser Kombination

im Vergleich zur Negativkontrolle Wachstum zeigen (Abb.3-12 A, Zeile 6 und 8). Alle Stämme, die noch stärker verkürzte Proteine exprimierten, zeigten kein eindeutiges Ergebnis.



**Abb.3-12: Untersuchung der Homodimerisierung von *Las* im Hefe-Zwei-Hybrid-System.** A: *Las* zeigt eine schwache Homodimerisierung. (Negativkontrolle: Zeile 13; Positivkontrolle: Zeile 14). Weitere Beschreibung im Text. In der schematischen Darstellung der Proteinteile stellt der jeweils obere den an die aktivierende Domäne fusionierten Partner dar. B: Alle in A analysierten Konstrukte wurden zur Kontrolle mit dem jeweiligen leeren Gegenvektor transformiert und auf SD-LWH mit 0,5 mM 3-AT ausgestrichen. Keiner der so transformierten Stämme zeigt unspezifisches Wachstum.

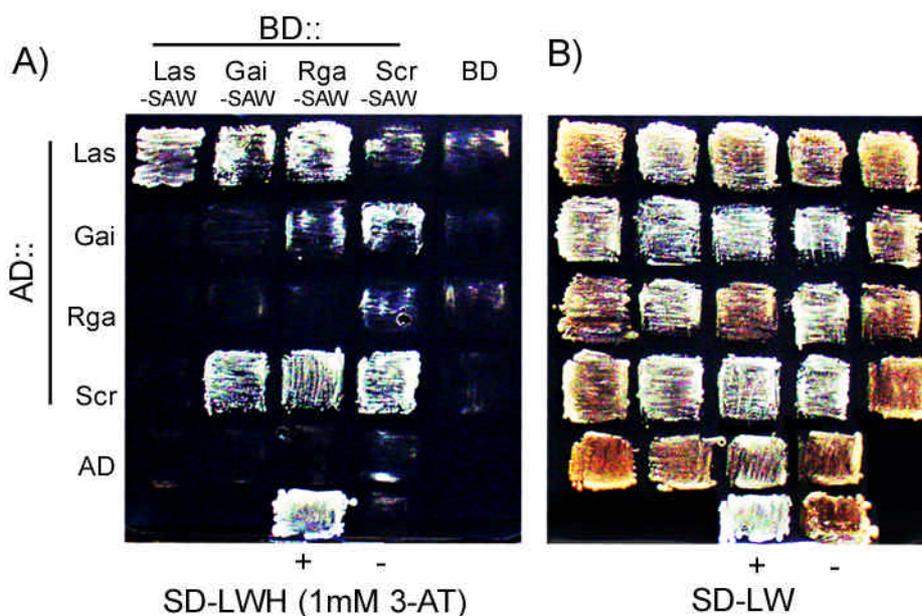
Um die entscheidenden Aminosäuren über dieses Ergebnis hinaus zu identifizieren, wurden weiterhin einzelne Aminosäuren ausgetauscht. Richards et al. (2000) weisen auf zwei für die mögliche Dimerisierung entscheidende und innerhalb der *GRAS*-Familie konservierte Aminosäuren hin. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus interagieren im Falle von *Las* das

Arginin326 und das Tyrosin420 zweier *Las*-Proteine reziprok miteinander, wobei das Tyrosin dazu zunächst phosphoryliert wird. Ausgehend von dieser Hypothese wurden jeweils die erwähnten Aminosäuren beider Partner ausgetauscht (Kap.3.3.2 und Abb.3-12 A). Zunächst wurde Tyrosin420 durch ein Phenylalanin ersetzt (pTG2.8 und pTG4.2, Kap.3.3.2), wodurch lediglich eine für die potentielle Phosphorylierung wichtige Hydroxylgruppe entfernt wurde. Das Wachstum des Stammes, der die so modifizierten Proteine exprimiert, zeigt, dass die Entfernung der Hydroxylgruppe keine Auswirkung auf die Dimerisierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System hat (Abb.3-12 A, vgl. Zeile 1 und 10). Wird anstelle des Tyrosins in dieser Position bei beiden Partnern allerdings ein Glutamat eingesetzt (pTG2.25 und pTG4.25, Kap.3.3.2), also eine hydrophile ungeladene durch eine saure und dazu kleinere Aminosäure ausgetauscht, verliert der diese Proteine exprimierende Stamm seine Fähigkeit auf Histidin-freiem Medium zu wachsen (Abb.3-12 A, Zeile 11). Gleiches gilt für den Austausch des Arginin326 durch ein Glutamat (Abb.3-12 A, Zeile 12), wodurch eine basische durch eine kleinere saure Aminosäure ersetzt wird (pTG2.28 und pTG4.28, Kap.3.3.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine schwache Homodimerisierung von *Las* festgestellt werden konnte. Die Interaktionsdomäne konnte dabei im hinteren Drittel des Proteins lokalisiert werden, wobei offenbar der Bereich AS 298-387 mit dem Bereich AS 359-445 interagiert. Arginin326 und Tyrosin420 sind notwendig um die Interaktion in diesem System zeigen zu können. Bei Deletionen und Aminosäureaustauschen ist allerdings zu bedenken, dass sich möglicherweise durch diese Modifikationen die Konformation des Proteins so verändert, dass es nicht mehr seine eigentliche Funktion erfüllen kann. Dies muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass der modifizierte Teil an der Interaktion direkt beteiligt ist. Nahezu alle hier getesteten Proteine konnten immunologisch im Western nachgewiesen werden (Kap.3.3.3). Insofern beruhen die Ergebnisse nicht auf der fehlenden Expression einzelner Proteine. Lediglich *Las* mit der Modifikation Y420F wurde nicht getestet. Da *Las*(Y420F) allerdings, wie das nachgewiesene Wildtyp-Protein, positiv im Hefe-Zwei-Hybrid-System ist, wird hier davon ausgegangen, dass dieses ebenso wie das wildtypische *Las* exprimiert wird.

### **3.3.5.2 Untersuchungen zur Heterodimerisierung zwischen verschiedenen GRAS-Proteinen**

In einem weiteren Ansatz wurde die Fähigkeit verschiedener *GRAS*-Proteine untersucht, untereinander Heterodimere zu bilden. Hierzu wurden zunächst *GAI*, *RGA* und *SCR* in



**Abb.3-13: Analyse der Eigenschaft einiger GRAS-Proteine untereinander Dimere zu bilden.** Verschiedene GRAS-Proteine wurden fusioniert an die aktivierende Domäne oder an der DNA-bindende Domäne ohne das SAW-Motiv in allen Kombinationen gegeneinander auf Interaktion getestet. **A:** Der Ausstrich auf Histidin-freiem Medium zeigt die Möglichkeit zur Dimerbildung (s. Text). Die Transformation mit jeweils dem leeren Gegenvektor (AD + BD) und die anschließende Analyse zeigt kein positives Ergebnis. Als Positivkontrolle (+) diente hier die Kombination von p53 aus der Maus und dem SV40 T-Antigen. Die Negativkontrolle (-) ist die Kombination von *Las* mit dem menschlichen LaminC **B:** Der Ausstrich der Stämme auf SD-LW zeigt das prinzipielle Potential für das Wachstum auf Minimalmedium mit Histidin.

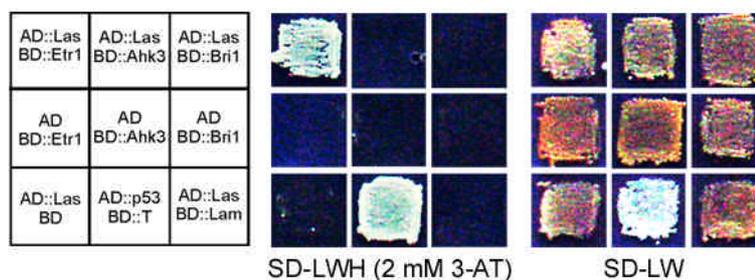
pGADT7 kloniert (Kap.3.3.2: pTG27, pTG28, pTG29) und diese Konstrukte zusammen mit den *Bait*-Konstrukten und den Konstrukten für *LAS* in allen Kombinationen untereinander getestet. Den an die DNA-bindende Domäne fusionierten Proteinen fehlte jeweils das SAW-Motiv (Abb.3-11 C). Der Test auf Interaktion wurde durch den Ausstrich der transformierten Stämme auf SD-LWH mit 1 mM 3-AT durchgeführt. Abb.3-13 A zeigt, dass in diesem Test neben *Las* nur *Scr* eine Dimerisierung mit sich selber eingeht. Darüber hinaus interagiert *Las* mit *Gai* und *Rga*, allerdings nur, wenn *Las* an die aktivierende Domäne fusioniert wird. Ebenso interagiert *Scr* mit *Gai* und *Rga*, insbesondere wenn es fusioniert an die aktivierende Domäne exprimiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass innerhalb des hier verwendeten Testes GRAS-Proteine keine generelle Tendenz zeigen, Homodimere zu bilden. Allerdings lässt sich in einigen Kombinationen prinzipiell die Tendenz zur Heterodimerisierung mit anderen GRAS-Proteinen beobachten.

### 3.3.6 Las zeigt Interaktion zu Histidin-Rezeptor-Kinasen im Hefe-Zwei-Hybrid-System

#### 3.3.6.1 Untersuchung der Interaktion von GRAS-Proteinen mit verschiedenen Rezeptor-Kinasen

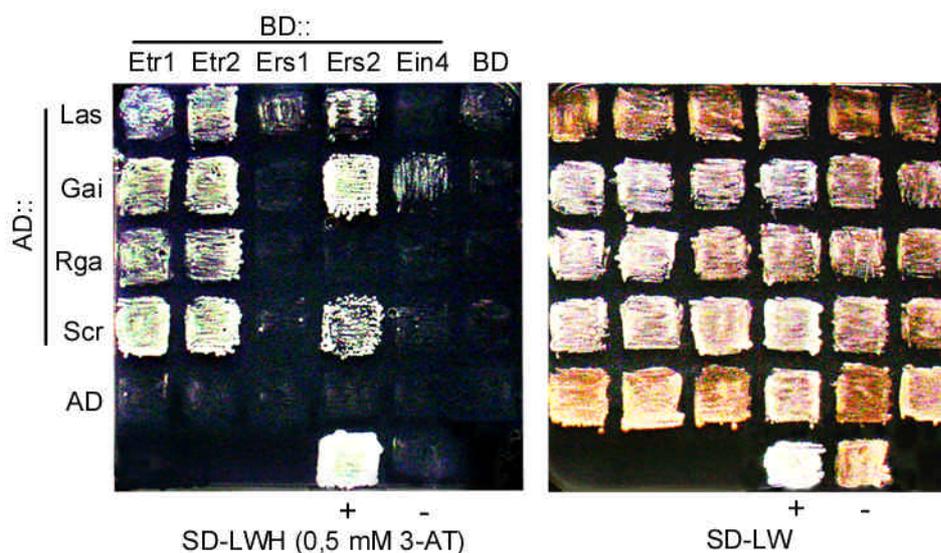
Basierend auf der Hypothese von Richards et al. (2000) (Kap.1.1.3) gelten Rezeptor-Kinasen als Kandidaten für die Interaktion mit GRAS-Proteinen. Innerhalb der Pflanzen sind einige Gruppen von Rezeptoren charakterisiert. Dazu gehören Lichtrezeptoren (Quail, 2002; Khurana, 2001), Rezeptoren, die beteiligt sind an der Pathogenabwehr (Nuernberger und Scheel, 2001), an der Organisation von Meristemen (Fletcher et al., 1999) und zudem Hormonrezeptoren (Hua und Meyerowitz, 1998; Li und Chory, 1997; Hwang und Sheen, 2001). Im Gegensatz zu den ersten drei Gruppen ist für den Bereich der Hormone ein eindeutiger Zusammenhang mit Seitentriebentwicklung beschrieben. So wird das Auswachsen von Seitentrieben offenbar durch die Balance zwischen Auxin und Cytokinin reguliert (Cline, 1997; Napoli, 1999). Weiterhin ist beschrieben, dass Cytokinin die positive Wirkung von *KNOX*-Genen auf den meristematischen Charakter von Zellen unterstützt, wohingegen GA und Ethylen als Antagonisten wirken können (Hay et al., 2002; Hamant et al., 2002). Aus diesen Gründen wurden im vorliegenden Versuchsteil Rezeptor-Kinasen aus dem Bereich der Hormonperzeption auf Interaktion mit *Las* getestet. Charakterisiert sind aus diesem Bereich Rezeptor-Kinasen für Ethylen (Hua und Meyerowitz, 1998), Brassinosteroide (Li und Chory, 1997) und für Cytokinin (Hwang und Sheen, 2001). Aus jeder der drei Gruppen wurde zunächst ein Vertreter getestet. Für Ethylen war dies *Etr1* (Chang et al., 1995), für die Brassinosteroide der einzig beschriebene Rezeptor *Bri1* (Li und Chory, 1997) und für Cytokinin *Ahk3* (Hwang und Sheen, 2001), da die übrigen beschriebenen Cytokinin-Rezeptoren nach Ueguchi et al. (2001) nur in der Wurzel exprimiert werden.

Der cytosolische Teil dieser Rezeptor-Kinasen wurde wie beschrieben in pGBKT7 kloniert (Kap.3.3.2: pETR1, pTG25, pTG59). Im Falle von *Ahk3* wurde nur die Kinase-Domäne kloniert, da kein PCR-Produkt des vollständigen cytosolischen Teils erhalten



**Abb.3-14: Test der Interaktion von Rezeptor-Kinasen.** Die Kombination von *Las* fusioniert an die aktivierende Domäne mit verschiedenen Rezeptor-Kinasen fusioniert an die DNA-bindende Domäne zeigt, dass im Gegensatz zu *Ahk3* und *Bri1* der Rezeptor *Etr1* im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Interaktion mit *Las* aufweist. Positiv- (+) und Negativkontrolle (-) s. Abb.3-13.

werden konnte. AH109 wurde mit allen drei Konstrukten und jeweils pTG4.1 transformiert und die resultierenden Stämme auf SD-LWH (2 mM 3-AT) ausgestrichen. Abb.3-14 zeigt, dass der Stamm, der BD::*Etr1* und AD::*Las* gemeinsam exprimiert, fähig ist auf SD-LWH (2 mM 3-AT) zu wachsen. Dies ist nicht der Fall wenn AD::*Las* gemeinsam mit BD::*Ahk3* oder BD::*Bri1* exprimiert wird. Dieses Ergebnis deutet auf eine Interaktion von *Las* mit *Etr1* im Hefe-Zwei-Hybrid-System hin.

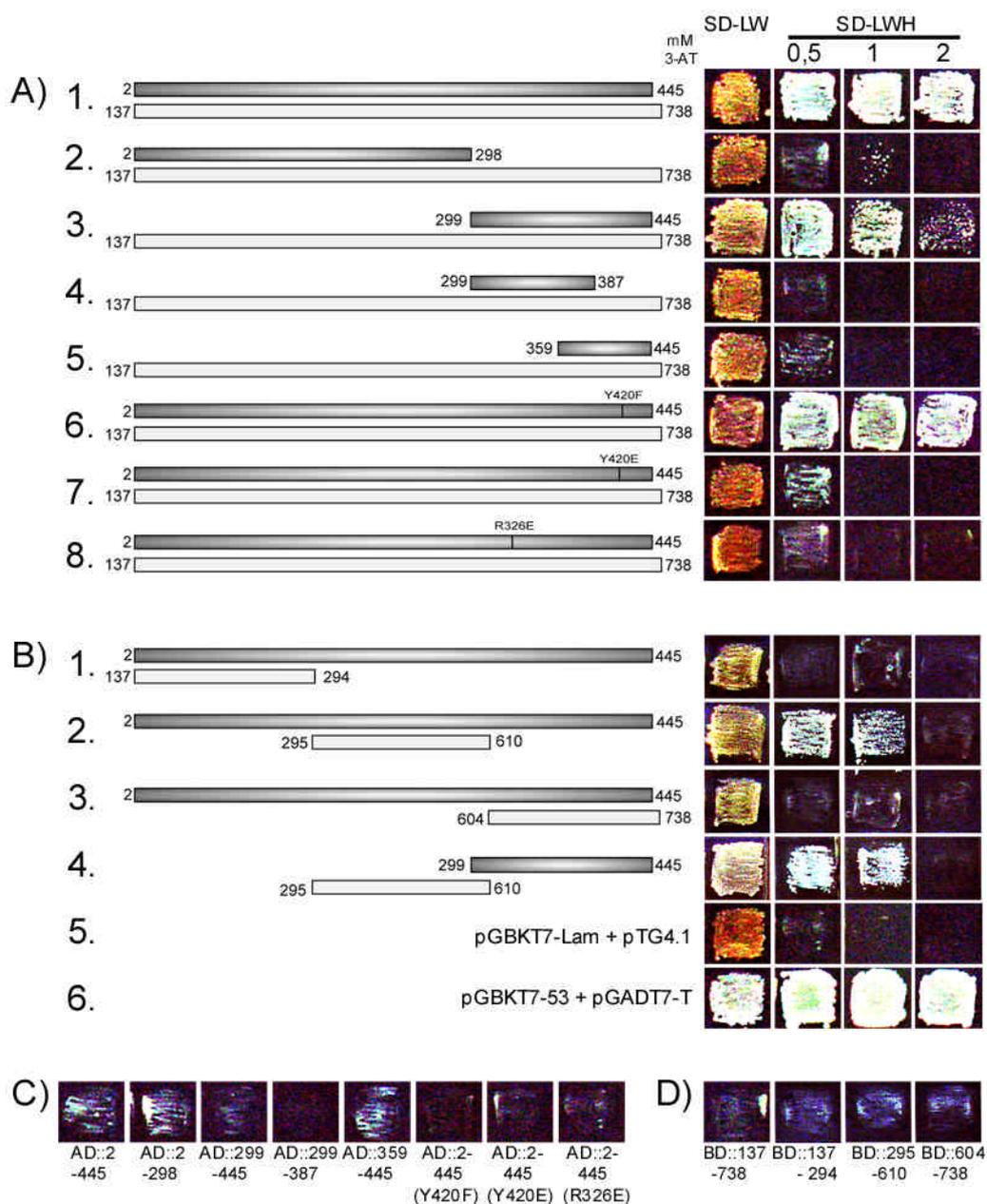


**Abb.3-15: Untersuchung der Interaktion zwischen GRAS-Proteinen und Ethylen-Rezeptoren.** Die Kombination von GRAS-Proteinen fusioniert an die aktivierende Domäne mit allen beschriebenen Ethylen-Rezeptoren fusioniert an die DNA-bindende Domäne in der Hefe zeigt, dass insbesondere GRAS-Proteine mit *Etr1*, *Etr2* und teilweise mit *Ers2* im Hefe-Zwei-Hybrid-System miteinander interagieren (s. Text). Positiv- (+) und Negativkontrolle (-): s. Abb.3-13. Werden die Proteine lediglich mit der aktivierenden Domäne (AD) oder der bindenden Domäne (BD) kombiniert, zeigen die Stämme kein Wachstum auf Histidin-freiem Medium.

In einem weiteren Versuchsteil wurde untersucht, ob *Las* auch eine Interaktion mit vier weiteren beschriebenen Ethylenrezeptoren zeigt und ob die Interaktion zu Ethylen-Rezeptoren eine generelle Eigenschaft der GRAS-Proteine ist. Dazu wurde der cytosolische Teil von *ETR2*, *ERS1*, *ERS2* und *EIN4* (Hua und Meyerowitz, 1998) in pGBKT7 kloniert (Kap.3.3.2: pETR2, pTG37, pTG38, pTG39). Mit diesen Konstrukten und den *Prey*-Konstrukten für *Las*, *Gai*, *Rga* und *Scr* (Kap.3.3.5.2) wurde AH109 in allen Kombinationen transformiert.

Abb.3-15 zeigt, dass neben *Las* auch *Gai*, *Rga* und *Scr* mit *Etr1* und darüber hinaus alle getesteten GRAS-Proteine mit *Etr2* im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagieren. Mit *Ers1* zeigt nur *Las* eine sehr schwache Interaktion, mit *Ers2* interagiert schwach *Las* und zudem *Gai* und *Scr* und mit *Ein4* interagiert ebenfalls schwach *Gai*. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion mit *Etr1* im Hefe-Zwei-Hybrid-System innerhalb der GRAS-Proteine nicht spezifisch für *Las* ist, sondern für

alle getesteten *GRAS*-Proteine gilt. Es zeigt sich allerdings eine Spezifität in der Interaktion von *GRAS*-Proteinen mit einzelnen Ethylen-Rezeptoren. Wohingegen alle getesteten *GRAS*-Proteine mit *Etr1* und *Etr2* interagieren, zeigt sich nahezu keine Interaktion mit *Ers1* und *Ein4*. Die Interaktion mit *Ers2* ist spezifisch für *Gai*, *Rga* und schwächer für *Las*.



**Abb.3-16: Lokalisierung der Interaktionsdomänen zwischen *Las* und *Etr1*.** Das in A und B jeweils oben dargestellte dunkle Fragment stellt das an die aktivierende Domäne fusionierte *Las*-Fragment dar, das untere helle Fragment das an die DNA-bindende Domäne fusionierte *Etr1*-Fragment. **A:** Lokalisierung der Interaktionsdomäne von *Las*. **B:** Lokalisierung der Interaktionsdomäne von *Etr1*. (weitere Beschreibung: siehe Text) **C:** Alle an die aktivierende Domäne fusionierte *Las*-Fragmente aus A wurden mit dem leeren *Bait*-Vektor transformiert und auf SD-LWH (0,5 mM 3-AT) ausgestrichen. Keins der Fragmente zeigt unspezifische DNA-Bindung oder Proteininteraktion. **D:** Das Gleiche gilt für alle Fragmente von *Etr1*, von denen keins unspezifische Autoaktivierung zeigt. Positiv- (B, Zeile 6) und Negativkontrolle (B, Zeile 5): s. Abb.3-13.

### 3.3.6.2 Lokalisierung der Interaktionsdomänen zwischen *Las* und *Etr1*

Im folgenden Versuchsteil wurden die Bereiche von *Las* und *Etr1* identifiziert, die an der Interaktion der beiden Proteine beteiligt sind. Zur Identifizierung der Interaktionsdomäne von *Las* wurde AH109 zunächst mit einigen der schon beschriebenen Deletionskonstrukten (Kap.3.3.5.1) und jeweils mit pETR1 transformiert. Abb.3-16 A zeigt, dass die Interaktionsdomäne von *Las* zu *Etr1* im C-terminalen Drittel des Proteins liegt. Wird dieser Bereich zusammen mit *Etr1* in der Hefe exprimiert, zeigt der Stamm Wachstum auf Histidin-freiem Medium (Abb.3-16 A, Zeile 3), im Gegensatz zu dem Stamm, der den N-terminalen Teil gemeinsam mit *Etr1* exprimiert (Abb.3-16 A, Zeile 2). Die Interaktion des C-terminalen Drittels von *Las* mit *Etr1* ist allerdings schwächer als die des gesamten Proteins (Abb.3-16 A, vgl. Zeile 1 und 3). Wird der identifizierte Bereich weiter verkürzt, ist kein Wachstum der diese Proteine exprimierenden Stämme mehr festzustellen (Abb.3-16 A, Zeile 4 und 5).

Weiterhin wurden auch die beschriebenen Aminosäureaustausche (Kap.3.3.5.1) auf ihre Auswirkung auf die Interaktion mit *Etr1* getestet. In Abb.3-16 A (Zeile 6) ist zu erkennen, dass die Modifikation Y420F keine Auswirkung auf die Interaktion von *Las* mit *Etr1* hat, da der entsprechende Stamm das gleiche Wachstum auf Histidin-freiem Medium zeigt, wie der das wildtypische *Las* exprimierende Stamm (Abb.3-16 A, vgl. Zeile 1 und 6). Anders wirken sich die Modifikationen Y420E und R326E aus. Die so modifizierten *Las*-Proteine sind nicht mehr in der Lage mit *Etr1* zu interagieren (Abb.3-16 A, Zeile 7 und 8).

Im nächsten Abschnitt wurde ebenso versucht, den interagierenden Bereich von *Etr1* zu identifizieren. Der cytosolische Teil von *Etr1* wurde dazu in drei Fragmente aufgeteilt, wobei der mittlere Bereich die Kinase-Domäne und der C-terminale Bereich die *Receiver*-Domäne darstellen (Chang und Meyerowitz, 1995). In Abb.3-16 B ist zu erkennen, dass weder das N-terminale noch das C-terminale Fragment mit *Las* interagiert (Abb.3-16 B, Zeile 1 und 3). Demgegenüber zeigt das mittlere Fragment, die Kinase-Domäne, Interaktion mit *Las*, wenn auch schwächer als der gesamte cytosolische Teil von *Etr1* (Abb.3-16 B, Zeile 2; vgl. A, Zeile 1). Auch wenn der Stamm nur die im vorangegangenen Teil identifizierte Interaktionsdomäne von *Las* als Partner exprimiert, findet Wachstum statt (Abb.3-16 B, Zeile 4).

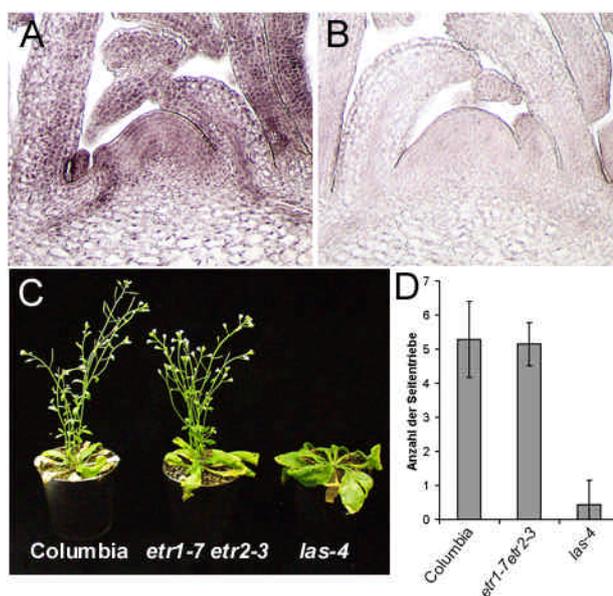
Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass *Las* mit seinem C-terminalen Bereich mit der Kinase-Domäne von *Etr1* interagiert. Zwei Aminosäureaustausche innerhalb des C-terminalen

Bereiches des *Las*-Proteins an Position 326 und 420 führen darüber hinaus zum Verlust der Fähigkeit mit *Etr1* zu interagieren.

### 3.3.7 Versuche zur Bestätigung der gefundenen Proteininteraktionen

#### 3.3.7.1 Die Transkriptionsdomänen von ETR1 und LAS überlappen

In den folgenden Versuchsteilen wurde versucht, die im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Ergebnisse in unabhängigen Experimenten zu bestätigen. Um zu überprüfen, ob für *Las* und *Etr1* prinzipiell die Möglichkeit besteht, in der Pflanze miteinander zu interagieren, wurde zunächst das Transkriptionsmuster von *ETR1* in vegetativen Columbia-Pflanzen mittels RNA *in situ*-Hybridisierung analysiert. In Abb.3-17 A und B ist zu erkennen, dass durch die durchgeführten Experimente eine ubiquitäre Transkription für *ETR1* nachgewiesen werden konnte und dass diese insbesondere in dem Bereich der Blattachsen mit der *LAS*-Transkriptionsdomäne überlappt. Insofern gelten die Ergebnisse von Hua et al. (1998), die eine ubiquitäre Transkription von *ETR1* in allen analysierten Geweben beschreiben, ebenso für den Bereich der Blattachsen. Dies bedeutet, dass für die beiden Proteine aufgrund ihrer Transkriptionsdomänen die Möglichkeit besteht, miteinander in Kontakt zu treten.



**Abb.3-17: Die Transkriptionsdomäne von ETR1 und der Phänotyp der *etr1etr2* Doppelmutante.** Der Vergleich der Signale der Gegensinn- (A) mit den Signalen der Sinn-Hybridisierung (B) zeigt, dass *ETR1* ubiquitär transkribiert wird. C + D: Die *etr1-7etr2-3* Doppelmutante zeigt keinen Seitentriebphänotyp (weitere Beschreibung: siehe Text).

#### 3.3.7.2 Analyse des Seitentriebphänotyps der *etr1 etr2*-Doppelmutante

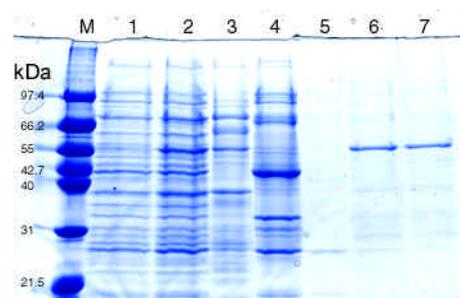
*Las* interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit Ethylenrezeptoren und hier am deutlichsten mit *Etr1* und *Etr2* (Abb.3-15). Sollte dieses Ergebnis eine funktionelle Bedeutung in der Pflanze haben, d.h. sollte *Las* durch die Interaktion mit diesen Rezeptoren aktiviert werden, ist zu vermuten, dass die *etr1etr2 loss of function*-Doppelmutante einen vergleichbaren Seitentriebphänotyp zeigt wie *las-4*, da hier möglicherweise die Aktivierung von *Las* nicht stattfinden kann. Aus diesem Grund wurde der Seitentriebphänotyp der Doppelmutante *etr1-*

*7etr2-3* (Hua und Meyerowitz, 1998) analysiert. Parallel zu Wildtyp und *las-4* wurde die Mutante für 28 Tage im Kurztag angezogen, anschließend in den Langtag überführt und nach einer Streckung des primären Sprosses von 10 – 15 cm dekapitiert. Abb.3-17 zeigt, dass die Seitentriebentwicklung aus Blattachseln der Rosette 14 Tage nach der Dekapitierung qualitativ (C) und quantitativ (D) der des Wildtyps entspricht. Die Seitentriebe von jeweils sieben Pflanzen wurden hier ausgezählt. Demnach hat der Ausfall der Ethylenrezeptoren *Etr1* und *Etr2* keine Auswirkungen auf den Seitentriebphänotyp der Pflanze.

### 3.3.7.3 Die in vitro Analyse von Proteininteraktionen

Um die im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Proteininteraktionen in einem unabhängigen Test zu bestätigen, wurden *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt. Zunächst wurde dazu ein GST-vermittelter Pull-Down-Essay (Melcher und Johnsston, 1995) als Methode gewählt. Diese Methode hat zur Voraussetzung, dass ein mit GST fusionierter Partner nativ über an Agarose gebundenes Glutathion aus *E.coli* aufgereinigt werden kann (Kap.2.2.16.2). Dazu wurde das offene Leseraster von *LAS* in pET42a kloniert (Kap.3.3.2: pTG15) und der Stamm BL21 mit diesem Konstrukt transformiert. Die Aufreinigung von GST::*Las* gelang allerdings nicht, da im Gegensatz zu GST alleine, das Fusionsprotein GST::*Las* in *E.coli* offenbar nicht löslich ist und somit während der Aufreinigung mit den übrigen Zellresten abzentrifugiert wird. Dies war auch der Fall wenn nur das Fragment AS 299-445 von *Las* an GST fusioniert wurde (Kap.3.3.2: pTG58).

Aus diesem Grund wurde auf die Methode des Protein-Overlay-Assay (Owen et al., 1999) zurückgegriffen, während der ein Partner unter denaturierenden Bedingungen aus *E.coli* aufgereinigt und anschließend renaturiert wird (Kap.2.2.16.3). Dazu wurde das offene Leseraster von *LAS* in pET28a kloniert (Kap.3.3.2: pTG13) und BL21 ebenfalls mit diesem Konstrukt transformiert. Wie in Abb.3-18 zu sehen, gelang die Aufreinigung des N-terminal mit sechs



**Abb.3-18: Die Aufreinigung von His<sub>6</sub>-markiertem *Las* analysiert mittels SDS-PAGE angefärbt mit Coomassie.** Der Auftrag der Proteinfraction vor (6) und nach der Entfernung des Harnstoffs (7) ergibt jeweils eine prominente Bande von der erwarteten Größe des *Las*-Proteins. M: Marker, 1: Auftrag der Proteinfraction aus *E.coli* vor der Induktion mit IPTG, 2: Auftrag der Proteinfraction nach der Induktion mit IPTG, 3: Durchfluss durch die Säule, 4: erste Waschfraktion, 5: zweite Waschfraktion, 6: Eluat aus der Säule mit 8 M Harnstoff, 7: nach der Dialyse ohne Harnstoff

Histidinen fusionierten *Las*-Proteins. Die Frage, ob die Renaturierung erfolgreich war, kann ohne einen funktionellen Test des Proteins allerdings nicht beantwortet werden. *LAS* und *ETR1* wurden weiterhin in pET21a kloniert (Kap.3.3.2: pTG67, pTG65) und BL21 ebenfalls mit diesen Konstrukten transformiert. Proteinfractionen der induzierten Stämme wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Glenney und Weber (1983) unter renaturierenden Bedingungen gebロットet. Mehrere anschließende Versuche eines Protein-Overlays mit unterschiedlich hoher Stringenz mit dem zuvor aufgereinigten His<sub>(6)</sub>-markierten *Las* (Kap.2.2.16.4) führten allerdings zu keinem positiven Ergebnis.

Zusammenfassend muss also gesagt werden, dass *Etr1* und *Las* aufgrund ihrer Transkriptionsdomänen die Möglichkeit haben miteinander zu interagieren, dass aber die Analyse von Ethylenrezeptor-Mutanten und *in vitro*-Bindungsstudien keine Bestätigung der *Etr1-Las* und der *Las-Las* Interaktion erbrachten.

### **3.3.8 Das Durchsuchen von zwei Hefe-Zwei-Hybrid-Banken führt zur Isolierung potentieller Interaktionspartner von *Las***

Zur Isolierung weiterer Interaktionspartner von *Las* wurde zunächst eine Hefe-Zwei-Hybrid-Bank aus Zellsuspension (Salchert, 1997) mit dem *Las*-Protein ohne das SAW-Motiv durchsucht. Dies führte zur Isolierung von 10 Kandidaten, wobei 5 davon zu den Hitze-Schock-Proteinen gehörten und die übrigen fünf Proteine ganz unterschiedliche Funktion besaßen. Da 50% der isolierten Kandidaten Hitze-Schock-Proteine darstellten, wurde davon ausgegangen, dass die Eliminierung des SAW-Motivs eine soweit gestörte Konformation zu Folge hat, dass in diesen Experimenten keine echten Interaktionspartner isoliert wurden. Daraufhin wurden die beiden in Kap.2.1.10 beschriebenen Hefe-Zwei-Hybrid-Banken parallel mit dem gesamten *Las*-Protein durchsucht, wozu das Konstrukt pTG2.1 (Kap.3.3.2) verwendet wurde. Nach Kap.2.2.15.3 wurden 735.000 Zygoten der *random-priming*- und 572.400 Zygoten der *oligodT-priming*-Bank auf SD-LWHA (50 mM 3-AT) ausplattiert. Nach dreitägiger Inkubation wurden die jeweils 45 größten Kolonien der beiden Ansätze isoliert und die Kandidaten wie beschrieben bestätigt und sequenziert. Unter 73 so erhaltenen Kandidaten befanden sich 65 verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen. Sechs davon besaßen Ähnlichkeit zu Kinasen oder Rezeptor-Kinasen, weitere sechs zu Transkriptionsfaktoren. Diese isolierten Kandidaten bieten nun die Möglichkeit ihre Rolle in der Seitentriebentwicklung durch reverse Genetik zu analysieren.

### **3.4 Die LAS-Funktion kann durch die Expression von STM in Blattachsen ersetzt werden**

#### **3.4.1 Die Transkription von Genen wird von Promotoren gesteuert**

Neben der Untersuchung von Expressionsmustern und Proteinfunktionen kann die ektopische Expression von Genen zur Analyse von Prozessen dienen. Auf diese Weise lässt sich zum Beispiel die Frage beantworten, ob die molekularen Voraussetzungen für eine Genfunktion in anderen Geweben ebenso vorhanden sind. Dies lässt Rückschlüsse auf die Interaktion mit weiteren Faktoren zu.

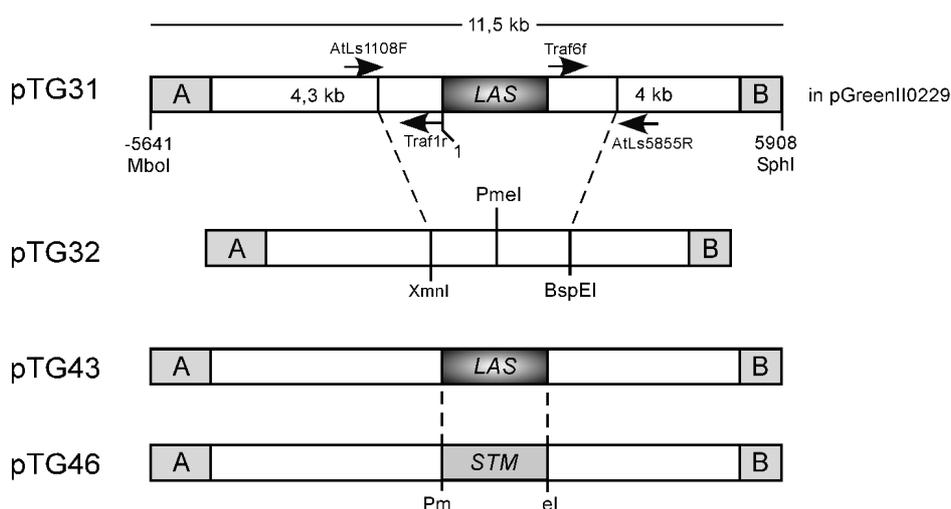
Bestimmend für die zeitliche und räumliche Dimension der Transkription ist der Promotor unter dessen Kontrolle ein Gen transkribiert wird. Unter dem Promotor wird die Gesamtheit der regulatorischen DNA-Sequenzen verstanden, die in cis-Stellung an der Verstärkung oder Abschwächung der Transkription beteiligt sind (Nover, 1994). Diese Promotor-Elemente dienen als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des jeweiligen Gens positiv oder negativ beeinflussen. Als Beispiel kann wiederum die in dieser Arbeit analysierte Transkription des *LAS*-Gens dienen. Das Zusammenspiel des *LAS*-Promotors und der an diesem Promotor bindenden Faktoren führt zur Transkription von *LAS* spezifisch in den Achseln von lateralen Organen des SAMs und der Sepalen (Kap.3.1).

Die adaxiale Blattseite, und hier vor allem der Bereich oberhalb der Leitbündel, hat ein besonderes Potential zur Bildung von Trieben, das durch die ektopische Expression verschiedener Gene, zu denen auch *STM* gehört, abgerufen werden kann (Vollbrecht et al., 1991; Lincoln et al., 1994; Chuck et al., 1996; Takada et al., 2001; Williams, 1998; Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung). In Kap.3.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Funktion von *LAS* eine Voraussetzung für die *STM*-Transkription im zentralen Bereich von Blattachsen ist. Die Frage, die sich dabei stellt ist, ob die Expression von *STM* in den betroffenen Blattachsen ausreicht, um ebenso wie in Blättern Seitentriebbildung zu induzieren, oder ob dazu weitere Funktionen des *LAS*-Gens benötigt werden. Diese Frage wurde im vorliegenden Versuchsteil durch die *STM*-Expression unter der Kontrolle des *LAS*-Promotors in der *las*-Mutante untersucht. Ist *STM* ein entscheidender Faktor, der zur Seitentriebentwicklung in der Mutante fehlt, sollte dadurch die Fähigkeit zur Seitentriebbildung wieder hergestellt werden.

### 3.4.2 Herstellung von Konstrukten zur Transformation

Um für die Expression von *STM* unter der Kontrolle des *LAS*-Promotors alle entscheidenden regulatorischen Elemente einzubeziehen, wurde ein möglichst großer Bereich der *LAS*-Region als Promotor verwendet. Dazu wurde aus dem Klon C1 (Ruben Herrero) mit PstI/SphI ein insgesamt 11,55 kb großes genomisches Fragment herausgeschnitten und in pGII0229 kloniert (Abb.3-19: pTG31). Dieses Fragment enthält 5641 bp bis zu einer MboI-Schnittstelle vor dem Startcodon von *LAS* und erfasst damit das 3'-Ende des nächsten Gens in dieser Richtung. Weiterhin enthält dieses Fragment 4570 bp nach dem Stopcodon von *LAS* und erfasst damit auch in dieser Richtung das 3'-Ende des nächsten Gens. Um anstelle des offenen Leserasters von *LAS* eine Klonierungsstelle zu generieren, wurde zunächst ein unmittelbar vor dem Startcodon liegendes PCR-Produkt (Oligonukleotide: *AtLs1108F* und *Traf1r*) in pGEM3Z kloniert (Abb.3-19). In die PmeI-Schnittstelle des Oligonukleotids *Traf1r* wurde anschließend ein mit *Traf6f* und *AtLs5855R* amplifiziertes PCR-Produkt kloniert, das dem Bereich unmittelbar nach dem Stopcodon entsprach. Da das Oligonukleotid *Traf6f* eine halbe PmeI-Schnittstelle enthält, entstand damit an dieser Stelle wieder eine vollständige PmeI-Schnittstelle. Der gesamte klonierte Bereich wurde dann mit XmnI/BspEI in pTG31 kloniert, so dass das *LAS*-Leseraster gegen eine PmeI-Schnittstelle ausgetauscht wurde (Abb.3-19: pTG32). In diese Schnittstelle wurden anschließend das mit *stmTRfo* und *stmTRre* amplifizierte offene Leseraster von *STM* (pTG46) und, als Kontrolle, das mit *AtLsTRfo* und *AtLsre* amplifizierte offene Leseraster von *LAS* kloniert (pTG43).

**Abb.3-19:** Konstrukte zur Pflanzentransformation. (s. Text)  
A (nächstes Gen in 5'-Richtung von *LAS*),  
B (nächstes Gen in 3'-Richtung von *LAS*)  
Die Position der Schnittstellen wird in Bezug auf das Startcodon von *LAS* angegeben.

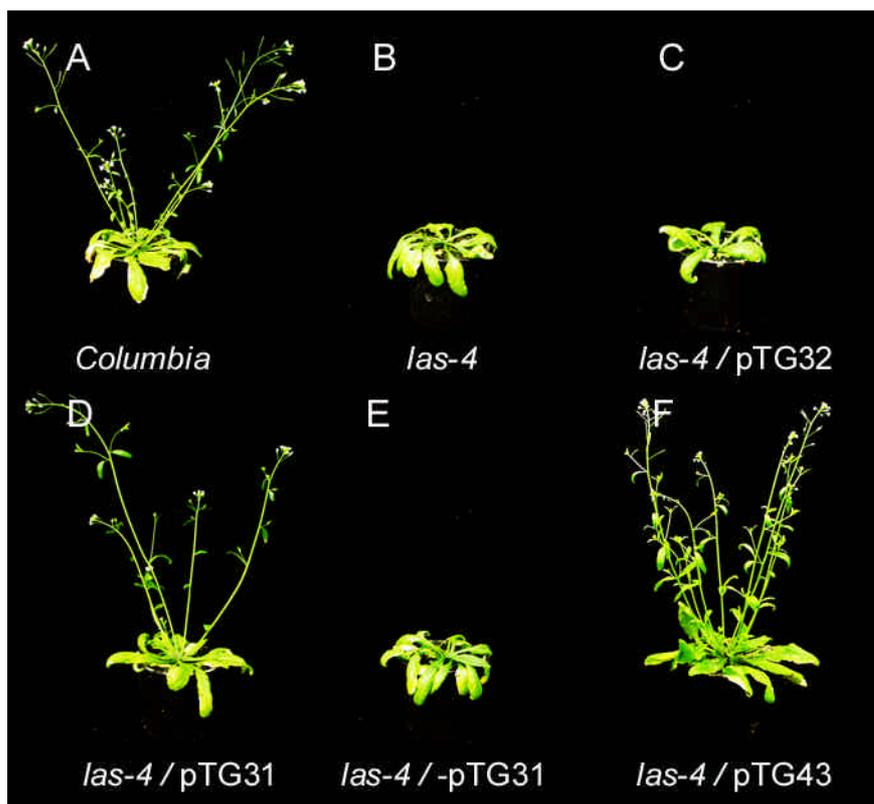


No(T1)	Genotyp	Konstrukt	Kopien (Southern)	Phänotyp T1	Seggregation (T2) Pflanzen/wt/Basta+
02054-1	las-4	pTG31a	1 ( Deletion 3')	wt	24/20/20
02054-2	las-4	pTG31a	2	wt	21/20/20
02054-3	las-4	pTG31a	1/2	wt	20/17/17
02054-4	las-4	pTG31a	2	wt	21/13/13
02107-1	las-4	pTG31b	2	wt	
02055-1	las-4	pTG32a	1	las	21/0/15
02185-1	las-4	pTG32a	1	las	
02056-1	las-4	pTG46a	1	gelappte Blätter	21/6/15
02056-2	las-4	pTG46a	1	becherförmige Blätter	20/5/15
02056-3	las-4	pTG46a	3	becherförmige Blätter	21/1/20
02056-4	las-4	pTG46a		gelappte Blätter	20/8/12
02056-5	las-4	pTG46a		gelappte Blätter	(Pflanzen/las/Basta+)
02184-1	las-4	pTG46a		gelappte Blätter	
02225-1	las-4	pTG46b	0	gelappte Blätter	
02225-2	las-4	pTG46b		gelappte Blätter	
02106-1	Columbia	pTG46a		gelappte Blätter	21/8/13
02380-1	Columbia	pTG46b	2	gelappte Blätter	
02380-2	Columbia	pTG46b		becherförmige Blätter	
02380-3	Columbia	pTG46b		becherförmige Blätter	
02380-4	Columbia	pTG46b	1/2	gelappte Blätter	
02380-5	Columbia	pTG46b	3	gelappte Blätter	
02223-1	las-4	pTG43b	2	wt	15/9/9
02223-2	las-4	pTG43b	1	wt	6/5/5
02223-3	las-4	pTG43b		wt	

**Tab.3-3: Transgene Linien.** Die Analyse der Primärtransgenen mittels Southern-Hybridisierung war nicht in allen Fällen möglich, da zum Teil nicht genügend Pflanzenmaterial zur DNA-Präparierung vorhanden war. In der Linie 02054-1 wurde mittels Southern-Hybridisierung und PCR eine Deletion im 3'-Bereich des eingeführten Promotors nachgewiesen, die allerdings keine Auswirkung auf die Komplementation zeigt. Zudem zeigt Linie 02225-1 wahrscheinlich eine ähnliche Deletion, die ebenfalls keine erkennbaren Auswirkungen auf die Funktionalität des eingeführten Konstruktes hat.

### 3.4.3 Untersuchungen zur Funktionalität des verwendeten Promotors

Um die Funktionalität des verwendeten Promotorbereiches zu testen, wurden anschließend Komplementationsexperimente durchgeführt indem *las-4*-Pflanzen mit pTG31, pTG32 und pTG43 transformiert wurden. Für pTG31 wurden fünf, für pTG32 zwei und für pTG43 drei unabhängige Linien etabliert (Tab.3-3). Die Analyse des Phänotyps der Primärtransgenen (T1) ergab, dass die pTG31- und pTG43-Transformanten nicht vom parallel angezogenen Wildtyp zu unterscheiden waren, wohingegen sich pTG32-Transformanten nicht von *las-4*-Pflanzen unterschieden. DNA der Primärtransgenen wurde mittels Southern-Hybridisierung bezüglich der Kopienzahl analysiert. Es wurden jeweils ein bis zwei Kopien der transformierten T-DNA nachgewiesen (Tab.3-3). Vier Linien der pTG31- und zwei Linien der pTG43-Pflanzen wurden in der nächsten Generation (T2) weiter untersucht. Die Pflanzen wurden parallel zu Wildtyp und *las-4* für 28 Tage im Kurztag angezogen und anschließend in den Langtag überführt. Nach der



**Abb.3-20: Phänotypen von transformierten *las-4*-Pflanzen.** (s. Text) **A:** Wildtyp. **B:** *las-4* **C:** Die Transformation mit pTG32 hat keinen Effekt auf den Phänotyp von *las-4*-Pflanzen. **D+E:** Die T2-Generation von pTG32-Transformanten segregiert 3:1 für den Wildtyp-Phänotyp (D). **F:** Die Transformation von *las-4* mit pTG43 führt ebenso zum Wildtyp-Phänotyp.

Streckung des primären Sprosses von 10 – 15 cm wurden die Pflanzen dekapitiert und die Seitentriebentwicklung nach 8 Tagen analysiert. Alle Linien zeigten in der T2-Generation annähernd eine 3:1- bzw. eine 15:1-Segregation für den Wildtyp-Phänotyp (Tab.3-3). Die anschließende BASTA-Behandlung ergab, dass alle wildtypischen Pflanzen zugleich BASTA-resistent waren (Tab.3-3, Abb.3-20). Die auf die gleiche Weise in der T2 untersuchte Linie der pTG32-Transformanten zeigte zu 100 % den *las-4*-Phänotyp (Tab.3-3, Abb.3-20). Die BASTA-Behandlung ergab hier eine 3:1-Segregation für die BASTA-Resistenz, ohne dass die resistenten Pflanzen von den sensitiven phänotypisch zu unterscheiden waren. Diese Daten belegen, dass durch das verwendete genomische Fragment eine vollkommene Komplementation des mutanten Phänotyps erreicht werden kann und dass insofern der vollständige *LAS*-Promotor kloniert wurde. Weiterhin haben klonierungsbedingte Basenaustausche unmittelbar vor dem Startcodon und unmittelbar nach dem Stopcodon in pTG43 keinen Effekt auf die Funktionalität des verwendeten Promotors.

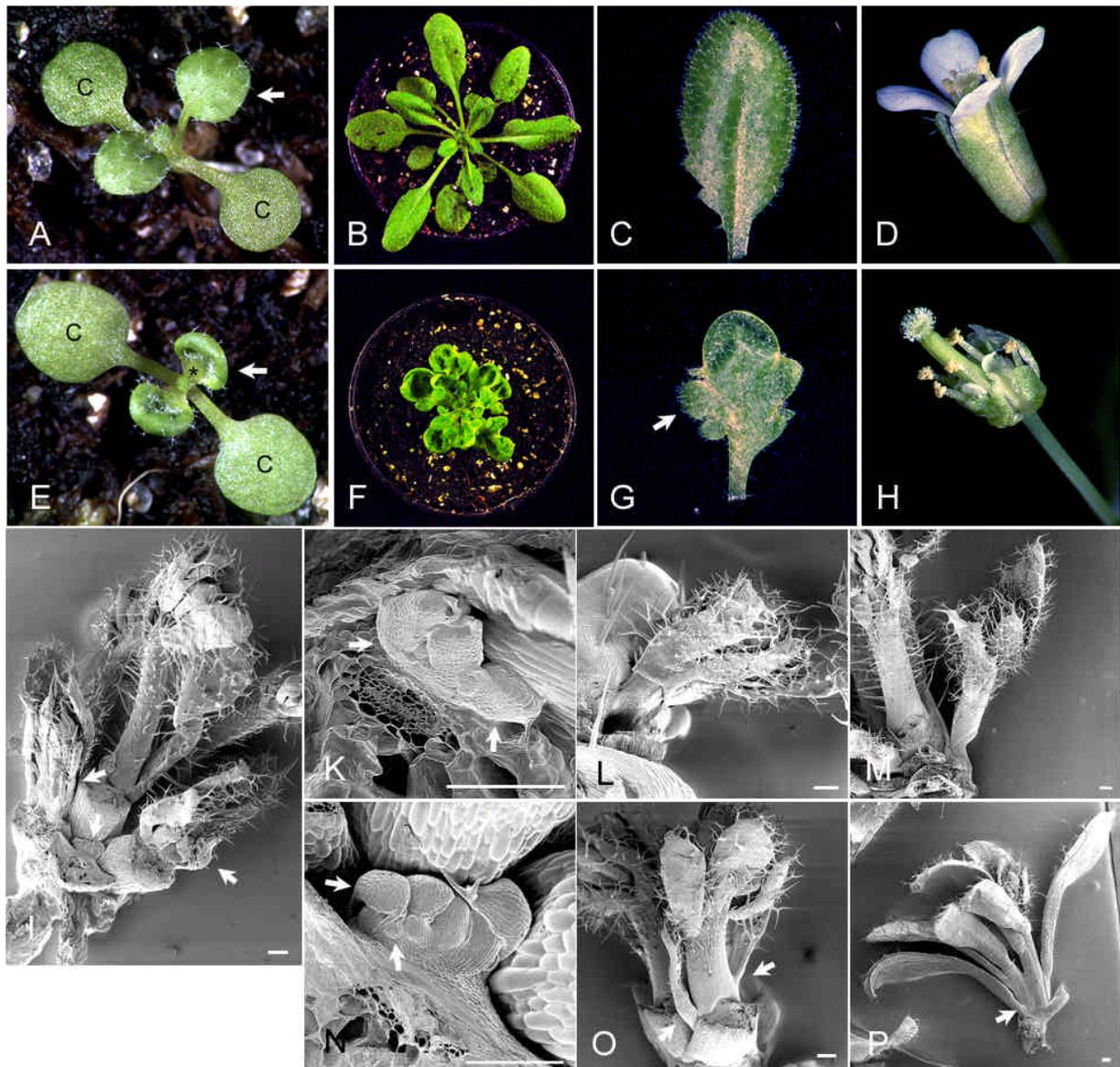
### 3.4.4 Expression von *STM* unter der Kontrolle des *LAS*-Promotors

#### 3.4.4.1 **Die Transformation der *las-4*-Mutante mit *pTG46* führt zur Seitentriebbildung in den Achseln der Rosettenblätter**

Zur Expression von *STM* unter dem *LAS*-Promotor wurden *las*-Pflanzen mit *pTG46* transformiert (Abb.3-20). Dabei wurden acht BASTA-resistente Primärtransgene isoliert, die durch becherförmige bzw. gelappte Blätter auffielen (Tab.3-3; Abb.3-21 E, F, G). Da die Pflanzen zum Teil sehr klein waren und nur wenige Blättern hatten, konnte zunächst keine eindeutige Aussage bezüglich der Seitentriebbildung gemacht werden. DNA von Primärtransgenen, bei denen genügend Blattmaterial zur DNA-Präparation vorhanden war, wurde mittels Southern-Hybridisierung analysiert, wobei, mit einer Ausnahme (s. Tab.3-3, Legende), 1 bis 4 Kopien des Transgens nachgewiesen werden konnten. Vier Linien wurden anschließend in der T2-Generation untersucht. In diesen Linien wurde durch PCR zum einen die Präsenz des 5'- und des 3'-Endes des eingeführten Promotors und des transgenen *STM*-Leserasters bestätigt, zum anderen wurde der *las-4*-Genotyp der Linien ebenfalls mit PCR verifiziert. Drei der angezogenen Linien zeigten annähernd eine 3:1 Segregation für den erwähnten Blattphänotyp, wobei ein Viertel der Pflanzen nicht von der *las-4*-Mutante zu unterscheiden war. Die vierte Linie zeigte eher ein Segregationsverhältnis von 15:1 (Tab.3-3). Alle analysierten Linien zeigten einen vergleichbaren Phänotyp, dessen Stärke allerdings innerhalb einer Linie variierte. Der BASTA-Test ergab eine perfekte Cosegregation des beschriebenen Phänotyps mit der BASTA-Resistenz. Die mikroskopische Analyse des Achselbereichs der Rosettenblätter zeigte, dass in den Blattachsen von Pflanzen mit stärkerem Blattphänotyp Seitentrieb-ähnliche Strukturen gebildet wurden. Diese Daten belegen, dass der hier neu aufgetretene Phänotyp auf die T-DNA von *pTG46* in der *las-4*-Mutante zurückzuführen ist. Die unterschiedliche Stärke des Blattphänotyps bzw. der Seitentriebbildung innerhalb einer Linie könnte auf die Präsenz von homozygoten und heterozygoten Pflanzen in der T2-Generation zurückgeführt werden.

Der spezielle Blattphänotyp der *pTG46*-Pflanzen zeigt sich in allen Laubblättern (Abb.3-21 B, F), einschließlich der Stängelblätter. Im Vergleich zu Laubblättern des Wildtyps sind diese kleiner, becherförmig (Abb.3-21 A, E, Pfeile) und die Petiolen sind breiter und weniger gestreckt (Abb.3-21 A, E, Stern). Am Rand von nahezu allen Rosettenblättern bilden sich blattähnliche Strukturen, die mit zunehmendem Alter weiter auswachsen und sich zu voll ausgebildeten Blättern entwickeln können (Abb.3-21C, G, Pfeil). Weiterhin zeigen *pTG46*-Pflanzen einen veränderten

Blütenphänotyp, der in seiner Stärke zwischen den analysierten Linien variierte. Im Extremfall, der bei 50% der Linien beobachtet wurde, sind die Organe aller drei äußeren Wirtel verkleinert und die Samenproduktion ist stark reduziert (Abb.3-21 H).



**Abb.3-21: Phänotyp von pTG46-Pflanzen (E-H, I, N-P) im Vergleich zum Wildtyp (A-D, K-M).** (s. Text) Die Pflanzen wurden für 28 Tage im Kurztag angezogen und anschließend in den Langtag überführt. SEM-Aufnahmen: 42 Tage alte Pflanzen. Zur Analyse der Seitentriebe durch SEM (K-P) wurden die Tragblätter entfernt. Größenstandard: 200  $\mu$ m.

Die Seitentriebentwicklung der pTG46-Pflanzen wurde durch SEM analysiert. In Abb.3-21 I (Pfeile) ist zu sehen, dass *las-4*/pTG46-Pflanzen im Gegensatz zur untransformierten *las-4*-Mutante prinzipiell in der Lage sind, Seitentrieb-ähnliche Strukturen aus den Achseln der Rosettenblätter zu bilden. Im Gegensatz zum Wildtyp geschieht dies allerdings ungeordneter. Wo im Wildtyp Blattprimordien um eine zentrale Zellgruppe mit meristematischer Aktivität herum

angeordnet sind (Abb.3-21 K Pfeile), bilden sich in pTG46-Pflanzen Blattprimordien, Blüten und ganze Seitentriebe in einer breiteren Region im Bereich der Blattachsen (Abb.3-21 N, Pfeile). Im Laufe der weiteren Entwicklung sind Organe, die ihren Ursprung in einer Blattachsel haben, an der Basis häufig miteinander verwachsen (Abb.3-21 O, P). In Abb.3-21 P ist beispielsweise ein Seitentrieb abgebildet, der aus einer Blattachsel entfernt wurde. Es ist zu erkennen, dass mehrere Blätter ihren Ursprung an der Basis des Triebes haben und dort zum Teil untereinander verwachsen sind (Abb.3-21, Pfeil).

Diese Beobachtungen zeigen, dass in der *las-4*-Mutante der Seitentriebdefekt durch *STM*-Transkription in den Blattachsen behoben werden kann und dass in der Mutante möglicherweise die *STM*-Transkription der fehlende Faktor zur Seitentriebbildung ist. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Transkription von *STM* unter dem *LAS*-Promotor zu einer ungeordneten Seitentriebbildung in einem breiteren Bereich der Blattachsen führt. Dies spricht dafür, dass das *LAS*-Transkript, das entlang des gesamten Achselbereichs zu finden ist (Kap.3.1.2), im Gegensatz zum *STM*-Transkript, nur im zentralen Bereich eine Funktion erfüllt.

Neben der Transformation von *las-4* wurde auch der Wildtyp mit pTG46 transformiert, wobei sechs unabhängige Linien etabliert werden konnten (Tab.3-3). Alle Primärtransgene zeigten einen Phänotyp, der mit dem der *las-4*/pTG46-Pflanzen vergleichbar war. Der Phänotyp einer in der T2 analysierten Linie cosegregierte wie erwartet mit der BASTA-Resistenz (Tab.3-3).

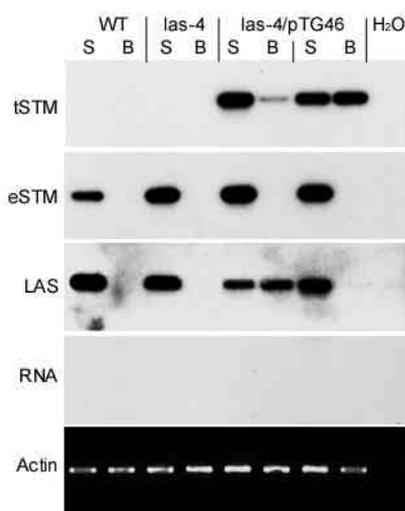
#### **3.4.4.2 Analyse des Blattphänotyps der pTG46-Pflanzen**

Da im Wildtyp keine Transkription von *LAS* durch RNA-ISH oder RT-PCR in den Blättern nachzuweisen ist (Kap.3.1; G. Schmitz, unveröffentlichte Daten), ist das Auftreten eines Blattphänotyps in pTG46-Pflanzen unerwartet. Einen Hinweis dazu geben Pflanzen, die *STM* unter der Kontrolle des blattspezifischen *AINTEGUMENTA*-Promotors exprimieren. Die Blätter dieser Pflanzen zeigen einen Phänotyp, der mit dem der Blätter der pTG46-Pflanzen vergleichbar ist (Lenhard et al., 2002). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass der Blattphänotyp auch im vorliegenden Fall durch die Expression von *STM* in den Blättern verursacht wird. Um diese Vermutung zu testen, wurden RT-PCRs mit RNA aus Sprossspitzen und Blättern von Wildtyp, *las-4* und pTG46-Pflanzen der T2-Generation mit starkem Phänotyp durchgeführt. Zur unabhängigen Analyse der Transkription des endogenen *STM* und des Transgens, wurde jeweils ein Oligonukleotid aus dem untranslatierten 3'-Bereich gewählt. Für das endogene *STM* wurde

die Kombination *stmfo* und *stm3're* und für das Transgen die Kombination *stmfo* und *AtLs3650re* verwendet. Abb.3-22 zeigt, dass das endogene *STM*, wie erwartet, in den Sprossspitzen aller analysierten Pflanzen, nicht aber in deren Blättern transkribiert wird. In pTG46-Pflanzen lässt sich demgegenüber die Transkription des Transgens nicht nur in Sprossspitzen, sondern auch in Blättern nachweisen.

Um ebenso die Transkription von *LAS* zu testen, wurde auf der gleichen RNA eine RT-PCR mit den Oligonukleotiden *AtLs2858fo* und *AtLs3650re* durchgeführt. Abb.3-22 zeigt, dass die Transkription von *LAS* in den Sprossspitzen von allen Pflanzen wie erwartet nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte nur bei einer der beiden hier analysierten pTG46-Pflanzen *LAS*-Transkription in den Blättern gezeigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Blattphänotyp der pTG46-Pflanzen durch die Expression des Transgens in den Blättern hervorgerufen wird und dass demnach *STM* unter der Kontrolle des *LAS*-Promotors nicht nur in Blattachsen, sondern auch in Blättern exprimiert wird.



**Abb.3-22: Analyse der Genexpression in pTG46-Pflanzen.** (s. Text) Blätter wurden 1 cm oberhalb des Blattansatzes geerntet. Die Ernte wurde 17 Tage nach der Überführung in den Langtag durchgeführt. *tSTM*: transgenes *STM*, *eSTM*: endogenes *STM*, RNA: gleiche Oligonukleotid-Kombination wie bei LAS auf der entsprechenden RNA, S (Sprossspitze), B (Blätter), alle PCRs 32 Zyklen; für Actin: 25 Zyklen. Annealing: 60 °C

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Expressionsdomäne von LAS definiert den Achselbereich von lateralen Organen des SAMs

Das Gen *LATERAL SUPPRESSOR* (*LAS/Ls*) ist entscheidend an der Seitentriebentwicklung in der vegetativen Phase von *Arabidopsis thaliana* und Tomate beteiligt (Schumacher et al., 1999; K. Theres, unveröffentlichte Daten). Innerhalb dieser Arbeit wurde die Transkription von *LAS/Ls* in beiden Arten mittels RNA *in situ*-Hybridisierung analysiert. In *Arabidopsis* und Tomate konnte durch diese Analyse das *LAS/Ls*-Transkript in den Achseln aller lateralen Organe des SAMs sowohl in der vegetativen als auch in der generativen Phase und in den Achseln der Sepalen nachgewiesen werden (Abb.3-1).

In der vegetativen Wachstumsphase von *Arabidopsis* erstreckt sich die Transkriptionsdomäne zunächst 1-2 Zellschichten in adaxial-abaxialer Richtung und 3-5 Zellschichten in basal-apikaler Richtung entlang des gesamten Achselbereiches. Das Alter der Blattprimordien, in deren Achseln die mRNA von *LAS* nachgewiesen werden konnte, reicht von P1 bis zu P21/22. P1 stellt dabei das jüngste Blattprimordium dar, das als solches als Vorwölbung an der Flanke des SAMs identifiziert werden kann. Die basal-apikale Ausdehnung der Transkriptionsdomäne reduziert sich bis P21/22 auf 1-2 Zellschichten. Diese Ergebnisse gelten sowohl für den Ökotyp Columbia als auch für Langsberg *erecta*, wo eine frühere Entwicklung der Achselknospen im Vergleich zu Columbia beschrieben ist (Long und Barton, 2000; Stirnberg et al., 2002) und was durch Beobachtungen in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. In Langsberg *erecta* sind laterale Meristeme in Blattachsen ab P9 zu beobachten und sind damit in Achseln zu finden, die noch *LAS*-Transkription zeigen, wohingegen in Columbia erst ab P21 laterale Meristeme auf histologischer Ebene zu identifizieren sind. In Langsberg *erecta* und auch in generativen Columbia-Pflanzen ist zu erkennen, dass sich im zentralen Achselbereich *LAS*-transkribierende Zellen zu lateralen Meristemen formieren, in denen parallel dazu die *LAS*-Transkription abgeschaltet wird. Nach dem Übergang in die generative Phase ist in Columbia keine prinzipielle Änderung der Transkript-Akkumulation festzustellen. *LAS*-Transkript lässt sich zu jedem analysierten Zeitpunkt in den Achseln der lateralen Organe des SAMs nachweisen, d.h. ebenso in den Achseln von Stängelblättern und Blüten. Darüber hinaus findet sich in der Blüte *LAS*-mRNA in den Achseln der Sepalen. Die Analyse der *Ls*-Transkript-Akkumulation in Tomate zeigt eine vergleichbare Verteilung in den Achseln der Laubblätter, der Blüten und der Sepalen.

Basierend auf diesen Beobachtungen, lässt sich sagen, dass die Transkriptionsdomäne des *LAS*-Gens Achselgewebe markiert. Diese lokale Transkription spiegelt offenbar positionelle Informationen wieder, die diesen Achselbereich als solchen definieren. Da die Region zunächst die Grenze zwischen zwei Geweben, dem Meristem und dem neu etablierten Blatt- oder Blütenprimordium, darstellt, lässt sich spekulieren, dass dieser Bereich durch eine Überlappungszone von zwei oder mehreren jeweils gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren definiert wird (Abb.1-1 B, C). Dadurch würden die zwei Gewebe einen dritten Gewebetyp in der Grenzregion etablieren. Dass *LAS* sehr früh nach der Etablierung des Blattprimordiums transkribiert wird, unterstützt diese Hypothese. Ähnliche Fälle gibt es bei der Musterbildung in *Drosophila* wo beispielsweise die Expressionsdomäne des *pair-rule*-Gens *even-skipped* durch einen Überlapp von aktivierenden und reprimierenden Transkriptionsfaktoren festgelegt wird (Small et al., 1992). Die Voraussetzungen für zwei gewebespezifische Transkriptionsfaktoren würden beispielsweise *STM* und *AS1* erfüllen (Abb.1-1). Beide sind dabei von besonderem Interesse, da die zu *LAS* auffallend ähnlich lokalisierte Transkription des kürzlich beschriebenen Gens *LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)* in Blattachsen, zum einen von der *AS1*-Funktion abhängig ist (Shuai et al., 2002; Byrne et al., 2002). Zum anderen ist ektopische *STM*-Expression in der Lage die Transkription von *LOB* in den Blättern zu aktivieren (Gallois et al., 2002). Neben *LOB* und *LAS* zeigen auch die hier analysierten Gene *CUC1* und *CUC2* vergleichbare Transkriptionsdomänen in den Achseln von jungen Blattprimordien (Abb.3-6, Abb.3-7). Die Transkription von mehreren Genen spezifisch in dem Bereich der Blattachsen zeigt die eigene Identität dieses Gewebes im Vergleich zum Meristem und Blattprimordium. Ob die Transkription eins der erwähnten Gene primär den Achselbereich definiert und alle weiteren von dessen Aktivität abhängig sind oder zumindest mehrere auf der primären regulatorischen Ebene stehen, bleibt zu analysieren. Die hier durchgeführte Untersuchung ergab keinen Einfluss von *CUC1* oder *CUC2* auf die *LAS*-Transkription, wobei allerdings die hohe funktionelle Redundanz beider *CUC*-Gene zu bedenken ist. Da ebenso keine Abhängigkeit der Transkription der beiden *CUC*-Gene von der *LAS*-Aktivität gefunden wurde und zudem beide etwas früher transkribiert werden als *LAS*, lässt sich sagen, dass *LAS* nicht für die primäre Festlegung der Achselidentität erforderlich ist.

Das hier aufgedeckte Transkriptionsmuster von *LAS* lässt Schlüsse zur Bedeutung des Gens für die Seitentriebentwicklung zu. Die *LAS*-Funktion ist nicht grundsätzlich eine Voraussetzung für Seitentriebentwicklung, da diese in den Achseln der Stängelblätter der *las*-Mutante nicht gestört

ist. Die Etablierung der lateralen Meristeme kann prinzipiell also auch ohne *LAS*-Aktivität ablaufen. Auf der anderen Seite ist die *LAS*-Transkription nicht ausreichend für die Etablierung von Seitentrieben, da in den Achseln der Blütenprimordien, wo *LAS*-Transkription stattfindet, keine Seitentriebe gebildet werden. Dass weitere Faktoren zur Etablierung von Seitentrieben erforderlich sind, ist ebenso daran zu erkennen, dass *LAS* im gesamten Achselbereich transkribiert wird, allerdings Seitentriebe nur im Zentrum der Blattachsel gebildet werden. Hier müssen weitere Faktoren die zentrale Position der lateralen Meristeme bestimmen, wobei die Nähe des zentralen Leitbündels des Blattes vermuten lässt, dass diese Faktoren dort ihren Ursprung haben (Abb.3-4E). Diese Vermutung wird durch die Bildung adventiver Meristeme auf der Blattoberseite präferentiell oberhalb der Leitbündel nach ektopischer *KNAT1*- und *CUC1*-Expression bestärkt (Chuck et al., 1996; Takada et al., 2001).

Die Bildung einer Zone ohne *LAS*-Transkription innerhalb der *LAS*-Transkriptionsdomäne im Zuge der Etablierung lateraler Meristeme lässt weiterhin die Vermutung zu, dass die Funktion von *LAS* zell-autonom ist, da sich offenbar laterale Meristeme aus *LAS*-transkribierenden Zellen entwickeln. Alternativ dazu könnten zunächst Zellen außerhalb der *LAS*-Transkriptionsdomäne beginnen sich zu einem Meristem zu organisieren, das erst in einem zweiten Schritt von *LAS*-transkribierenden Zellen umgeben wird. Da aber durchgehend an allen Seiten des lateralen Meristems eine gleichmässig starke *LAS*-Transkription beobachtet wurde, wird hier die erste Möglichkeit favorisiert (Abb.3-1B, K, L).

Die Transkription von *LAS* bzw. *Ls* ist sowohl in *Arabidopsis* als auch in Tomate in den Achseln der Sepalen zu finden. Allerdings hat hier nur in Tomate der Verlust der *Ls*-Funktion eine Auswirkung. Dass die Petalenbildung weniger sensitiv auf den Ausfall des *Ls*-Gens reagiert, ist ebenso in Tomate zu sehen, wo die *ls*-Mutation in anderen Kultivaren als der von Williams (1960) erwähnten *AntimoldB*, wie zum Beispiel in *Primabel*, zwar zum Ausfall der Seitentriebe führt, Petalen aber oft gebildet werden (Klaus Theres, persönliche Mitteilung). Möglicherweise haben redundante Faktoren, die in den anderen Fällen eine Petalenbildung ermöglichen, in *AntimoldB* einen geringeren Einfluss.

## **4.2 Die LAS-Aktivität führt zur Etablierung von meristematischen Zellgruppen in Blattachsen**

### **4.2.1 Ohne LAS geht die meristematische Aktivität in Blattachsen verloren.**

Um die Funktion von *LAS* in den Prozess der Etablierung lateraler Meristeme einordnen zu können wurde die Transkription verschiedener daran beteiligter Gene in Wildtyp und *las*-Mutante mittels RNA *in situ*-Hybridisierung analysiert. Als entscheidender Faktor für die Etablierung und Aufrechterhaltung meristematischer Aktivität wurde zunächst die Transkription von *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) untersucht. Eine entscheidende Frage war dabei, ob Zellen mit meristematischem Charakter in den Blattachsen der *las*-Mutante existieren, d.h. ob die *LAS*-Funktion entscheidend für die Etablierung meristematischer Aktivität in diesem Bereich ist.

In vegetativen *Arabidopsis*-Pflanzen ist *STM*-Transkription im gesamten zentralen Bereich des SAMs zu finden. Diese wird in dem Bereich herunterreguliert, in dem neue Blattprimordien angelegt werden. Insofern markiert *STM*-Transkription meristematische und undifferenzierte Zellen (Abb.3-3 A, Long und Barton, 2000). *STM*-Transkript ist darüber hinaus in den interprimordialen Regionen zu finden, und die Transkriptionsdomäne überlappt hier vollkommen mit der von *LAS* entlang des Achselbereichs der Blattprimordien (Abb.3-3 A, B). Ab P16 ist in Columbia eine Fokussierung der *STM*-Transkription im zentralen Bereich der Blattachsen festzustellen, der mit dem Bereich in dem laterale Meristeme angelegt werden übereinstimmt (Abb.3-3 C, E, G). Insofern ist hier der erste Hinweis auf die Etablierung einer meristematischen Zellgruppe im zentralen Bereich der Blattachsen zu finden, was auf histologischer Ebene erst ab P21 möglich ist. Die Analyse der *STM*-Transkript-Akkumulation in der *las*-Mutante zeigt, dass hier kein Unterschied zur Situation im Wildtyp im zentralen Bereich des SAMs und in den interprimordialen Regionen zu beobachten ist. Eine Abweichung ist in den Achseln von Primordien älter als P16 erkennbar. In der *las*-Mutante findet dort die Fokussierung der *STM*-Transkription im zentralen Achselbereich nicht statt (Abb.3-3 D, F). Dies bedeutet, dass in *las* nicht nur keine meristematische Zellgruppe auf histologischer Ebene zu identifizieren ist, sondern dass schon die frühere Etablierung der meristematischen Aktivität in der entsprechenden Zellgruppe nicht stattfindet (Abb.3-3 G, H).

Die Ergebnisse zeigen, dass die *LAS*-Funktion entscheidend für die Etablierung meristematischer Zellgruppen in Blattachsen ist. Gemessen an der *STM*-Transkription geht die meristematische Aktivität ohne *LAS*-Funktion in den Blattachsen verloren. Zunächst zeigt sich

in der interprimordären Region ein nahezu vollkommener Überlapp der Transkriptionsdomänen von *LAS* und *STM*, wobei in diesem Bereich aber keine Abhängigkeit der *STM*-Transkription von der *LAS*-Funktion besteht. Andererseits ist es aber möglich, dass in der interprimordären Region *STM* positiv auf die *LAS*-Transkription wirkt. Diese Möglichkeit wurde schon für die Etablierung der Transkription von *LAS* in Kap.4.1 diskutiert. Wäre dies der Fall, würde *STM* über die Aktivierung der *LAS*-Transkription die Voraussetzung für die eigene Transkription im zentralen Achselbereich von Blattprimordien älter als P16 schaffen. Wie bei Long und Barton (2000) beschrieben, ist anhand der *STM*-Transkription nicht eindeutig zu entscheiden, ob die *STM*-transkribierenden Zellen im zentralen Achselbereich aus der interprimordären Region stammen und insofern eine kontinuierliche *STM*-Transkription aufweisen oder ob die *STM*-Transkription in Zellen der Blattbasis etabliert wird, die zuvor frei von *STM*-Transkript waren. Die Überlappung der Transkriptionsdomänen von *LAS* und *STM* in der interprimordären Region bzw. in den Blattachsen und die offenbar zellautonome Funktion von *LAS* lassen allerdings vermuten, dass die Zellen tatsächlich aus dem Bereich der Achseln stammen. Da dies bedeutet, dass die Zellen eine kontinuierliche *STM*-Transkription aufweisen, sprechen die Ergebnisse für das Konzept des *detached meristems* (Kap.4.4; Kap.1.2). Auf histologischer Ebene unterscheidet sich die *STM*-transkribierende Zellgruppe erst später von ihrer Umgebung (ab P21). Vermittelt durch *STM*, verbleibt diese Zellgruppe, im Gegensatz zu ihrer Umgebung, offenbar im undifferenzierten, meristematischen Zustand.

Als ein weiteres an der Etablierung von Seitentrieben beteiligtes Gen wurde *INTERFASCICULAR FIBERLESS1/REVOLUTA (IFL1/REV)* in Wildtyp und *las*-Mutante mittels RNA-ISH analysiert. Der Ausfall des zu den Homeobox-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren zählenden Proteins führt unter anderem zu Defekten im vaskulären Gewebe und in der Seitentriebbildung (Talbert et al., 1995; Otsuga et al., 2001, Zhong und Ye, 1999). *IFL1/REV* wird im Wildtyp in vaskulären und provaskulären Geweben der Blätter und des Sprosses transkribiert. Zudem ist *IFL1/REV*-Transkript im SAM selber in einer Domäne mit der Form einer umgekehrten Schale zu finden. Darüber hinaus findet sich die Transkription in einer zentralen Zellgruppe in Blattachsen spätestens ab P17 (Abb.3-4 A, C, E, G; Otsuga et al., 2001; Zhong und Ye, 1999). Diese Zellen entsprechen der zuvor beschriebenen *STM*-transkribierenden Zellgruppe in Blattachsen und *IFL1/REV*-Transkription markiert hier insofern ebenso sich entwickelnde laterale Meristeme. In der *las*-Mutante entspricht die *IFL1/REV*-Transkription im vaskulären Gewebe und im SAM der des Wildtyps, die Transkription speziell in Blattachsen ist allerdings in *las* nicht zu finden (Abb.3-4 C-H). Dies

zeigt die Abhängigkeit von *IFL1/REV* von der *LAS*-Aktivität in Bezug auf die Seitentriebentwicklung. Umgekehrt findet sich keine Abhängigkeit der *LAS*-Transkription von der *IFL1/REV*-Funktion (Abb.3-8 A).

Das Transkriptionsmuster von *IFL1/REV* und der Phänotyp der *ifl1/rev*-Mutante legt eine bestimmte Rolle des Gens im Prozess der Seitentriebentwicklung nahe. *IFL1/REV* ist spezifisch im vaskulären Gewebe der Blätter und des Sprosses transkribiert und der Ausfall des Gens führt zu Defekten in diesem Gewebe. Die Transkriptionsdomänen in jungen Blattprimordien und im SAM lässt vermuten, dass auch hier provaskuläres Gewebe von der *IFL1/REV*-Transkription markiert wird (Abb.3-4 A, C). Ist das Gen an der Ausbildung von vaskulärem Gewebe beteiligt, könnte sein Ausfall insofern einen Effekt auf die Bildung der Seitentriebe haben. Kommt es hier zu Störungen, könnte die Unterversorgung der auswachsenden Zellen mit Assimilaten oder steuernden Signalen der Grund für die ausbleibende Entwicklung sein. So berichten beispielsweise Zhong und Ye (2001) von einem reduzierten Auxintransport in der *ifl1/rev*-Mutante. Da der Phänotyp der *stm-2 rev-6*-Doppelmutante in der generativen Phase dem der *stm-2*-Mutante entspricht, diskutieren Otsuga et al. (2001) für *IFL1/REV* eine Rolle als Aktivator von *STM* in der Entwicklung von lateralen Meristemen. Allerdings addieren sich die Effekte beider Mutationen in der vegetativen Phase, so dass diese Beziehung nicht eindeutig ist. Die Analyse der *STM*-Transkription in der *ifl1/rev*-Mutante könnte die Frage der gegenseitigen Abhängigkeit beantworten. *STM* wird nach den hier durchgeführten Untersuchungen etwas früher transkribiert als *IFL1/REV* (P16 zu P17), wobei allerdings dieser leichte Unterschied aufgrund der Variabilität zwischen den analysierten Pflanzen nicht eindeutig ist.

Mit *CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)* und *CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2)* wurden zwei funktionell redundante Gene der NAC-Domänen-Familie analysiert, die ebenfalls an der Etablierung von Meristemen beteiligt sind. Gegenüber den Einzelmutanten, die nahezu keinen auffälligen Phänotyp zeigen, ist die Doppelmutante nicht in der Lage während der Embryogenese ein SAM auszubilden (Aida et al., 1997). Da ebenso die *STM*-Transkription in den Embryos der Doppelmutante ausbleibt, gelten beide Gene als Aktivatoren von *STM* (Aida et al., 1999). Da beide zudem wegen ihrer Transkription in den Achseln der Keimblätter als mögliche Aktivatoren von *LAS* galten, wurde hier die gegenseitige Abhängigkeit auf Transkriptionsebene untersucht. Die Analyse der *LAS*-Transkription in *cuc1* und *cuc2* ergab keine Abweichung gegenüber dem Wildtyp (Abb.3-8 B, C), wodurch deutlich wird, dass die *LAS*-Transkription zumindest nicht von einem der *CUC*-Gene alleine abhängig ist. Die *LAS*-Transkription in der

*cuc1 cuc2*-Doppelmutante konnte nicht analysiert werden, da die Mutante als Keimling terminiert (Abb.3-5). Die Analyse der Transkription von *CUC1* und *CUC2* ergab zunächst eine auffällige Überlappung der Transkriptionsdomänen mit der von *LAS* entlang des Achselbereichs junger Blattprimordien (Abb.3-6, Abb.3-7). Im Gegensatz zu *LAS*, dessen Transkript in den Achseln der Blattprimordien ab P1 nachzuweisen ist, sind die *CUC*-Transkripte allerdings schon in der Achsel von P0 zu finden. Soweit festgestellt werden konnte, unterscheidet sich die Transkriptverteilung von *CUC2* bis in die Achsel von P17 nicht von der des *LAS*-Gens. In älteren Blattachsen ist *CUC2*-Transkript nicht mehr nachzuweisen (Abb.3-7). Die Verteilung des *CUC1*-Transkriptes unterscheidet sich ebenfalls bis P6/7 nicht von der des *LAS*-Gens, ist aber in den Achseln von P7/8 bis P21 nicht zu finden. Ab P22 konnte *CUC1*-Transkript innerhalb des zu diesem Zeitpunkt histologisch erkennbaren lateralen Meristems nachgewiesen werden (Abb.3-6). Die Analyse der *CUC1*- und *CUC2*-Transkription in der *las*-Mutante ergab keine Abweichung zur Situation im Wildtyp bis zur Achsel von P21 (Abb.3-6, Abb.3-7). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Transkription von *CUC1* in lateralen Meristemen ab P22 von der *LAS*-Funktion abhängig ist, da diese in der *las*-Mutante nicht zu finden ist (Abb.3-6).

Die auffällige Überlappung der *LAS*- und *CUC*-Transkriptionsdomänen wurde schon in Kap.4.1 diskutiert. Es finden sich hier keine Abhängigkeiten der drei analysierten Gene auf Transkriptionsebene bis P22. Insofern konnte die Vermutung, dass die *CUC*-Gene Aktivatoren von *LAS* sein könnten, nicht bestätigt werden. *CUC1* wird ab P22 im sich organisierenden lateralen Meristem transkribiert und ist eventuell an diesem Vorgang beteiligt. Damit ist es der Etablierung der Transkription von *STM* und *IFL1/REV* (P16/17) zeitlich nachgeschaltet. Die Organisation der lateralen Meristeme während der vegetativen Phase findet, wie schon die Etablierung meristematischer Aktivität, in der *las*-Mutante offenbar nicht statt. Da mit der Etablierung der meristematischen Aktivität ab P16 schon frühere Schritte der LM-Entwicklung in der *las*-Mutante gestört sind, ist es nicht überraschend, dass die *CUC1*-Transkription im LM ohne die *LAS*-Funktion ausbleibt. Die zeitlich frühere Etablierung der *STM*-Transkription in Zellen des LMs kollidiert mit der Ansicht, dass die *CUC*-Gene Aktivatoren von *STM* sein könnten. Dieser Befund macht zumindest die direkte Aktivierung von *STM* durch *CUC1* unwahrscheinlich.

Zusammenfassend lässt sich nach der Analyse der Transkription von einigen beteiligten Genen sagen, dass ohne die *LAS*-Funktion während der vegetativen Phase die Etablierung einer Zellgruppe mit der Identität eines lateralen Meristems ausbleibt. Keins der hier analysierten

Gene, die im Wildtyp durch ihre Transkription diese Zellen mit definieren, ist ohne die *LAS*-Funktion in dieser Zellgruppe transkribiert. Dies gilt sowohl für *CUC1* und *IFL1/REV* als auch für *STM*. Es bleibt also nicht nur die Organisierung der lateralen Meristeme aus, sondern mit dem Ausbleiben der *STM*-Transkription findet schon die Etablierung der meristematischen Identität in dieser Zellgruppe nicht statt. Soweit hier getestet, bleiben ohne *LAS*-Funktion alle Zellen in den Blattachsen demnach uniform.

#### **4.2.2 Die Funktion von *LAS* kann durch die Expression von *STM* in Blattachsen ersetzt werden**

Ein Hinweis, dass die positive Regulation der *STM*-Transkription eine entscheidende Funktion von *LAS* sein könnte, ist der Befund, dass die *LAS*-Funktion durch die Expression von *STM* unter dem *LAS*-Promotor im Prinzip ersetzt werden kann (Abb.3-21). Neben der adaxialen Blattseite (Williams, 1998; Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung) besitzt demnach auch die Blattachsel ein *LAS*-unabhängiges Potential zur Seitentriebbildung, dass durch die Expression von *STM* abgerufen werden kann. Die Expression Blattachsel-spezifischer Gene wie *CUC1*, *CUC2* und eventuell *LOB* ist möglicherweise verantwortlich für dieses spezielle Potential zur Etablierung von lateralen Sprossen. Dass dieses Potential nicht in allen Geweben existiert, zeigt die ausbleibende Sprossbildung in den Achseln der Blüten und den Achseln der Sepalen in pTG46-Pflanzen, wo, vermittelt durch den *LAS*-Promotor, ebenfalls *STM* exprimiert wird. Dass die *LAS*-Funktion durch die *STM*-Expression unter dem *LAS*-Promotor ersetzt werden kann, berstärkt weiter die Vermutung, dass *LAS* zellautonom agiert. Die in Blattachsen von pTG46-Pflanzen ungeordnete Organbildung kann darauf zurückgeführt werden, dass dort *STM*-Expression entlang der gesamten Achselbereichs stattfindet und dadurch meristematische Aktivität entlang der gesamten Achsel induziert wird.

In den Pflanzen, die *STM* unter der Kontrolle des *LAS*-Promotors exprimieren, wurde ein unerwarteter Blattphänotyp beobachtet (Abb.3-21). Alle Laub- und Blütenblätter dieser Pflanzen sind kleiner als die des Wildtyps und an den Rändern, die häufig nach oben gewölbt sind, finden sich charakteristische Auswüchse. Blätter von Pflanzen, die *STM* unter der Kontrolle des blattspezifischen *ANT*-Promotors exprimieren, zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp, wobei allerdings keine Aufwölbung der Blattfläche beschrieben wird (Lenhard et al., 2002). RT-PCR-Experimente zeigen, dass das Transgen in *LAS::STM*-Pflanzen im Gegensatz zum *LAS*-Gen im Wildtyp und zum endogenen *STM* tatsächlich in Blättern exprimiert wird (Abb.3-22). Dabei wird

hier nicht davon ausgegangen, dass eine Veränderung im *LAS*-Promotor die Ursache für diese unerwartete Expression in den Blättern ist, da das Kontrollkonstrukt pTG43, über die vollständige Komplementation des *las*-Phänotyps hinaus, keinen Effekt zeigt. Zudem tritt der beschriebene Blattphänotyp mit zwei sich entsprechenden Parallelkonstrukten gleichermaßen auf. Die unerwartete *STM*-Expression in Blättern würde zum einen dann stattfinden, wenn die Transkription des *LAS*-Gens über ein im offenen Leseraster liegendes Element in den Blättern reprimiert wird. Wenn das *STM*-Leseraster dieses Element nicht enthält, würde diese Reprimierung im Falle des Transgens wegfallen. In diesem Zusammenhang ist zum Beispiel eine Regulation durch *microRNAs* denkbar (Llave et al., 2002).

Ebenso würde dieser Effekt auftreten, wenn neben der im Kap.3.2.1 gezeigten positiven Wirkung von *LAS* auf die Transkription von *STM*, auch eine positive Wirkung von *STM* auf die Transkription von *LAS* existiert. Diese Möglichkeit wurde schon in Kap.4.1 für die Etablierung der *LAS*-Transkriptionsdomäne diskutiert. Wird *STM* unter der Kontrolle des *LAS*-Promotors exprimiert, hätte die positive Wirkung von *STM* auf den *LAS*-Promotor eine selbst aufrechterhaltende Transkription zur Folge und zwar in allen Zellen, in denen der *LAS*-Promotor einmal aktiviert wurde. Da zu Beginn der Blattentwicklung *LAS* nahezu an der gesamten adaxialen Seite des Primordiums exprimiert ist (Abb.3-1 A), würde dies zu einer ständigen *STM*-Expression im adaxialen Teil des Blattes führen. Die ungleiche Verteilung der *STM*-Expression würde zu einer ebenso ungleichen Reprimierung der Zellstreckung führen, womit die Aufwölbung der Blätter zu erklären wäre. Ist die positive Wirkung von *STM* auf den *LAS*-Promotor Realität, müsste in den Blättern mit *STM*-Expression ebenso das endogene *LAS*-Gen transkribiert werden. Mittels RT-PCR konnte allerdings keine eindeutige Korrelation von *STM*- und *LAS*-Transkription in den Blättern hergestellt werden (Abb.3-22 B). Da aber tendenziell in Blättern mit stärkerer *STM*-Expression keine *LAS*-Transkription nachgewiesen wurde, könnte es sein, dass in diesen Blättern die Expression zusätzlicher für die *LAS*-Transkription nötiger Faktoren von *STM* unterdrückt wird.

#### **4.3 Mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System finden sich Hinweise auf die Funktion des Las-Proteins**

Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden Analysen zur Funktion des *Las*-Proteins durchgeführt. Im Zuge der Etablierung des Systems wurde zunächst eine Autoaktivierung der Transkription der Reportergene in der Hefe durch das *Las*-Protein festgestellt. Diese Eigenschaft

macht die Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems prinzipiell schwierig. Um das Problem der Autoaktivierung durch *Las* zu umgehen wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen konnte die Autoaktivierung durch 50 mM 3-AT im Medium unterdrückt werden. Zum anderen wurde durch Deletionen und Modifikationen versucht, den verantwortlichen Teil des Proteins zu identifizieren und anschließend zu eliminieren.

Richards et al. (2000) schlagen für die pflanzenspezifischen *GRAS*-Proteine eine Funktion ähnlich der tierischen *STATs* (*signal transducers and activators of transcription*) vor. *STAT*-Proteine werden zunächst durch eine mittels Liganden aktivierte membranständige Rezeptor-Kinase an einem konservierten Tyrosinrest phosphoryliert. Daraufhin findet eine durch eine SH2-Domäne vermittelte Homo- oder Heterodimerisierung statt, woraufhin das dimerisierte Protein vom Cytosol in den Kern überführt wird. Hier binden die Dimere direkt an DNA und aktivieren dort die Transkription bestimmter Gene. Nach einer Dephosphorylierung und anschließender Dissoziation werden die Monomere wieder in das Cytosol exportiert (Kisseleva et al., 2002).

Die für die Aktivierung der Transkription verantwortliche Domäne liegt bei den *STATs* am C-terminalen Ende des Proteins, wobei phosphorylierte Serine entscheidend für diese Aktivierung sind (Wen et al., 1995). Mit den hier durchgeführten Deletionen und Modifikationen konnte das innerhalb der *GRAS*-Familie konservierte C-terminale SAW-Motiv als essentieller Teil für die Aktivierung der Transkription durch das *Las*-Protein identifiziert werden. Wird dieser Teil entfernt, ist keine Autoaktivierung mehr festzustellen (Abb.3-11 A). Die Autoaktivierung kann ebenso durch einen Austausch des innerhalb des SAW-Motivs am stärksten konservierten Serins gegen ein Alanin reduziert werden, wohingegen der Austausch eines Serins unmittelbar vor dem Motiv keinen Effekt hat. Da diese Austausche lediglich zur Eliminierung einer Hydroxylgruppe führen, wird hier davon ausgegangen, dass diese moderaten Modifikationen keinen Einfluss auf die Gesamtkonformation des Proteins haben und insofern für die spezifische Aktivität des SAW-Motivs sprechen. Dass größere Deletionen am N-Terminus und in der Mitte des Proteins, ebenfalls zu einer Eliminierung der Autoaktivierung führen, kann zum einen mit einer Konformationsänderung des Proteins erklärt werden (Abb.3-11 A). Alternativ könnte neben dem SAW-Motiv zusätzlich ein größerer Bereich am N-Terminus an der Aktivierung der Transkription beteiligt sein. Wird nur einer der beiden Teile entfernt, wäre damit die Aktivierung nicht mehr möglich. Die Möglichkeit die Autoaktivierung weiterer Mitglieder der *GRAS*-Familie (*Gai*, *Rga* und *Scr*) durch die Deletion ihrer SAW-Motive zu eliminieren zeigt, dass die Transkriptions-aktivierende Eigenschaft des SAW-Motivs nicht spezifisch für *Las* ist (Abb.3-11

B). Ogawa et al. (2000) zeigen, dass das ebenfalls an die DNA-bindende Domäne von *Gal4* fusionierte *Gai*-Homolog aus Reis, *OsGai*, in der Lage ist, die Transkription von Reporter genen in Spinatblättern zu aktivieren. Ebenso zeigt *OsGai* Autoaktivierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Itoh et al., 2002). Durch größere Deletionen wird in jener Arbeit die verantwortliche Domäne im N-terminalen Bereich lokalisiert, wobei die SAW-Domäne allerdings nicht speziell getestet wird. Der Nachweis der Kernlokalisierung einiger Mitglieder und die Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription in heterologen Pflanzen- und Hefe-Systemen, sind die bisher verfügbaren experimentellen Hinweise für eine Funktion der *GRAS*-Proteine, die eine Rolle der Mitglieder dieser Familie als Transkriptionsfaktoren nahe legen.

Weiterhin konnte eine Homodimerisierung des *Las*-Proteins im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt werden. Die Homodimerisierung war allerdings sehr schwach und schon bei mehr als 2 mM 3-AT im Medium nicht mehr nachzuweisen (Abb.3-12). Durch die Kombination verschiedener Deletionskonstrukte ließ sich die Interaktionsdomäne auf das C-terminale Drittel des *Las*-Proteins eingrenzen und hier insbesondere auf der Bereich AS 299-387, der offenbar mit dem Bereich 359-445 eines zweiten *Las*-Proteins interagiert (Abb.3-12). Nach Richards et al. (2000) könnte ein innerhalb er *GRAS*-Familie konserviertes Arginin an Position 326, das innerhalb einer Domäne mit Ähnlichkeit zur SH2-Domäne der *STATs* liegt, mit einem ebenso konservierten Tyrosin an Position 420 im Zuge der Homodimerisierung interagieren. Der Austausch beider Aminosäuren jeweils durch ein Glutamat führte zum Ausbleiben der Homodimerisierung im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Abb.3-12). Im vorigen Abschnitt wurde die Anfälligkeit der Konformation des *Las*-Proteins gegenüber Deletionen diskutiert, da sich bezüglich der Lokalisierung der autoaktivierenden Domäne mit größeren Deletionen keine eindeutigen Aussagen machen ließen. Dies war nicht der Fall bei der Lokalisierung der Interaktionsdomäne. Hier konnte das C-terminale Drittel als entscheidend identifiziert werden. Eine Erklärung könnte die stabilere Konformation der Interaktionsdomäne im Vergleich zur Aktivierungsdomäne sein oder aber eine lokalisierte Interaktionsdomäne im Vergleich zu einer über einen größeren Sequenzbereich verteilte Aktivierungsdomäne.

Die hier dargestellten Ergebnisse würden der Theorie von Richards et al. (2000) entsprechen nach der die SH2-ähnliche Domäne bei *Las* den Bereich von AS 293 bis 367 abdeckt und über das erwähnte Arginin mit dem Tyrosin des jeweiligen Partners interagiert. Die Interaktion hätte eine Phosphorylierung des Tyrosins zur Voraussetzung. Um diese Hypothese zum Interaktionsmechanismus zu untersuchen wurde das Tyrosin durch ein Phenylalanin ersetzt, dem

die zur Phosphorylierung nötige Hydroxylgruppe fehlt. Dass dieser Austausch allerdings keinen Effekt auf die Dimerisierung hat, kann zum einen daran liegen, dass diese Aminosäure nicht an der Dimerisierung beteiligt ist und der Austausch gegen ein Glutamat (s.o.) zu einer größeren Konformationsänderung führt, so dass keine Interaktion mehr möglich ist. Alternativ dazu kann vermutet werden, dass in der Hefe keine Phosphorylierung des Tyrosins 420 stattfindet, das Protein aber dennoch in der Lage ist, eine schwache Bindung mit einem zweiten *Las*-Protein einzugehen, die erst durch Phosphorylierung ihre eigentliche Stärke erreicht. Dies würde die nur schwache Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System erklären. Der Austausch des Arginins 326 gegen ein Glutamat, der zu einem Verlust der Dimerisierung führt, lässt ebenso eine Beteiligung dieser konservierten Aminosäure vermuten. Untersuchungen zur Homo- und Heterodimerisierung weiterer *GRAS*-Proteine zeigten, dass Homodimerisierung außer bei *Las* nur noch bei *Scr* nachgewiesen werden konnte (Abb.3-13). Darüber hinaus erbrachten einige Kombinationen Hinweise auf Heterodimerisierung, wobei dies zum Teil von der Orientierung als *Bait*- oder *Prey*-Protein abhängig war. Hier stellt sich die Frage, ob die getesteten Proteine prinzipiell in der Pflanze die Möglichkeit haben, miteinander zu interagieren. Die sehr spezifischen Expressionsdomänen von *Las* und *Scr* stehen dabei der offenbar ubiquitären Expression von *Rga* und *Gai* gegenüber. *Las* zeigte in einer Orientierung Interaktion mit *Gai* und *Rga*. Die mögliche Bildung von Heterodimeren deutet die Vernetzung verschiedener Signalwege über *GRAS*-Proteine an.

Gezielte Untersuchungen zur Interaktion des *Las*-Proteins mit beschriebenen Rezeptor-Kinasen erbrachten zunächst ein positives Ergebnis für den Ethylenrezeptor *Etr1* (Abb.3-14). Eine Interaktion zeigte sich nicht mit dem Cytokininrezeptor *Ahk3* und dem Brassinosteroidrezeptor *Bri1*. Weitere Untersuchungen ergaben, dass *Las* ebenso mit den Ethylenrezeptoren *Etr2* und schwächer mit *Ers2* im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagiert, wohingegen sich nahezu keine Interaktion mit den Ethylenrezeptoren *Ers1* und *Ein4* zeigte (Abb.3-15). Auch alle weiteren getesteten *GRAS*-Proteine interagierten mit *Etr1* und *Etr2* und darüber hinaus zeigten *Gai* und *Scr* Interaktion mit *Ers2*. Die Lokalisierung der Interaktionsdomänen zwischen *Las* und *Etr1* durch Deletionskonstrukte ergab, dass das C-terminale Drittel von *Las* offenbar mit der Kinase-Domäne von *Etr1* interagiert (Abb.3-16). Die schon im vorigen Abschnitt besprochenen Aminosäureaustausche R326E und Y420E im *Las*-Protein führten zu einem Ausbleiben der Interaktion. Diese Ergebnisse entsprechen der Vermutung, dass *GRAS*-Proteine an ihrem C-Terminus phosphoryliert werden. Ebenso spricht der Effekt des Austausches R326E für eine Beteiligung der SH2-ähnlichen Domäne an der Interaktion mit *Etr1*, was mit der Interaktion der

*STATs* über die SH2-Domäne mit Rezeptor-Kinasen vergleichbar wäre (Kisseleva et al., 2002). Der Austausch Y420F zeigte keinen Effekt auf die Interaktion mit *Etr1*. Der Austausch, der lediglich die Eliminierung einer Hydroxylgruppe zur Folge hat, lässt allerdings nicht zwangsläufig einen Effekt auf die Interaktion erwarten.

Um zu überprüfen, ob *Las* im Prinzip in der Pflanze die Möglichkeit hat, mit *Etr1* zu interagieren, wurde die Transkription von *ETR1* mittels RNA *in situ*-Hybridisierung überprüft. Es zeigte sich, dass *ETR1* in allen Geweben einschließlich der Blattachsen exprimiert wird (Abb.3-17) und insofern beide Proteine die Möglichkeit haben miteinander in Kontakt zu treten. Um die biologische Bedeutung der in der Hefe gefundenen Interaktionen zu überprüfen, wurde die Doppelmutante für die *loss-of-function*-Allele *etr1-7* und *etr2-3* bezüglich Seitentriebbildung untersucht. Hier konnte allerdings kein qualitativer oder quantitativer Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Abb.3-17). Unabhängige *in vitro*-Analysen zu den hier im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Proteininteraktionen waren unter anderem wegen Problemen bei der Aufreinigung von nativem *Las*-Protein aus *E.coli*, nicht erfolgreich. Die negativen Ergebnisse der *in vitro*-Analysen lassen allerdings keinen Schluss zur Bedeutung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Proteininteraktionen zu, sondern können ihre Ursachen beispielsweise in der möglichen Instabilität des *Las*-Proteins haben.

Es stellt sich die Frage nach der Bedeutung der hier mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen zu *Etr1* und *Etr2* für die Funktion des *Las*-Proteins in der Pflanze. Es konnte gezeigt werden, dass *Las* mit zwei bestimmten ausgewählten Rezeptor-Kinasen in der Hefe interagieren kann. Die Analyse des Phänotyps der *etr1-7 etr2-3*-Doppelmutante gibt allerdings keinen Hinweis auf eine Bedeutung beider Rezeptoren für die *Las*-Funktion. Haben die Interaktionen eine Bedeutung, könnte der fehlende Phänotyp der Doppelmutante auf Redundanz zurückgeführt werden. In *Arabidopsis* existieren einige hundert Rezeptor-Kinasen, die zum großen Teil nicht charakterisiert sind und wovon einige die Aufgabe von *Etr1* und *Etr2* ebenso erfüllen könnten. Elf gehören mit den Ethylen- und Cytokininrezeptoren zur Familie der Zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen (Urao et al., 2001). Dass die hier gefundenen Interaktionen nicht auf eher unspezifische Bindung an Mitglieder dieser Familie zurückzuführen ist, zeigt insbesondere die fehlende Interaktion zu dem verwandten Cytokininrezeptor *Ahk3*.

Bezüglich der Rolle von Ethylen ist dessen antagonistische Wirkung auf die Aktivität des *KNOX*-Gens *KNAT2* beschrieben, dessen Transkription durch Ethylen unterdrückt werden kann

(Hamant et al., 2002). Insofern wirkt Ethylen der Aufrechterhaltung und Etablierung meristematischer Aktivität entgegen. In dem Zusammenhang muss bedacht werden, dass Ethylenrezeptoren durch Ethylen negativ reguliert werden, d.h. nur ohne das Vorhandensein von Ethylen phosphorylieren sie nachgeschaltete Faktoren wie zum Beispiel *Ctr1* (Hua und Meyerowitz, 1998). Bezüglich der Interaktion von *Etr1* mit *Las* würde dies insofern einen Sinn machen, als dass durch Ethylen die entsprechenden Rezeptoren abgeschaltet würden und eine Aktivierung von *Las* und damit eine Etablierung lateraler Triebe nicht stattfände. Ebenso wie *Las* interagiert *Ctr1* mit der Histidin-Kinase-Domäne von *Etr1* im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Clark et al., 1998). Neben dem gut untersuchten Signalweg über *Ctr1* werden unabhängige Signalwege diskutiert (Cao et al., 1999). Biologisch würde die Kontrolle der Seitentriebbildung durch Ethylen insofern sinnvoll sein, als dass das in Stresssituationen produzierte Ethylen die Aktivierung von *Las* durch die entsprechenden Rezeptoren unterbinden würde und es so zu keiner Seitentriebbildung in für die Pflanze ungünstigen Situationen käme. Dies würde zu einer präferentiellen Versorgung des primären Sprosses mit Assimilaten und eventuell zur schnelleren Samenbildung in Stresssituationen führen.

Die mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System ermittelten Hinweise zur Transkriptionsaktivierung, Dimerisierung und Interaktion zu Rezeptor-Kinasen unterstützen die Hypothese von Richards et al. (2000) zur Rolle der *GRAS*-Proteine. Entspricht die *LAS*-Funktion dieser These, sollte *LAS* durch Phosphorylierung des Tyrosins 420 durch eine Rezeptor-Kinase aktiviert werden, anschließend dimerisieren und so als Transkriptionsaktivator dienen. Das Expressionsmuster von *LAS* und *STM* in Rechnung stellend, ist vorstellbar, dass *LAS* über diesen Mechanismus nur in der zentralen Region der Blattachsen aktiviert wird und dort die *STM*-Expression möglicherweise direkt aktiviert. Dies würde bedeuten, dass *LAS* die unten diskutierte Funktion der Aufrechterhaltung des meristematischen Zustandes nur in der zentralen Region der Blattachsen erfüllt. Der Ligand der seinerseits die beteiligte Rezeptor-Kinase aktiviert, könnte vom in unmittelbarer Nähe lokalisierten Leitbündel des Blattes ausgehen und so die Position des lateralen Meristems bestimmen. Falls Ethylen eine Rolle in der Aktivierung spielt, würde das bedeuten, dass im zentralen Achselbereich die Ethylenkonzentration niedriger ist als im peripheren Achselbereich und so eine Aktivierung durch Ethylen-abhängige Rezeptor-Kinasen möglich ist. Getestet werden könnte diese Hypothese unter anderem durch Verwenden eines konstitutiv aktiven *Las*-Proteins. Die Seitentriebbildung der dieses Protein exprimierenden Pflanzen müsste der von Pflanzen entsprechen, die *STM* unter der Kontrolle des *LAS*-

Promotors exprimieren. Ob diese Sichtweise der *LAS*-Funktion tatsächlich der Realität entspricht, müssen weitere Proteinuntersuchungen *in planta* und *in vitro* zeigen.

#### **4.4 Abschließende Überlegungen**

Seitentriebentwicklung in *Arabidopsis* findet während der vegetativen Wachstumsphase in einem akropetalen Gradienten statt, was bedeutet, dass sich in älteren Blattachsen weiter entwickelte Seitentriebe finden als in jüngeren. Nach dem Übergang in die generative Phase wird dieser Gradient von einem basipetalen Gradienten überlagert, insofern als dass sich dann Seitentriebe in den jüngeren Achsen schneller entwickeln als in älteren (Grbic und Bleecker, 2000; Hempel und Feldmann, 1994; Stirnberg et al., 1999). Der Phänotyp der *las*-Mutante lässt nun den Schluss zu, dass die *LAS*-Funktion nur für die Bildung der in einem akropetalen Gradienten angelegten Seitentriebe der vegetativen Phase notwendig ist (Abb.1-2 C, D). Nach dem Übergang in die generative Phase ist die *LAS*-Funktion zu entbehren oder kann von anderen Faktoren ersetzt werden. Gleiches gilt offenbar auch für die Tomate, wo in der *ls*-Mutante die letzten vor der generativen Phase gebildeten Blattachsen Seitentriebe ausbilden (Abb.1-2 A, B). Der Phänotyp der *las*-Mutante kann so verstanden werden, dass *LAS* Teil eines Mechanismus ist der nur in der Seitentriebbildung der vegetativen Phase Anwendung findet. Dies würde bedeuten, dass die Seitentriebbildung in den beiden Wachstumsphasen über unterschiedliche Mechanismen reguliert wird.

Alternativ gibt es zumindest eine weitere Betrachtungsweise. Hempel und Feldmann (1994) beschreiben, dass es bezüglich der Anlage von Organen keine Übergangsphase des SAMs gibt. Das erste Primordium, das vom SAM nach der Überführung von Pflanzen vom Kurz- in den Langtag angelegt wird, stellt gleich ein Blütenprimordium dar. Die letzten während der vegetativen Phase angelegten 3-5 Blattprimordien entwickeln sich zu Stängelblättern. In den Achsen dieser Stängelblätter findet Seitentriebentwicklung auch ohne *LAS*-Funktion statt (Abb.1-2 C, D). Da dies unabhängig von dem Zeitpunkt ist, wann der Übergang zur generativen Phase erfolgt (K. Theres, unveröffentlichte Daten), besteht also offenbar jeweils in den jüngsten Blattachsen das Potential Seitentriebe ohne *LAS*-Funktion zu bilden. Dieses Potential wird allerdings erst nach der Umwandlung des vegetativen SAMs in ein generatives umgesetzt. Die Entwicklung der Seitentriebe in den jüngsten Blattachsen lässt die Existenz eines vom SAM nach der Umwandlung ausgehenden Signals vermuten, dass die basipetale Seitentriebentwicklung aktiviert. Formal kann dies ein positives oder der Wegfall eines negativen Signals sein. Die letzte

---

Möglichkeit erinnert dabei stark an die von der Sprossspitze vermittelt Apikaldominanz (Cline, 1997). Die räumliche Nähe des vegetativen SAMs oder das Alter der Blattachsen spielen demnach eine entscheidende Rolle für das Potential zur Seitentriebentwicklung ohne *LAS*-Funktion. Molekular kommt dieses Potential möglicherweise in der *CUC1*-Expression zum Ausdruck, die bis zu P6/7 im gesamten Achselbereich zu finden ist. Der Phänotyp der *las*-Mutante und die dort verlorengelassene bzw. ausbleibende Expression beteiligter Gene lassen sich nun so interpretieren, dass ohne *LAS* dieses Potential in älteren Blattachsen verloren geht. Die entscheidende Funktion des spezifisch in diesen Blattachsen transkribierten *LAS*-Gens mag deswegen die Aufrechterhaltung des Potentials zur Seitentriebbildung der Blattachselzellen während der vegetativen Phase sein. Konkreter würde dies bedeuten, dass *LAS* den meristematischen Charakter der Zellen im zentralen Bereich der Blattachsen aufrecht erhält, so dass diese in der Lage bleiben, Meristeme auszubilden. Dafür spricht die sehr frühe Expression von *LAS* und weiterer Genen wie *LOB*, *CUC1* und *CUC2* spezifisch in gerade angelegten Blattachsen. Offenbar wird hier sofort nach deren Bildung ein für die Seitentriebentwicklung positives Umfeld etabliert. Diese Sichtweise unterstützt wie schon die Überlappung der *LAS*-Expressionsdomäne mit der von *STM* und die diskutierte Zellautonomie von *LAS* (Kap.4.1) das Konzept des *detached meristem*. Dies besagt, dass nach der Trennung vom SAM Zellen mit meristematischem Charakter in den Blattachsen zurückbleiben, die sich dann zu lateralen Meristemen entwickeln. Die hier dargestellten Daten entsprechen insofern diesem Konzept, als dass sie nahe legen, dass unmittelbar nach der Anlage der Blattprimordien an ihrer adaxialen Seite Zellen bestimmt werden, die ihren meristematischen Charakter beibehalten und sich später zu Seitentrieben entwickeln.

## 5. Literatur

**Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell* 9(6): 841-57.

**Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 126(8): 1563-1570.

**Allen KD, Sussex IM** (1996) *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 200: 254-264.

**Bartel P, Chien C-T, Sternglanz R, Fields S** (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*. 14(6): 920-922, 924.

**Bechtold N, Jaudeau B, Jolivet S, Maba B, Vezon D, Voisin R, Pelletier G** (2000) The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 155(4): 1875-1887.

**Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C** (1997) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J* 17: 170-180.

**Bolle C, Koncz C, Chua N-H** (2000) *PAT1*, a member of the *GRAS* family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* 14: 1269-1278.

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

**Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R** (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* 289(5479): 617-619.

**Brandstaedter J, Rossbach C, Theres K** (1994) The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* 192: 69-74.

**Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA** (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 408(6815): 967-971.

**Byrne ME, Simorowski J, Martienssen RA** (2002) *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* 129: 1957-1965.

**Chang C, Meyerowitz EM** (1995) The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: A eukaryotic two-component signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(10): 4129-4133.

**Chuck G, Lincoln C, Hake S** (1996) *KNAT1* Induces Lobed Leaves with Ectopic Meristems When Overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1277-1289.

**Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C** (1998) Association of the *Arabidopsis* *CTR1* Raf-like kinase with the *ETR1* and *ERS2* ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(9): 5401-5406.

**Clark SE** (2001) Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(4): 276-284.

**Cline MG** (1997) Concepts and terminology of apical dominance. *Amer J Bot* 84(8): 1064-1069.

**Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R** (1990) *floricaula* : A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322.

**Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Fledmann KA, Benfey PN** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86(3): 423-433.

**Dill A, Jung H-S, Sun T-P** (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (24): 14162-14167.

**Doebley J, Stec A, Hubbard L** (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386(6624): 485-488.

**Fields S, Song OK** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (6230): 245-246.

**Fields S, Sternglanz R** (1994) The two-hybrid system: An assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics* 10(8): 286-292.

**Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM** (1999) Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristem. *Science* 283: 1911-1914.

**Furmer IJ, Pumfrey JE** (1992) Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 115: 755-764.

**Gallois J, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R** (2002) Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* 129: 3207-3217.

**Gietz RD, Woods RA** (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Meth Enzymol* 350: 87-96.

**Glenney Jr. JR, Weber K** (1983) Detection of calmodulin-binding polypeptides separated in SDS-polyacrylamid gels by a sensitive [<sup>125</sup>I]calmodulin gel overlay assay. *Meth Enzymol* 102: 204-210.

**Grbic V, Bleecker AB** (2000) Axillary meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 21(2): 215-223.

**Greb T** (1999) Seitentriebbildung bei der Tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) – Charakterisierung von Genen und Mutanten. *Diplomarbeit, Mat.-Nat.-Fak. Universität zu Köln*.

**Groot SPC, Bouwer R, Busscher M, Lindhout P, Dons HJ** (1995) Increase of endogenous zeatin riboside by introduction of the *ipt* gene in wild type and the *lateral suppressor* mutant of tomato. *Plant Growth Regulation* 16: 27-36.

- Hamant O, Nogué F, Belles-Boix E, Jublot D, Grandjean O, Traas J, Pautot V** (2002) The *KNAT2* Homeodomain protein interacts with Ethylene and Cytokinin signaling. *Plant Physiol* 130: 657-665.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-80.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ** (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75(4): 805-816.
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M** (2002) The Gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* 12: 1557-1565.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M, Benfey PN** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101(5): 555-567.
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM** (2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42(6): 819-832.
- Hempel FD, Zambryski PC, Feldmann LJ** (1998) Photoinduction of flower identity in vegetatively biased primordia. *Plant Cell* 10: 1663-1675.
- Hempel FD, Feldman LJ** (1994) Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* 192(2): 276-286.
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QiG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM** (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10(8): 1321-1332.
- Hua J, Meyerowitz EM** (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94(2): 261-271.
- Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY** (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res* 29(1): 102-105.
- Hwang I, Sheen J** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413(6854): 383-389.
- Irish V, Sussex IM** (1992) A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* 115: 745-753.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M** (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of *SLENDER RICE1* in Nuclei. *Plant Cell* 14: 57-70.

**Jackson DP** (1991): *In situ* hybridisation in plants. In: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. D.J. Bowles, S.J.Gurr, and M.McPherson, eds. Oxford University Press, England.

**Jacobsen SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126(23): 5231-5243.

**James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4): 1425-1436.

**Keegan L, Gill G, Ptashne M** (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231(4739): 699-704.

**Khurana JP** (2001) Cryptic blues: Mechanism in sight! *Current Science* 80(2): 189-198.

**Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW** (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285: 1-24.

**Koncz C, Schell J** (1986). The promotor of T-L DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204:383-396.

**Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

**Lam BC-H, Sage TL, Bianchi F, Blumwald E** (2001) Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13(11): 2499-2512.

**Legrain P, Wojcik J, Gauthier J** (2001) Protein-protein interaction maps: A lead towards cellular functions. *Trends in Genetics* 17(6): 346-352.

**Lenhard M, Jürgens G, Laux T** (2002) The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* 129: 3195-3206.

**Li J, Chory J** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90(5): 929-938.

**Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S** (1994) A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6(12): 1859-1876.

**Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC** (2002) Endogenous and Silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14: 1605-1619.

**Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK** (1996) A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379(6560): 66-69.

**Long J, Barton MK** (2000) Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 218: 341-353.

**Lyndon RF** (1990) Plant Development. (*Topics in plant physiology; 3*) Unwin Hyman, London.

**Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK** (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* 126: 469-481.

**Malayer JC, Guard AT** (1964) A comparative developmental study of the mutant *sideshootless* and normal tomato plants. *Amer J Bot* 51: 140-143.

**Mapelli S, Kinet JM** (1992) Plant growth regulator and graft control of axillary bud formation and development in the TO-2 mutant tomato. *Plant Growth Regulation*. 11(4): 385-390.

**McConnell JR, Barton MK** (1995) Effect of mutations in the *PINHEAD* gene of *Arabidopsis* on the formation of shoot apical Meristem. *Dev Genet* 16: 358-366.

**McConnell JR, Barton MK** (1998) Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125: 2935-2942.

**McDaniel CN, Poethig RS** (1988) Cell lineage patterns in the shoot apical meristem of the germinating maize embryo. *Planta* 175: 13-22.

**Melcher K, Johnston SA** (1995) *GAL4* interacts with TAT-Binding Protein and Coactivators. *Mol Cell Biol* 15: 2839-2848.

**Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413(6853): 307-311.

**Napoli CA, Beveridge CA, Snowden KC** (1999) Reevaluation concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr Top Dev Biol* 44: 127-169.

**Napoli C** (1996) Highly branched phenotype of the *Petunia* *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiology* 111(1): 27-37.

**Nover L** (1994) Plant promoters and transcription factors. in *Results and Problems in Cell differentiation 20*, Springer, Berlin.

**Nuemberger T, Scheel D** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6(8): 372-379.

**Ogawa M, Kusano T, Katsumi M, Sano H** (2000) Rice gibberellin-insensitive gene homolog, *OsGAI*, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* 245: 21-29.

**Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE** (2001) *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* 25: 223-236.

**Owen DJ, Vallis Y, Noble ME, Hunter JB, Dafforn TR, Evans PR, McMahon HT** (1999) A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 97(6): 805-815.

**Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11(23): 3194-3205.

**Pluthero FG** (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 21 (20): 4850-4851.

**Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN** (1999) The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18(1): 111-119.

**Quail PH** (2002) Phytochrome photosensory signaling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(2): 85-93.

**Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K** (2001) bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* 13(2): 351-367.

**Richards DE, Peng J, Harberd NP** (2000) Plant *GRAS* and metazoan *STATs*: One family?. *Bioessays* 22(6): 573-577.

**Rossberg M, Theres K, Acarkan A, Herrero R, Schmitt T, Schumacher K, Schmitz G, Schmidt R** (2001) Comparative sequence analysis reveals extensive microlinearity in the Lateral Suppressor Regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* Genomes. *Plant Cell* 13: 979-988.

**Salchert K** (1997) Untersuchungen zur Funktion von PRL1 durch Identifizierung und Charakterisierung von PRL1-interagierenden Proteinen. *Dissertation, Universität zu Köln*.

**Sambrook J, Russell DW** (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Sargent TD** (1987) Isolation of differentially expressed genes. *Meth Enzymol* 152: 446-451.

**Schmitt T** (1999) Isolierung und Charakterisierung des *Lateral suppressor* Gens aus *Lycopersicon esculentum* M. *Dissertation, Universität zu Köln*.

**Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K** (2002) The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation on lateral Meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(2): 1064-1069.

**Schmitz G, Theres K** (1999) Genetic control of branching in *Arabidopsis* and tomato. *Curr Op Plant Bio* 2: 51-55.

**Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K** (1999) The *Lateral suppressor* (*Ls*) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 290-295.

**Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, Iwakawa H, Machida C, Machida Y** (2001) The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128: 1771-1783.

**Shuai B, Reynaga-Pena CG, Springer PS** (2002) The *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol* 129(2): 747-61.

- Silverstone AL, Jung H, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T** (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the *RGA* protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13(7): 1555-1565.
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T** (1998) The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10(2): 155-169.
- Silverstone AL, Mak PYA, Martinez EC, Sun T-P** (1997) The new *RGA* locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 10: 155-156.
- Small S, Blair A, Levine M** (1992) Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 11(11): 4047-4057.
- Soellick TR, Uhrig JF.** (2001) Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biol* 2(12):RESEARCH0052.
- Sossountzov L, Maldiney R, Sotta B, Sabbagh I, Habricot Y, Bonnet M, Miginiac E** (1988) Immunocytochemical localization of cytokinins in *Craigella* tomato and a sideshootless mutant. *Planta* 175: 291-304.
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R** (1996) The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85(2): 159-70.
- Stimberg P, van De Sande K, Leyser HM** (2002) *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129(5):1131-41.
- Stimberg P, Chatfield SP, Leyser HMO** (1999) *AXR1* acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 121(3): 839-847.
- Steeves TA, Sussex IM** (1989) Patterns in Plant Development. 2<sup>nd</sup> edition, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Stuurman J, Jäggi F, Kuhlemeier C** (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev* 16: 2213-2218.
- Sussex IM, Kerk NM** (2001) The evolution of plant architecture. *Curr Opin in Plant Biology* 4: 33-37.
- Szymkowiak EJ, Sussex IM** (1993) Effect of *lateral suppressor* on petal initiation in tomato. *Plant J* 4(1): 1-7.
- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M.** (2001) The *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128(7): 1127-1135.
- Talbert PB, Adler HT, Paris DW, Comai L** (1995) The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121(9): 2723-2735.

**Tantikanjana T, Yong JWH, Letham DS, Griffith M Hussain M, Ljung K, Sandberg G Sundaesan V** (2001) Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the *SUPERSHOOT* gene. *Genes Dev* 15: 1577-1588.

**Taylor CB** (1997) Plant Vegetative Development: From Seed and Embryo to Shoot and Root. *Plant Cell* 9: 981-988.

**Taylor IB** (1979) The effect of the *Lateral suppressor* gene on seed germination in the tomato. *Euphytica* 28: 93-97.

**Tucker DJ** (1981) Axillary bud formation in 2 isogenic lines of tomato showing different degrees of apical dominance. *Annals of Botany* 48(6): 837-844.

**Tucker DJ** (1977) Hormonal regulation of lateral bud outgrowth in the tomato. *Plant Sci Lett* 8: 105-111.

**Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T** (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. [Article] *Plant & Cell Physiology* 42(2): 231-235.

**Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2001) Plant histidine kinases: an emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Sci STKE* 2001(109): RE18.

**Van Den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B** (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378(6552): 62-65.

**Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S** (1991) The developmental gene *Knotted1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350: 241-243.

**Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr.** (1995) Maximal activation of transcription of STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-250.

**Westhoff P, Jeske H, Jürgens G, Kloppstech K, Link G** (1996) Molekulare Entwicklungsbiologie. *Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag*.

**Williams RW** (1998) Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *Bioessays* 20: 280-282.

**Williams W** (1960) The effect of selection on the manifold expression of the 'suppressed lateral' gene in the tomato. *Heredity* 14: 285-296.

**Zhong R, Ye ZH** (1999) IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* 11(11): 2139-2152.

**Zhong R, Ye ZH** (2001) Alteration of auxin polar transport in the *Arabidopsis ifl1* mutants. *Plant Physiol* 126(2): 549-563.

**Ziemienowicz A** (2001) Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiologiae Plantarum*. 23(3): 363-374.

---

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

## 6. Erklärung

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

Köln, am 25. Januar 2003

(Thomas Greb)

Greb T, Schmitz G, Theres K (2002) Isolation and characterisation of the *Spindly* homologue from tomato. *Journal of Experimental Botany* 53: 1829-1830.

Greb T, Clarenz O, Mueller D, Herero R, Schäfer E, Schmitz G, Theres K (2003) Mutations in the *Arabidopsis* and tomato *Lateral suppressor* genes reveal a conserved control mechanism for lateral meristem formation in higher plants. (in Vorbereitung)

## 7. Zusammenfassung

Das Gen *LATERAL SUPPRESSOR* (*Ls/LAS*) ist entscheidend an der Seitentriebentwicklung in *Arabidopsis thaliana* und Tomate beteiligt. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch die Analyse der Funktion von *LAS* diesen molekular kaum charakterisierten Prozess besser zu verstehen. Zunächst erbrachte die Analyse des Expressionsmuster von *LAS* mittels RNA *in situ*-Hybridisierung Hinweise zu dessen Funktion. *LAS* wird in *Arabidopsis* und Tomate entlang der Achseln aller lateralen Organe des Hauptsprossmeristems exprimiert, dies gilt für Blatt- und Blütenprimordien. Zusätzlich konnte die Expression in den Achseln der Sepalen nachgewiesen werden. Die Expressionsdomäne von *LAS* markiert insofern Achselgewebe und kann zusammen mit weiteren auffallend ähnlich exprimierten Genen wie *CUC1*, *CUC2* und *LOB* deswegen als Achselidentitätsgen bezeichnet werden. Die spezielle Identität des Achselgewebes wird unmittelbar nach der Anlage des zugehörigen Blattprimordiums etabliert und schafft so die Voraussetzung für die Anlage von Seitentrieben. Möglicherweise wird Achselidentität zunächst durch dort überlappende Expressionsdomänen von meristem- bzw. blattspezifischen Transkriptionsfaktoren festgelegt. Da gezeigt werden konnte, dass sich laterale Meristeme aus *LAS*-exprimierenden Zellen entwickeln, besitzt *LAS* offenbar eine zellautonome Funktion. Die in älteren Blattachseln der *las*-Mutante fehlende Expression weiterer beteiligter Gene wie *REV* und *CUC1* zeigt, dass *LAS* an einem sehr frühen Schritt der Etablierung lateraler Meristeme beteiligt ist. Darüber hinaus ist die verlorengelungene *STM*-Expression in der *las*-Mutante ein Beleg dafür, dass *LAS* entscheidend für die Aufrechterhaltung meristematischer Identität in den Blattachseln ist. Der Befund, dass die *LAS*-Funktion durch die Expression von *STM* in den Blattachseln ersetzt werden kann, könnte zudem auf eine konkrete Funktion von *LAS* hinweisen, die in der positiven Regulation der *STM*-Transkription liegt.

Analysen des *Las*-Proteins mittels des Two-Hybrid-Systems erbrachten bestätigende Hinweise für die Hypothese von Richards et al. (2000), nach der *GRAS*-Proteine als Transkriptionsfaktoren nach ihrer Aktivierung mittels membranständiger Rezeptor-Kinasen fungieren. Dies macht eine Rolle von *LAS* als Vermittler einer von den Leitbündeln des Blattes ausgehenden positionellen Information möglich.

Zusammenfassend wird durch diese Arbeit eine Rolle von *LAS* in der Aufrechterhaltung des meristematischen Charakters im zentralen Bereich der Blattachseln während der vegetativen Wachstumsphase nahe gelegt. Die ermittelten Daten sprechen darüber hinaus für eine Etablierung lateraler Meristeme nach dem *detached meristem*-Konzept.

## 8. Abstract

The gene *LATERAL SUPPRESSOR* (*Ls/LAS*) is one of the key regulators of lateral shoot formation in *Arabidopsis* and tomato. The aim of this work was to obtain a better understanding of this process by analyzing the role of this important gene. RNA in situ-hybridisation experiments revealed a specific transcription of *Ls/LAS* in the axils of all lateral organs of the SAM, including leaf and flower primordia. In addition, the gene is also transcribed in the flower itself in the axils of sepals. Together with other genes as *CUC1*, *CUC2* and *LOB*, which show a similar expression, the *LAS* gene may be classified as an axil identity gene. Based on the expression patterns of these genes one can conclude that axil identity is established immediately after the formation of the corresponding leaf primordium and that it is a pre-requisite for lateral meristem formation. It is tempting to speculate that the identity of leaf axils is established by an overlap of specific transcription patterns of the SAM and the leaf primordia. Because it could be shown that lateral meristems are formed from *LAS* expressing cells one can conclude that *LAS* acts cell-autonomously. The analysis of the transcription patterns of *REV*, *CUC1* and *STM* showed that these genes are expressed in a small cell group in the centre of leaf axils and that this expression depends on the *LAS* function. This means that *LAS* is involved in an early step of meristem formation. The loss of *STM* transcript accumulation in the *las* mutant indicates that *LAS* is required for the establishment of meristematic identity in leaf axils. The observation that it is possible to replace the *LAS* function by expressing *STM* in leaf axils may be a hint that one important function of *LAS* is to activate of the *STM*-transcription.

The analysis of the function of the *Las* protein by the Yeast-Two-Hybrid system provided hints that are consistent with the hypothesis of Richards et al. (2000) who proposed that the function of *GRAS* proteins is similar to that of the *STATs* from animals. *STATs* serve as transcription factors after a phosphorylation by a ligand dependent receptor kinase. Based on these observations it becomes possible that *Las* mediates positional information arising from the vascular bundle of the subtending leaf to position the lateral meristem in the centre of the leaf axil.

In summary, the results of this work favor a role of *LAS* in the maintenance of the meristematic character of cells in leaf axils. Furthermore the results indicate a mechanism for lateral meristem formation in the sense of the *detached meristem* concept.

## 9. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Thomas Greb  
 Geburtstag und -ort: 08.01.1972 in Waldbröl  
 Familienstand: verheiratet, 3 Kinder  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

08/78 – 06/82 Grundschole Wiedenhof in Waldbröl  
 08/82 – 06/91 Hollenberg-Gymnasium in Waldbröl, Abschluss: Abitur

### Zivildienst

08/91 – 10/92 Zivildienst im St. Johannes-Hospital in Bonn  
 Tätigkeitsbereich: Krankenpflege

### Auslandsaufenthalt

02/93 – 08/93 Frankreichaufenthalt  
 Tätigkeit: Praktikum in einem landwirtschaftlichen Betrieb

### Hochschulausbildung

10/93 – 07/96 Grundstudium im Studiengang Diplombiologie an der Universität zu Köln  
 10/96 – 05/99 Hauptstudium im Studiengang Diplombiologie in Köln  
 Schwerpunkte: Genetik, Botanik, Biochemie  
 Diplomarbeit unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. Klaus Theres, Titel:  
 „Seitentriebbildung bei der Tomate – Charakterisierung von Genen und  
 Mutanten.“  
 06/99 – 01/03 Doktorarbeit an der Math.-Nat. Fakultät der Uni Köln, durchgeführt am  
 Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung unter Anleitung von Priv.  
 Doz. Dr. Klaus Theres in der Abteilung Pflanzenzüchtung und  
 Ertragsphysiologie von Prof. Francesco Salamini

### Praktika

08/96 Praktikum in der Biologischen Station Oberberg  
 08/97 Redaktionelles Praktikum in der Redaktion Gummersbach der  
 Oberbergischen Volkszeitung/Kölnischen Rundschau

### Außeruniversitäre Aktivitäten

01/98 – 01/03 Aktives Mitglied der Biotechnologischen Studenteninitiative (btS e.V.)  
 01/00 – 01/02 1. Vorsitzender der btS-Geschäftsstelle Köln