

---

**ISOLATION UND ANALYSE DER DOMINANTEN MUTATION**  
***DORNRÖSCHEN AUS ARABIDOPSIS THALIANA***

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

vorgelegt von  
Thomas Kirch  
aus Schleiden

Köln 2002

---

Berichterstatter:

**Prof. Dr. Wolfgang Werr**  
**Prof. Dr. Rüdiger Simon**

Tag der mündlichen Prüfung : 17.02.2003

---

*D*a stach sie sich in die Spindel und fiel alsbald in einen tiefen Schlaf.

Da auch in dem Augenblick der König und der Hofstaat zurückgekommen war, so fing alles im Schloß an zu schlafen, bis auf die Fliegen an den Wänden. Und um das ganze Schloß zog sich eine Dornenhecke, daß man nichts davon sah.

...

*W*ie der Prinz nun in das Schloss kam, küsste er die schlafende Prinzessin, und alles erwachte von dem Schlaf, und die zwei heirateten sich, und wenn sie nicht gestorben sind, so leben sie noch.

(aus: Dornröschen - Urfassung der Gebrüder Grimm, 1810)

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	I
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	IV
<b>I EINLEITUNG</b>	1
1. Das sprossapikale Meristem	1
1.1 Etablierung und Aufrechterhaltung des SAM	3
1.2 Kontrolle der Stammzellpopulation	5
1.3 Symmetrie der Organe	7
1.4 Phyllotaxis	8
2. Redundanz im Arabidopsisgenom	9
3. Zielsetzung der Arbeit	11
<b>II MATERIAL</b>	12
1. Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	12
2. Bakterien und Plasmide	12
3. Desoxyoligonukleotide	13
4. Pflanzenmaterial	15
5. Photographie, Mikroskopie, Computeranalysen und Bildbearbeitung	15
<b>III METHODEN</b>	16
1. Isolation und Analyse von Nukleinsäuren	16
1.1 Plasmid DNA	16
1.2 BAC DNA	16
1.3 DNA Sequenzierung	16
1.4 Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1.5 Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.6 Markierung von DNA-Sonden	17
1.7 Reinigung von DNA Fragmenten	17
1.8 <i>Southern</i> Analysen	17
1.9 <i>Northern</i> Analysen	18
1.10 5' und 3' <i>RACE</i> ( <i>rapid amplification of cDNA ends</i> )	18
1.11 Isolation flankierender genomischer DNA durch inverse PCR	18
2. Konstrukte	19
2.1 Herstellung des TAMARA Konstrukts	19
2.2 35S:: <i>DRN</i>	20

2.3 35S:: <i>DRN-GR</i>	20
2.4 35S:: <i>DRN-LIKE</i>	20
2.5 DRN:: <i>GUS</i>	20
2.6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelter Gentransfer	21
3. Anbau von Pflanzen	21
3.1 Anzucht	21
3.2 Selektionierung	21
4. Histologische Techniken	22
4.1 Nicht-radioaktive RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	22
4.2 $\beta$ -Glucuronidase Färbung von Promoter GUS Linien	22
4.3 Delafield Färbung	23
<b>IV ERGEBNISSE</b>	24
1. TAMARA: <u>T</u> ransposon mediated <u>A</u> ctivation tagging <u>M</u> utagenesis in <i>ARAbidopsis</i>	24
1.1 Grundlagen des TAMARA Systems	24
1.1.1 TAMARA Konstrukt	24
1.1.2 Arbeitsweise des Systems	25
1.1.3 Amplifikation der TAMARA Starterlinien	26
1.2 Aufbau der TAMARA Population	27
1.3 Frequenz und Unabhängigkeit der Transpositionereignisse	28
1.4 Dominante Mutationen	31
1.4.1 <i>Pistillata-ID</i>	32
1.4.2 <i>Spätzünder-ID</i>	34
1.4.3 <i>Lollo-ID</i>	38
1.4.4 <i>Wirbel-ID</i> und <i>Shrubby-ID</i>	41
2. DORNRÖSCHEN	43
2.1 Phänotyp der <i>Dornröschen-ID</i> Mutation	43
2.2 Analyse des <i>Dornröschen-ID</i> Allels	46
2.3 <i>DORNRÖSCHEN</i> Gen- und Proteinstruktur	48
2.4 <i>DORNRÖSCHEN</i> Funktionsverlustallel	51
2.5 Zelluläres Expressionsmuster von <i>DORNRÖSCHEN</i>	53
2.6 Neuorganisation des SAM in <i>Dornröschen-ID</i>	57
2.7 <i>DORNRÖSCHEN</i> Überexpressionsstudien	60
2.8 <i>Dornröschen-ID</i> im mutanten Hintergrund	64

---

<b>V DISKUSSION</b>	67
1. TAMARA	67
1.1 Analyse des TAMARA Systems	67
1.2 Das TAMARA System im Vergleich	70
1.3 Analyse dominanter Mutationen	72
1.3.1 <i>Pistillata-ID</i>	72
1.3.2 <i>Lollo-ID</i>	74
1.3.3 <i>Spätzünder-ID</i>	75
2. DORNRÖSCHEN	77
2.1 Struktur und Phylogenie	77
2.2 <i>DRN</i> Expressionsmuster im Wildtyp	80
2.3 Konsequenzen der Fehlexpression und biologische Aufgaben von <i>DRN</i>	82
2.3.1 Vergleich ektopischer und konstitutiver Expression	83
2.3.2 <i>DRN</i> beeinflusst die Regulation von Schlüsselgenen des SAM	84
2.3.3 Einfluss von <i>DRN</i> auf die laterale Organentwicklung	86
2.3.4 <i>DRN</i> als " <i>Enhancer of Shoot Regeneration</i> " ?	87
3. Ausblick	89
<b>VI ZUSAMMENFASSUNG</b>	90
<b>VII KURZZUSAMMENFASSUNG</b>	91
<b>VIII LITERATURVERZEICHNIS</b>	92
<b>IX ANHANG</b>	105

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäuren
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAC	'Bacterial Artificial Chromosome'
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
<i>Col-0</i>	Ecotyp Columbia 0
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
dag	Tage nach Keimung
Dex	Dexamethason
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dSpm	defektes Spm Element
DS	doppelt selektiert
<i>dTAM</i>	defektes 'TAMARA' Element
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
GFP	'Green Fluorescent Protein'
GUS	$\beta$ -Glukuronidase
h	Stunde
kB	Kilobasenpaare
KT	Kurztag
Ler	Ecotyp Landsberg erecta
LT	Langtag
Mb	Megabasenpaare
MeOH	Methanol
Min	Minute
MW	Molekulargewicht
mRNA	'messenger' Ribonukleinsäure
NLS	'Nuclear Localization Signal'
<i>Nt</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PCR	'polymerase chain reaction'
RACE	'Rapid Amplification of cDNA'
RFDD	'Restriction Fragment Differential Display'
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
SAM	Sprossapikalmeristem
Sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrate
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Actat/EDTA Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA Puffer
TE	Tris/EDTA Puffer
U	'Unit'
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -galaktosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -glukuronsäure
YAC	'Yeast Artificial Chromosome'

# I EINLEITUNG

Eines der wichtigsten äußeren Merkmale, das Pflanzen von Tieren unterscheidet ist die sessile Lebensweise der Pflanzen. Die Flexibilität sich an verändernde äußere Umweltbedingungen wie Licht, Trockenheit oder Nährstoffangebot anzupassen, gelingt dem pflanzlichen Organismus, indem Organe und Gewebe im Gegensatz zu Tieren zumeist erst postembryonal und über den gesamten Lebenszyklus hinweg durch apikale Meristeme gebildet werden. Hierzu enthalten apikale Meristeme eine kleine Gruppe undifferenzierter und sich nur langsam teilender Stammzellen, die einerseits Zellen zur Differenzierung abgeben und andererseits den eigenen Vorrat an Stammzellen aufrechterhalten.

## 1. Das sprossapikale Meristem

In Angiospermen besitzt das sprossapikale Meristem (SAM) ein hügelartiges Aussehen und erscheint äußerlich homogen. Histologische und morphologische Analysen zeigen jedoch, dass das SAM eine hohe Organisation besitzt. Bereits während der Embryogenese wird das SAM strukturell organisiert, indem äußere Tunicaschichten und ein innerer Corpus angelegt werden. In *Arabidopsis thaliana* und den meisten anderen dikotylen Pflanzen besteht die Tunica aus der L1 Schicht und der darunter liegenden L2 Schicht, während die L3 Schicht und darunter liegenden Zellschichten als Corpus bezeichnet werden (Steeves und Sussex, 1989). Die morphologische Aufteilung des SAM in Tunica und Corpus basiert darauf, dass die L1, L2 und L3 Schicht sich in unterschiedlichen Ebenen teilen und klonal sind (Satina *et al.*, 1940; Poethig, 1987): Während die Zellen der L1 Schicht sich nur antiklin teilen, zeigen die Zellen der L2 Schicht zu späten Zeitpunkten der Entwicklung wie der Organbildung neben antiklinen auch perikline Zellteilungen. Zellen des Corpus besitzen keine Präferenz für eine Zellteilungsebene und teilen sich ungerichtet anti- und periklin.

Zusätzlich unterscheiden sich die Zellen verschiedener Schichten darin, dass sie hinsichtlich ihres Zellschicksals unterschiedlich determiniert sind. In Untersuchungen an Chimären konnte gezeigt werden, dass Zellen, die der L1 Schicht entstammen, stets zu Epidermiszellen differenzieren. Aus Zellen der L2 Schichten wird das Mesophyll aufgebaut und nur aus Zellen dieser Zellschicht werden in der Ovulenentwicklung Gameten gebildet. Aus Zellen der L3 Schicht entsteht schließlich das Grundgewebe und das vaskuläre System (Dermen, 1953; Tilney-Bassett, 1986).

Neben dieser strukturellen Gliederung wird für das SAM eine funktionelle Organisation in Zonen angenommen, die sich in unterschiedlichen Zellteilungsraten widerspiegelt, und die mit den Aufgaben des SAM in Übereinstimmung steht (Lyndon und Cunnigham, 1986; Steeves und Sussex, 1989; Sussex, 1989; Laufs *et al.*, 1998):

Eine zentrale Zone von Zellen mit einer geringen Zellteilungsrate befindet sich an der äußersten Sprossspitze und entspricht wahrscheinlich der Stammzellpopulation. Die zentrale Zone wird von einer peripheren Zone umgeben, die aus Zellen besteht, die sich zügig teilen und mit der Differenzierung beginnen. Hierbei werden in regelmäßigen Abständen Primordien initiiert, die sekundäre Meristeme wie Blütenmeristeme bilden oder zu lateralen Organen differenzieren. Die unterhalb der zentralen und peripheren Zone gelegene Markzone formt das Grundgewebe des Sprosses.

Die funktionelle Organisation des SAM verdeutlicht, dass alle Zelllagen innerhalb des SAM an den Prozessen von Sprosswachstum und Organbildung beteiligt sind. Daher sind Kommunikation und Stoffaustausch zwischen den Zellschichten des SAM trotz des klonalen Ursprungs eine Voraussetzung für kontrolliertes Wachstum und die Integration von Signalen außerhalb des SAM. Für eine Reihe von Faktoren innerhalb des SAM wird angenommen, dass sie zwischen verschiedenen Zellen und Schichten des SAM ausgetauscht werden (Perbal *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Sessions *et al.*, 2000). Als Konsequenz zur Perzeption der Tageslänge in den Blättern wandelt sich beispielsweise das vegetative SAM zum Infloreszenzmeristem um, und die Pflanze tritt in die reproduktive Phase ein (Bernier, 1988). Die Bedeutung eines gerichteten Transports in das SAM konnte für RNA durch Pfropfungsexperimente in Tomate eindrucksvoll belegt werden (Kim *et al.*, 2001). Neben vaskulärem Gewebe werden zum Molekültransport insbesondere Plasmodesmata benutzt (Mezitt und Lucas, 1996). Durch Injektionsexperimente mit diffusiblen Nachweismolekülen konnte gezeigt werden, dass die Zellen des SAM intensiv über Plasmodesmata miteinander verknüpft sind (Gisel *et al.*, 1999). Untersuchungen an der Tunica des Sprossmeristems von Birken weisen sogar darauf hin, dass das SAM in zwei symplastischen Feldern organisiert ist, die der zentralen und peripheren Zone im Zonierungsmodell entsprechen (Rinne und van der Schoot, 1998). Die Bedeutung solcher symplastischer Felder könnte darin bestehen, dass eine physikalische Kompartimentierung des SAM die Ausbildung von Gradienten von Signalmolekülen unterstützt und zum hohen Organisationsgrad der Meristeme beiträgt.

## 1.1. Etablierung und Aufrechterhaltung des SAM

Die apikalen Meristeme werden während der frühen Embryogenese an gegenüberliegenden Enden der apikal-basalen Achse als Wurzel- und Sprossapikalmeristem angelegt. Das Wurzelmeristem wird zu Beginn des Herzstadiums sichtbar und wird aus Zellen des Proembryos und der oberen Zelle des Suspensors gebildet (Scheres *et al.*, 1994). Das embryonale SAM ist im Vergleich dazu erst im späten Herzstadium als Tunica-Corpus Struktur zu erkennen und besteht aus wenigen cytoplasmareichen Zellen zwischen den Kotyledonen (Barton und Poethig, 1993). Durch Untersuchungen von Funktionsverlustmutationen und Expressionsanalysen von Markergenen konnte jedoch gezeigt werden, dass das SAM in *Arabidopsis thaliana* bereits zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der apikalen Hälfte des globulären Embryos gebildet wird.

Das Gen *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* kodiert einen potentiellen Transkriptionsfaktor der Homöobox Klasse (Long *et al.*, 1996) und zählt aufgrund seiner hohen Sequenzverwandtschaft zu *KNOTTED1* aus Mais zur Gruppe der KNOX Faktoren (KNOTTED1 like HOMÖOBOX). Der Funktionsverlust von *STM* führt in starken Allelen dazu, dass kein embryonales SAM angelegt wird (Barton und Poethig, 1993). Daher wird angenommen, dass *STM* zur Etablierung des SAM notwendig ist. In schwachen Verlustallelen von *STM* wird zwar embryonal ein SAM gebildet, nach der Keimung stellt es jedoch nach Anlage weniger Blätter seine Aktivität ein. Demnach ist *STM* im Wildtyp nicht nur essentiell für die Bildung des SAM, sondern wird auch dazu benötigt, um die Funktion des SAM zu erhalten (Endrizzi *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996). Die für das *STM* Gen angenommene Funktion deckt sich mit seinem Expressionsmuster während der Embryogenese. Die Expression von *STM* beginnt in ein bis zwei Zellen des globulären Embryos und dehnt sich im frühen Herzstadium zu einem schmalen Streifen zwischen den Primordien der Kotyledonen aus. In späten Stadien der Embryogenese wie dem Torpedo- oder *Walking-Stick* Stadium konzentriert sich die *STM* Expression zunehmend auf zentrale Bereiche des embryonalen SAM, und in den Anlagen der ersten Blätter wird kein *STM* Transkript detektiert (Long und Barton, 1998). Nach der Keimung wird *STM* im gesamten SAM mit Ausnahme der Organprimordien und der sich entwickelnden Blätter exprimiert (Long *et al.*, 1996; Long und Barton, 2000). Da *STM* demnach in differenzierenden Zellen herunterreguliert wird, wird angenommen, dass *STM* undifferenzierte Zellen des SAM markiert und für den Erhalt des meristematischen Zustands benötigt wird (Long *et al.*, 1996).

Analysen des organspezifischen Myb Gens *ASYMMETRIC LEAVES1* (*ASI*) weisen zudem darauf hin, dass Meristemaktivität und Organbildung, gemeinsam und voneinander abhängig reguliert werden (Byrne *et al.*, 2000). In der Funktionsverlustmutation *as1* sind Blatt- und Blütenorgane stark gelappt und ausgebuchtet, und an der Blattoberseite werden gelegentlich ektopische Meristeme gebildet. Im Wildtyp wird *ASI* nur in Organprimordien und jungen Blättern exprimiert. Da *ASI* im Funktionsverlustallel *stm-1* auch im Zentrum des SAM transkribiert wird, wird *ASI* im Meristem vermutlich durch *STM* negativ reguliert. Zwar wird in *as1* Pflanzen *STM* wie im Wildtyp exprimiert, jedoch dehnen sich die Expressionsdomänen der *KNOX* Gene *KNAT1* und *KNAT2* in *as1* in die Blätter aus. Da *KNAT1* und *KNAT2* im Wildtyp ein zu *STM* verwandtes Expressionsmuster besitzen und in Organprimordien nicht exprimiert werden (Lincoln *et al.*, 1994; Serikawa *et al.*, 1996), wird vermutet, dass die Fehlexpression von *KNAT1* und *KNAT2* in *as1* für den Phänotyp verantwortlich ist und *KNAT1* und *KNAT2* im Wildtyp durch *ASI* in Organprimordien reprimiert werden (Byrne *et al.*, 2000).

Einen zu *stm* verwandten Phänotyp zeigt die *wus* (*WUSCHEL*) Mutante, in der kein funktionelles SAM gebildet wird, da das embryonale SAM abgeflacht ist und keine wildtypische Strukturierung besitzt (Laux *et al.*, 1996). Daher wird angenommen, dass auch *WUS* für die Etablierung des SAM essentiell ist. Postembryonal zeigen *wus* Keimlinge nach Anlage von ein bis zwei Blättern eine vorzeitige Termination der Meristemaktivität, wobei die Zellen des SAM vergrößert und differenziert erscheinen (Laux *et al.*, 1996). Häufig werden in der *wus* Mutante durch sekundäre Meristemaktivität weitere Sprosse ausgebildet, die jedoch ebenso terminieren wie das primäre SAM und charakteristische Luftrosetten formen. *WUS* kodiert wie *STM* für einen putativen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, besitzt jedoch außerhalb der Homöodomäne keine signifikante Ähnlichkeit zu *STM* (Mayer *et al.*, 1998). Die *WUS* Expression beginnt sehr früh innerhalb der Embryogenese in ein bis zwei subepidermalen Zellen im apikalen Bereich des 16-Zell Stadiums. Im Herzstadium wird das *WUS* Transkript in wenigen zentralen Zellen der L3 Schicht des embryonalen SAM detektiert. Auch nach der Keimung wird *WUS* zentral in wenigen Zellen des SAM, jedoch unterhalb der L3 Schicht exprimiert. Kreuzungsanalysen zwischen *wus* und *stm* Mutanten zeigen, dass *WUS* und *STM* wahrscheinlich an voneinander unabhängigen Signalwegen beteiligt sind, obwohl ihr Funktionsverlust in ähnlichen Phänotypen resultiert (Endrizzi *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998).

Es wird daher angenommen, dass die wildtypische Funktion von *WUS* darin besteht den Differenzierungsprozess zu unterdrücken, indem die undeterminierte Stammzellpopulation im Zentrum des SAM durch *WUS* positiv reguliert und aufrechterhalten wird (Mayer *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000).

## 1.2. Kontrolle der Stammzellpopulation

Eine Schlüsselfunktion des SAM besteht darin, dass eine Population sich langsam teilender Stammzellen im Zentrum einerseits Zellen zur Differenzierung an die periphere Zone abgibt und sich andererseits die Stammzellpopulation selbst erhält. Um Wachstum und kontinuierliche Organbildung zu garantieren, wird die Teilungsrate und Größe der Stammzellpopulation im Vergleich zur Größe der peripheren Zone strikt reguliert. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann zum Verlust der Meristemaktivität oder zu einer Vergrößerung des SAM führen.

In der Verlustmutation des *CLAVATA1* (*CLV1*) Gens sind das vegetative und Infloreszenzmeristem, sowie florale Meristeme stark vergrößert. In *clv1* Pflanzen wird eine erhöhte Anzahl von Blütenorganen angelegt, da die Stammzellpopulation wesentlich mehr Zellen enthält und der Umfang der peripheren Zone vergrößert ist (Clark *et al.*, 1993; Laufs *et al.*, 1998). In starken Allelen wird eine Fasziation des Sprosses und eine Proliferation des SAM beobachtet. Mutationen in *CLAVATA3* (*CLV3*) führen zu ähnlichen Defekten wie *clv1*, und Kreuzungsanalysen zwischen *clv1* und *clv3* zeigen, dass beide Gene im gleichen Signalweg agieren (Clark *et al.*, 1995). Die *clv2* Mutation zeigt einen schwächeren Phänotyp als *clv1* und *clv3*, und Kreuzungen belegen, dass *CLV1* und *CLV3* epistatisch gegenüber *CLV2* sind. Da die *clv2* Mutation im Vergleich zu *clv1* und *clv3* einen pleiotropen Phänotyp aufweist und zusätzliche Defekte in der Entwicklung des Gynoceums und des Pedicels von Blüten zeigt, wird angenommen, dass *CLV2* zusätzliche Funktionen in der Blütenentwicklung besitzt (Kayes und Clark, 1998).

*CLV1* kodiert für eine putative Rezeptor-Kinase mit einer extrazellulären Leucin-reichen Rezeptor Domäne und einer intrazellulären Serin/Threonin Kinase Region, und wird zentral in der L3 Schicht des SAM exprimiert (Clark *et al.*, 1997; Fletcher *et al.*, 1999). Während der Embryogenese beginnt die *CLV1* Expression im frühen Herzstadium (Long und Barton, 1998). *CLV2* wird in allen Geweben exprimiert und stellt ein zu *CLV1* verwandtes Protein dar, dem jedoch eine Kinase Domäne fehlt (Jeong *et al.*, 1999). Daher bildet *CLV2* möglicherweise zusammen mit *CLV1* einen membran-assoziierten Komplex. *CLV3* wiederum kodiert für ein sekretorisches Ligandenprotein und formt wahrscheinlich gemeinsam mit *CLV1* und *CLV2* ein Liganden-Rezeptor Komplex (Fletcher *et al.*, 1999). Die Expression von *CLV3* überlappt teilweise mit *CLV1*, beschränkt sich aber auf wenige apikale Zellen der zentralen Zone vorwiegend der L1 und L2 Schicht und beginnt wie *CLV1* im Herzstadium der Embryogenese (Fletcher *et al.*, 1999).

Da der Funktionsverlust der einzelnen *CLAVATA* Gene zu einer Vergrößerung der zentralen Zone des SAM und vermehrter Organzahl in der Blüte führt, wird vermutet, dass der *CLAVATA* Signalweg die Grösse der zentrale Zone und der Stammzellpopulation limitiert (Clark *et al.*, 1997; Fletcher *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die *CLAVATA* Gene hierzu in Abhängigkeit von *CLV3* die Expression von *WUS* reprimieren und antagonistisch zu *WUS* agieren (Brand *et al.*, 2000). Die konstitutive Überexpression von *CLV3* resultiert in einem zu *wus* identischen Phänotyp und *CLV3* aktiviert als sekretorisches Protein dosisabhängig den *CLV1/CLV2* Komplex (Brand *et al.*, 2000; Trotochaud *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2002). Umgekehrt zeigen Pflanzen, die *WUS* überexprimieren den *clavata* Phänotyp und *WUS* fördert das Stammzellschicksal, da *CLV3* durch *WUS* positiv reguliert wird (Schoof *et al.*, 2000). Durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen *CLV3* und *WUS* wird die Grösse der Stammzellpopulation in der zentralen Zone autoreguliert und konstant gehalten. Aufgrund seines Expressionsmusters wird daher angenommen, dass die Expressionsdomäne von *CLV3* in wenigen apikalen Zellen der zentralen Zone des SAM weitgehend mit der Stammzellpopulation übereinstimmt. Hierbei ist von Bedeutung, dass die Expressionsdomänen von *WUS* und *CLV3* nicht überlappen, um eine Repression von *WUS* unterhalb der L3 Schicht zu verhindern und dort *WUS* Aktivität erhalten. Zwar agiert *CLV3* nicht zell-autonom und ist extrazellulär lokalisiert, es wird jedoch angenommen, dass alle vorhandenen *CLV3* Ligandenmoleküle in der L3 Schicht im Komplex mit *CLV1* gebunden werden können (Brand *et al.*, 2000; Trotochaud *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2002).

### 1.3. Symmetrie der Organe

Die Blattober- und -unterseiten der Blätter sind spezialisierte Gewebe und besitzen unterschiedliche Funktionen: Während die abaxiale Blattunterseite für den Gasaustausch spezialisiert ist, besitzt die Blattoberseite ihre wichtigste Funktion in der Photosynthese. Bereits in der Anlage der Organe wird die ad-/abaxiale Symmetrie als Muster festgelegt.

In der *phantastica* (*phan*) Mutation aus *Antirrhinum* verlieren die Blätter und Blütenorgane ihre Polarität (Waites und Hudson, 1995). Die veränderten Organe sind radialisiert und zeigen insgesamt abaxialisierte Merkmale. Daher wird angenommen, dass *PHAN* adaxiale Identität vermittelt. *PHAN* kodiert einen zu *ASI* aus *Arabidopsis* hochverwandten Transkriptionsfaktor der Myb Familie, wird in den lateralen Organprimordien exprimiert, und zeigt daher ein zu Homöobox Faktoren der *KNOTTED1* Klasse wie *STM* komplementäres Expressionsmuster (Waites *et al.*, 1998; Byrne *et al.*, 2000). In *phan* Pflanzen mit einem starken Phänotyp wird zudem ein Verlust der Meristemaktivität des SAM beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die adaxiale Identität für die Meristemfunktion benötigt wird.

Im Gegensatz zur *phan* Mutation zeigen die dominanten Mutationen *phabulosa* (*phb-1d*) und *phavoluta* (*phv-1D*) neben einer Radialisierung eine Adaxialisierung der Blätter (McConnell und Barton, 1998; McConnell *et al.*, 2001). Da zudem an der Blattbasis ringförmig ektopische Meristeme angelegt werden, wird durch diese Mutationen angedeutet, dass die Adaxialisierung meristematische Aktivität fördert. *PHB* und *PHV* sind Homöodomänen Leucin-Zipper Proteine und besitzen als zusätzliches Strukturmotiv die START Domäne, die mutmaßlich Sterol/Lipid Liganden bindet (Ponting und Aravind, 1999). Mutationen innerhalb dieser Domäne führen in *phb-1D* und *phv-1D* wahrscheinlich zu einer liganden-unabhängigen konstitutiven Aktivierung und zum semidominanten Phänotyp. *PHB/PHV* zeigen ein identisches Expressionsmuster, das sich sternförmig von der zentralen Zone in die jüngsten Organanlagen ausdehnt. In späteren Stadien der Primordienentwicklung wird das *PHB/PHV* Transkript nur adaxial detektiert.

Ein weitere Klasse von Genen, die zur Symmetrie der Organe beitragen, sind die *YABBY* Gene: Untersuchungen von Funktionsverlustmutationen und Überexpressionsstudien zeigen, dass die mutmaßliche Funktion der *YABBY* Faktoren darin besteht abaxiales Zellschicksal festzulegen (Eshed *et al.*, 1999; Siegfried *et al.*, 1999; Bowman, 2000). Jüngste Untersuchungen an weisen darauf hin, dass sie auch an der Regulation von *KNOX* Genen beteiligt sein könnten (Kumaran *et al.*, 2002).

## 1.4. Phyllotaxis

Die Anordnung der Organe entlang der Hauptachse wird als Phyllotaxis bezeichnet. Es gibt unterschiedliche Muster, nach denen die Organe in der peripheren Zone des Meristems angelegt werden. Bei wirteliger Phyllotaxis werden an einem Nodium mehr als ein Organ gebildet, während bei der wirbeligen Anordnung einem Knoten nur ein Organ aufsitzt. Im Sonderfall der Distichie stehen sich die Blätter in zwei Reihen abwechselnd gegenüber. In *Arabidopsis* werden die Blätter nach einem spiraligen Muster angelegt, bei dem der Winkel der einzelnen Primordien  $137,5^\circ$  beträgt. Grundsätzlich wird angenommen, dass das regelmäßige phyllotaktische Muster darauf basiert, dass die Position eines neuen Primordiums durch die Positionen bereits bestehender Primordien festgelegt wird.

In diesem Zusammenhang existieren zwei unterschiedliche Modelle wie Phyllotaxis entsteht und kontrolliert wird: Nach der Hypothese "Inhibierender Felder" geht von einem Primordium ein inhibierendes Signal aus, das die Initiation eines neuen Organs in der unmittelbaren Nachbarschaft verhindert (Richards, 1951). Erst mit zunehmender Distanz kann ein neues Organ angelegt werden. Für diese Vorstellung sprechen mikrochirurgische Experimente, in denen nach Entfernen eines Primordiums zwar das anschließende Primordium an der erwarteten Position gebildet wird, die darauf folgenden Primordien jedoch näher an die Position des fehlenden Primordiums heranrücken (Snow und Snow, 1931; Snow und Snow, 1933). Eine zentrale Rolle bei der Organinitiation scheint Auxin zu besitzen, wie Untersuchungen von (Reinhardt *et al.*, 2000) verdeutlichen. In diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass nach Applikation von spezifischen Auxin-Transportinhibitoren auf die Apices von Tomate keine weiteren Blätter gebildet werden, und der weiter auswachsende Spross fingerförmig und blattlos wie in der Funktionsverlustmutatation des putativen Auxin-Transporters *PINI* erscheint (Gälweiler *et al.*, 1998). Wird Auxin sehr lokal auf die mutmaßliche periphere Zone des SAM von *pin1* Pflanzen oder der zuvor behandelten Apices aufgetragen, werden erneut Blüten oder Blätter gebildet. Daher könnte eine lokal hohe Auxinkonzentration ein Signal zur Organbildung darstellen. Nach dem alternativen "biophysikalischen" Modell wird das phyllotaktische Muster durch mechanischen Spannungsstress der existierenden Blätter und Primordien über die äußeren Zellschichten des SAM festgelegt und kontrolliert (Green *et al.*, 1996; Selker *et al.*, 1992).

Leider sind keine Funktionsverlustmutationen bekannt, in denen sich der mutante Phänotyp nur auf die Phyllotaxis beschränkt. Lediglich die *aphyll1* Mutation aus Mais zeigt eine Transformation einer wechselständigen Phyllotaxis zur dekussierten Beblätterung (Hake und Jackson, 1995; Jackson und Hake, 1999). Interessanterweise ist in der *abphyll1* Mutante zusätzlich das SAM vergrößert. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass die Größe des Meristems oder der Primordien die Phyllotaxis beeinflusst (Kerstetter und Hake, 1997). Insgesamt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Phyllotaxis lediglich das Resultat der Primordienbildung ist, und keiner spezifischen Kontrolle unterliegt.

## 2. Redundanz im Arabidopsisgenom

Insgesamt besitzt das Arabidopsisgenom eine ungefähre Größe von 125 Mb und kodiert bei einer durchschnittlichen Gendichte von einem Gen in 4,5 Kb Sequenz eine prognostizierte Anzahl von ungefähr 25500 putativen Proteinen (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

30% dieser angenommenen Proteine sind jedoch völlig unbekannt, da sie keinerlei Ähnlichkeit zu isolierten Sequenzen aus anderen Pflanzen besitzen, oder nicht zu Proteinen aus anderen Organismengruppen verwandt sind. Ein globaler Vergleich der vorhergesagten Proteine aus *Arabidopsis* mit Proteinen anderer Spezies wie *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Drosophila melanogaster* zeigt, dass jeweils ungefähr 11000 bis 13000 Genfamilien anwesend sind. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass diese Anzahl das Minimum an Faktoren für eukaryotische Organismen darstellen könnte. Interessanterweise besitzen sowohl *C. elegans* als auch *Drosophila* mit 19000 und 14000 Genen insgesamt eine geringere Anzahl angenommener Gene als *Arabidopsis* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Adams *et al.*, 2000). Hierin kommt möglicherweise zu Ausdruck, dass Pflanzen aufgrund ihrer autotrophen Lebensweise einen komplexeren Sekundärstoffwechsel besitzen und Photosynthese betreiben (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Andererseits ist in Pflanzen Polyploidisierung verbreiteter ist als in anderen Organismengruppen (Gale und Devos, 1998; Lee und Chen, 2001), und die Genfamilien aus *Arabidopsis* enthalten häufig ein größere Anzahl von Mitgliedern als in *C. elegans* oder *Drosophila* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Die Existenz großer Genfamilien läßt sich darauf zurückführen, dass eukaryotische Gene oft in Duplikationen vorliegen oder aus Duplikationen hervorgegangen sind. Obwohl *Arabidopsis thaliana* unter den Angiospermen eines der kleinsten Genome mit nur fünf haploiden Chromosomen besitzt (Petrov, 2001), wird angenommen, dass das gesamte Arabidopsisgenom einmal dupliziert wurde, gefolgt von Genverlusten und vielfachen lokalen Duplikationen und chromosomalen Rearrangements (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Einige chromosomale Regionen liegen mehrfach vor, und duplizierte Abschnitte sind häufig in Clustern als Tandem-Wiederholungen angeordnet (Ku *et al.*, 2000). Nach vorsichtiger Schätzung sind 60 % der Arabidopsisgene dupliziert (Blanc *et al.*, 2000).

Eine der wichtigsten Methoden zur Isolation unbekannter Gene und anschließender Funktionsanalyse ist die Mutagenese zur Erzeugung rezessiver Funktionsverlustmutationen. Häufig ist der Verlust eines Gens jedoch nicht mit einem sichtbaren Phänotyp verbunden. Es wird angenommen, dass mehr als 60 % aller Gene aus *Drosophila*, *C. elegans* und Hefe wahrscheinlich keine erkennbaren Phänotyp zeigen, wenn sie zerstört werden (Miklos und Rubin, 1996). Analysen von Insertionsmutagenesen in *Arabidopsis* zeigen, dass nur ein geringer Anteil der Insertionen von weniger als 2 % morphologische Veränderungen hervorrufen (Krysan *et al.*, 1996; Meissner *et al.*, 1999; Bouche und Bouchez, 2001; Winkler *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen lassen sich wahrscheinlich zum großen Teil auf genetische Redundanz zurückführen, obwohl Hinweise vorliegen, dass Funktionsverlustmutationen, die unter Standardbedingungen keinen Phänotyp zeigen, unter speziellen Bedingungen erkennbar sein können (Hirsch *et al.*, 1998; Thatcher *et al.*, 1998; Gilliland *et al.*, 1998; Beh *et al.*, 2001).

Eine Alternative zur klassischen Mutagenese ist daher die Erzeugung dominanter Funktionsgewinnmutationen. Zur Aktivierungsmutagenese in Pflanzen wird zumeist eine Kombination von T-DNA und Enhancersequenzen oder konstitutiven Promotoren benutzt (Weigel *et al.*, 2000). Die Etablierung eines Aktivierungsmutagenesesystems, in dem Enhancersequenzen in transponierbaren Elementen verwendet werden, ist ein Gegenstand dieser Arbeit.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation bislang unbekannter Gene, die die Funktionsweise des SAM beeinflussen. Dazu wurde zunächst ein Transposon-vermitteltes Mutagenesesystem (TAMARA) in *Arabidopsis thaliana* etabliert, um dominante Mutationen zu erzeugen.

Als Schwerpunkt der Arbeit wurde eine der isolierten dominanten Mutationen im Detail analysiert: Für die *Dornröschen-ID* Mutation wurde das betroffene Gen isoliert und sein wildtypisches Expressionsmuster bestimmt. Um die Konsequenzen der Überexpression zu untersuchen, wurde die *Dornröschen-ID* Mutation mit Hilfe von Markergenenlinien näher charakterisiert. In Kreuzungsanalysen wurde überprüft, ob der dominante Phänotyp von Signalwegen essentieller Regulatoren des Meristems abhängig ist.

## II MATERIAL

### 1. Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Sofern nicht anders beschrieben wurden die verwendeten Laborchemikalien im Reinheitsgrad *pro analysis* von den Firmen *Ambion* (Austin, USA), *Amersham Life Science* (Braunschweig), (*Biomol* (Hamburg), *Biorad* (München), *Biozym* (Oldendorf), *Duchefa* (NL), *Fluka* (Neu-Ulm), *Höchst* (Mannheim), *Invitrogen* (Karlsruhe), *Life Technologies* (Karlsruhe), *Merck* (Darmstadt), *Perking Elmer* (Weiterstadt), *Pharmacia* (Freiburg), *Promega* (Heidelberg), *Roche* (Mannheim), *Roth* (Karlsruhe), *Serva* (Heidelberg), *Sigma* (Deisenhofen) und *Stratagene* (Heidelberg) bezogen. Das experimentelle Proherbizid R7402 wurde von *Dupont* (Wilmington, USA) zur Verfügung gestellt (O'Keefe *et al.*, 1994).

Enzyme wie Restriktionsendonukleasen und DNA modifizierende Enzyme stammten von den Firmen *Amersham Life Science* (Braunschweig), *Biolabs* (Schwalbach), *Roche* (Mannheim), *Amersham Life Technologies* (Karlsruhe), und *Pharmacia* (Freiburg). Das benutzte Radioisotop ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTP (3000 Ci/mmol) wurde von *Amersham Life Science* (Braunschweig) hergestellt. Zur Exposition wurden Röntgenfilme der Firma *Kodak* (Rochester, USA) benutzt.

### 2. Bakterien und Plasmide

Zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid DNA wurden die Bakterienstämme DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) und DH10B (*Roche*) verwendet. Zur Transformation von *Arabidopsis Col-0* wurde der *Agrobakterien*-Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) benutzt.

Soweit nicht anders angegeben wurden folgende Vektoren verwendet:

- pCR II TOPO (*Invitrogen*, Karlsruhe) zur Subklonierung von PCR Fragmenten
- pBlueScriptKS+ (*Stratagene*) zur *in vitro* Transkription
- pRT $\Omega$ /*Not*/*AscI* (Überlacker und Werr, 1996): Der Vektor enthält den konstitutiven 35S Promoter,  $\Omega$  Leader Sequenzen und ein poly-Adenylierungssignal

- pGPTV/*BaR/AscI* oder pGPTV/*Kan/AscI* (Überlacker und Werr, 1996): Die binären T-DNA Vektoren enthalten innerhalb der T-DNA Grenzen neben einem BASTA oder Kanamycin Resistenzgen das *GUS* Markergen *uidA*.
- pBI-ΔGR (Aoyama and Chau, 1997): Der T-DNA Vektor vermittelt Kanamycin Resistenz und trägt die hormonbindende Domäne des Glucocorticoidrezeptor.
- Die für die Konstruktion des TAMARA Konstrukts benötigten Vektoren wurden freundlicherweise von Dupont (Wilmington, USA) und Dr. J. Jones (Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich) zur Verfügung gestellt. Ein Vektor, der ein Enhancertetramer des 35S Promoters enthielt stammt von Dr. C. Koncz (MPI für Züchtungsforschung, Köln).

### 3. Desoxyoligonukleotide

Für Sequenz- und PCR- Reaktionen wurden Desoxyoligonukleotide der Firmen *Eurogentech* (Belgien) und *Sigma* (Darmstadt) bezogen.

Die Orientierung der Primersequenzen ist in 5' → 3' angegeben.

5' *dTAM* spezifische Oligonukleotide:

TK_EN1	nach <i>Rsa</i> I zur iPCR mit TK_EN6/ 7	CGCGCACCTCCAAGTAGC
TK_EN2	nach <i>Xba</i> I zur iPCR mit TK_EN6/ 7	CCTGATTACGAGATGACAACACTG
TK_EN3	nach <i>Asn</i> I/ <i>Sau3A</i> I zur iPCR mit TK_EN6/ 7	CAAGAAGTCAAACGCTATGTGG
TK_EN6		CATTCATAAGAGTGTCCGGTGTGG
TK_EN7		GCACGACGGCTGTAGAATAGG

3' *dTAM* spezifische Oligonukleotide:

TK_EN4		CTTAGAGTGTCCGGCTTATTTTCAGT
TK_EN5		GTTTTGGCCGACACTCCTTACC
RS_EN4	nach <i>Rsa</i> I zur iPCR mit RS_EN5	CAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG
TK_EN8	nach <i>EcoR</i> V/ <i>Sau3A</i> I zur iPCR mit TK_EN4/5	ATTCATTCTGTTGGTGGGTCATTG
TK_EN9	nach <i>Asn</i> I/ <i>EcoR</i> V zur iPCR mit TK_EN4/5	AGTCCATACAAAACGCAATCATAG
RS_EN5		GGACCGACGCTCTTATGTAAAAG

*DRN* spezifische Oligonukleotide:

PrDRN1	5' Promoter	TTTGGTTCCTAGGGTTTTGGTTTG
PrDRN2	5' Promoter	CGTTTGTTCATCTTTCGTTTCAGC
PrDRN3	3' Promoter	GGAGAGCTCGATATTCATCATGATTATG
PrDRN4	3' Promoter	AGCTTGGAGCTCGAATAGAGTTCAAC
DRNcdsF	<i>DRN</i> (Translationsstart)	ATGGAAAAAGCCTTGAGAAAC
DRNcdsR	<i>DRN</i> (Translationsstop)	ACCAAACTCAAACATAATC
DRN1	<i>DRN</i> (Translationsstart mit <i>Nco</i> I)	ACCAACCATGGAAAAAGCCTTGAGAAAC
DRN13	<i>DRN</i> (zu <i>Bam</i> HI mutierter Stop)	<u>GGATCCCACGATCTTCGGCAAG</u>

DRN2	Sequenzierung	GGCGGTGGTGTGGTGGAGA
DRN3	Sequenzierung	CTCATCATCTTCTTACTCAGCAT
DRN4	nested für 3' RACE	TCGCAGACGGTGGTTTATCG
DRN5	nested für 3' RACE	GTTCAAGAGACTAAGGAGAC
DRN6	Sequenzierung	TCTCCTTAGTCTCTTGAACC
DRN7	Sequenzierung	ATGATGAACAAGATAGCAAGT
DRN8	nested für 5' RACE	GGTTTCTAGGGTTTTGGTTTG
DRN9	Sequenzierung	GCTACGGGAATTTTCAAG
DRN10	Sequenzierung	TTCCGTACATCAACATTC
DRN11	nested für 5' RACE	AATTAGTACGAGCCTTTGC
DRN16	SLAT Linien	CCTTTTGTACGAAACGTTAGTCCAC
DRN17	SLAT Linien	GTTTTATTTGCGCCACTCCCCTTG

*DRN-LIKE* spezifische Oligonukleotide:

LIKEcdsF	<i>DRN-LIKE</i> (Translationsstart)	GGTCAACCATGGAAGAAGCAATCA
LIKEcdsR	<i>DRN-LIKE</i> (Translationsstop)	GATAAGCACGTAAAAAGTAGAACA

*pi-ID* Oligonukleotide:

PI1	Sequenzierung	GAGAAAGAGAAACCCATTAGCC
PI2	Sequenzierung	CAAAAACCTTCCATCACTGTAG
PI3	Sequenzierung	ATTATACATGAAAACGAGACA

*spz-ID* Oligonukleotide:

SPZ1	Sequenzierung	ATCGGCTCGTTCTTACTCCATT
SPZ2	Sequenzierung	ATGCTCCATGTAGTCCGTTTG
SPZ3	Sequenzierung	ATTTGGATTGATACTTTGACAT
SPZ4	Sequenzierung	CAATGTAGACCATGGAAGTTGCAATTC
SPZ5	Sequenzierung	AGAAAACCGGCACATCCTTATC
SPZ6	Sequenzierung	AAATTGACTCCAAACTGTAC

*lol-ID* Oligonukleotide:

LOL1	Sequenzierung	AAATGAAATGGGAGCGTTAC
LOL2	Sequenzierung	GATCATTCTTGCCGTCACC
LOL3	Sequenzierung	ATACCACGGCGATAATACCTA

*GUS* spezifische Oligonukleotide:

GUSup	<i>uidA</i> Gen	ACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGT
GUSlow	<i>uidA</i> Gen	GTGAGCGTCGCAGAACATTACATT

## allgemeine Sequenzierungsprimer:

35S_1	35S Promoter in pRT $\Omega$ /Not/AscI	TCATTTCAATTTGGAGAGG
pRT3	polyA in pRT $\Omega$ /Not/AscI	CCTTATCTGGGAACTACTCAC
M13F20		GTAAAACGACGGCCAGT
M13R		CAGGAAACAGCTATGAC
T7/T3		AACAGCTATGACCATG

#### 4. Pflanzenmaterial

Es wurden *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen der Ökotypen *Columbia-0* (*Col-0*) und *Landsberg erecta* (*Ler*) verwendet. Folgende Genotypen wurden für Kreuzungsanalysen benutzt:

- *clv1-4* in *Ler* (Clark *et al.*, 1996) vom NASC (GB) bezogen
- *clv2-1* in *Ler* (Trotochaud *et al.*, 1999) vom NASC (GB) bezogen
- *clv3-2* in *Ler* (Fletcher *et al.*, 1999) vom NASC (GB) bezogen
- *wus-1* in *Ler* (Mayer *et al.*, 1998) von Dr. T. Laux zur Verfügung gestellt
- *stm-5* in *Ler* (Endrizzi *et al.*, 1996) von Dr. T. Laux zur Verfügung gestellt
- *stm-6* in *Ler* (Endrizzi *et al.*, 1996) von Dr. T. Laux zur Verfügung gestellt

#### 5. Photographie, Mikroskopie, Computeranalysen und Bildbearbeitung

Photographien wurden mit den Kamerasystemen Olympus *OM-4* oder *5* und Nikon *Coolpix* erstellt. Mikroskopische Arbeiten wurden an einem *Axioskop* mit Nomarsky Optik der Firma Zeiss ausgewertet und digital festgehalten (*Axiocam*). Zur Dokumentation großer Datenmengen und für statistische Analysen wurde das Programm *Excel* (Microsoft) benutzt. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit der *Arabidopsis* Genom Datenbank unter [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) oder <http://mips.gsf.de> durch BLASTN oder BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) verglichen und mit dem *UWGCG* Programmpaket 7.0 (University of Wisconsin Genetics Computer Group) analysiert. Die weitere Bearbeitung wurde mit Hilfe der Programme *Gene Construction Kit*, *Laser Gene*, und *Oligo4* durchgeführt. Zur phylogenetischen Rekonstruktion wurden der ProDom Datenbank Proteinsequenzen entnommen (Corpet *et al.*, 2000) und in *Phylip 3.5* analysiert (Felsenstein, 1986).

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurden in *Canvas 7.0* (Deneba Systems) und *Adobe Photoshop 5.5* (Adobe Systems) erstellt, und in *Word 2000* (Microsoft) übertragen.

### III METHODEN

Allgemeine molekularbiologische Methoden wie Ligationen, Bakterientransformationen, Restriktionsanalysen oder Standard PCR wurden nach Ausubel *et al.* (1996) oder nach Herstellerangaben durchgeführt, sofern sie nicht im methodischen Teil näher beschrieben sind.

#### 1. Isolation und Analyse von Nukleinsäuren

##### 1.1. Plasmid DNA

Geringe Mengen von 10 bis 20 µg Plasmid DNA wurde nach der *TELT* Methode isoliert (Holmes und Quigley, 1981). Größere Mengen oder DNA höherer Qualität für *in situ* Hybridisierungsexperimente wurde mit Produkten der Firmen *Genomed* und *Quiagen* hergestellt (Midi-/ Maxi Kit).

##### 1.2. BAC DNA

Die Präparation von BAC DNA wurde nach dem Protokoll von Sinnett *et al.* (1998) durchgeführt.

##### 1.3. DNA Sequenzierung

Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perking Elemer) durchgeführt und auf einem *PE/Applied Biosystems 377* Sequencer (Perking Elemer) aufgetrennt.

##### 1.4. Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis*

Um genomische DNA aus *Arabidopsis* zu extrahieren, wurde zermörstertes Pflanzenmaterial von 1- 2 Blättern oder 3- 4 Infloreszenzen in 700 µl Extraktionspuffer (5 % SDS [w/v]; 0.8 % CTAB [w/v]; 0.2 M Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA; 0.8 M NaCl) für 30 Min bei 65°C inkubiert. Nach Zentrifugation und Chloroform Extraktion des Überstands wurde die DNA mit 0,1 Vol 3M Na-Acetate/ 0,7 Vol Isopropanol gefällt, und nach Zentrifugation in 50 µl H<sub>2</sub>O/RNase (10 mg/ml) gelöst.

### 1.5. Isolation von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*

Gesamt RNA wurde mit dem *TRIzol Reagent Kit* (Life Technologies) aus Schock-gefrorenen Keimlingen, Blättern oder Infloreszenzen isoliert.

### 1.6. Markierung von DNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden wurden spezifische Fragmente in Anwesenheit von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP durch Random Priming (Ladderman<sup>TM</sup>) oder Nick Translation (Life Technologies) markiert. Nicht-radioaktive Markierungen wurden unter Benutzung des *DIG-Labeling Kits* (Roche) durchgeführt.

### 1.7. Reinigung von DNA Fragmenten

PCR Produkte und in Agarosegelen aufgetrennte DNA Fragmente wurden mit dem *GFX DNA Purification Kit* (Amersham Life Science) aufgearbeitet. Radioaktiv markierte Sonden wurden mit *Micro Spin Columns S-200 HR* (Pharmacia) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt.

### 1.8. Southern Analysen

Zur *Southern* Analyse wurde 1  $\mu$ g genomischer DNA zumeist mit *Pst* I oder *EcoR* V  $\ddot{u}$ N verdaut, auf einem 0,8 % TBE Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine *Hybond-N+* Nylon Membran (Amersham Life Science) nach Herstellerangaben alkalisch übertragen. Die Hybridisierung wurde  $\ddot{u}$ N bei 65°C in *Hybri-Quick* (Roth) durchgeführt. Anschließend wurde der Filter in abnehmenden Salzkonzentrationen mit 2 bis 0,1 x SSC/ 1% SDS [w/v] bei 65°C oder RT gewaschen und wenige Stunden oder mehrere Tage exponiert.

Zur Detektion von *dTAM* spezifischer DNA wurde bei *Pst* I Verdau ein 1,6 Kb *BamH* I/*Bcl* I *BASTA* Fragment aus SLJ0512 (Tissier *et al.*, 1999) benutzt. Bei Restriktion mit *EcoR* V wurde ein 1 Kb *Pst* I/*Cla* I Fragment aus SLJ7648 (Tissier *et al.*, 1999) verwendet, um das *dTAM* Element zu identifizieren. Zur Detektion *DRN* spezifischer DNA in der *drn-1D* Mutation oder im *drn*<sup>-</sup> Allel diente ein 0,7 Kb *Pvu* II/*EcoR* I Fragment aus dem 3' Bereich der kodierenden Region von *DRN*.

## 1.9. Northern Analysen

Zur *Northern* Analyse wurden zwischen 10 und 20 µg Gesamt RNA auf einem 1,2 % denaturierenden Formaldehydgel elektrophoretisch getrennt und auf eine *Hybond-N+* Membran übertragen (Amersham Life Science). Die Hybridisierung wurde nach Herstellerangaben bei 42 °C in *ULTRAhyb*-Puffer (Ambion) durchgeführt. Der Filter wurde nach mehreren Waschschritten wenige Stunden oder einige Tage exponiert.

### 1.10. 5' und 3' RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

Um die Transkriptionsiniationsstelle und die Lage des Polyadenylierungssignals für das *DRN* Gen zu bestimmen, wurden 5' und 3' *RACE* Experimente durchgeführt. Hierzu wurde das 3'/5'-*RACE-Kits* der Firma Roche benutzt, wobei jeweils 2 µg Gesamt RNA aus jungen Hauptinfloreszenzen eingesetzt wurden. Bereits mit den ersten genspezifischen Primern wurden spezifische Produkte gewonnen. Nach dem zweiten PCR Zyklus wurden die Produkte in PCR II TOPO subkloniert. Die jeweils 10 längsten unabhängigen Klone wurden sequenziert.

### 1.11. Isolation flankierender genomischer DNA durch inverse PCR

Ungefähr 500 ng genomische DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, die nur vier Basen zur Restriktionserkennung benötigen, um kurze Fragmente von 200 bis 1000 Bp zu erzeugen. Die Fragmente wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und üN bei 16°C in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit 5 U T4 Ligase (Life Technologies) zirkularisiert. Nach erneuter Phenol/Chloroform Extraktion und Präzipitation der DNA wurde das gereinigte Ligationsgemisch in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die PCR Reaktion wurde mit 1 µl der Lösung in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 0,2 U Polymerase und je 50 pmol Primer durchgeführt.

PCR Bedingungen: 5 min 94°C; 39x [30 sec 94°C; 45 sec 60°C ; 2 min 72°C ]; 5 min 72°C

Mit folgenden Primerkombinationen wurden flankierende Sequenzen isoliert (siehe Anhang):

Für das 5' Ende des *dTAM* Elements:

TK\_EN1 mit TK\_EN6/7 nach *Rsa* I Verdau

TK\_EN2 mit TK\_EN6/7 nach *Xba* I Verdau

TK\_EN3 mit TK\_EN6/7 nach *Asn* I/ *Sau3A* I Verdau

Für das 3' Ende des *dTAM* Elements:

TK\_EN9 mit TK\_EN4/5 nach *Asn* I/*EcoR* V Verdau

TK\_EN8 mit TK\_EN4/5 nach *EcoRV*/*Sau3A* I Verdau

RS\_EN4 mit RS\_EN5 nach *Rsa* I Verdau

## 2. Konstrukte

Alle erzeugten Konstrukte und Zwischenschritte wurden im Restriktionsverdau geprüft und gegebenenfalls sequenziert.

### 2.1. Herstellung des TAMARA Konstrukts

Das gegenselektionierbare Markergen *SUI* wurde als *EcoR* I/*BamH* I Fragment aus dem Plasmid SLJ8241 (Tissier *et al.*, 1999; O'Keefe *et al.*, 1994) isoliert und mit dem T-DNA Vektor pGPTV (Becker *et al.*, 1992) ligiert, der mit den gleichen Enzymen behandelt worden war, um Sequenzen innerhalb der T-DNA Grenzen zu entfernen. Das Plasmid wurde an der *EcoR* I Schnittstelle mit einem *Asc* I Adapter versehen und pGPTV-SSU benannt.

Der Vektor SLJ7713 (Tissier *et al.*, 1999) wurde mit *Xho* I und *Sma* I verdaut, um das immobilisierte Transposase-Gen zu isolieren. Das Fragment wurde in eine *Xho* I und mit *Klenow*-Enzym aufgefüllte *BamH* I Schnittstelle im Plasmid pRT- $\Omega$ /*Not*/*Asc* (Überlacker und Werr, 1996) kloniert. Aus dem pRT-*TNP* genannten Konstrukt konnte die Transposase anschließend zusammen mit 35S Promoter- und Terminator Sequenzen als *Asc* I Fragment ausgeschnitten werden.

Das *BASTA* Resistenzgen aus dem Vektor SLJ0512 (Tissier *et al.*, 1999) wurde als *Bcl* I Fragment isoliert, mit *Klenow*-Enzym aufgefüllt und zwischen die 5' und 3' Enden des *dSpm* Elements in SLJ7648 (Tissier *et al.*, 1999) kloniert, der dazu mit *Pst* I verdaut und mit T4 Ligase behandelt wurde.

In eine mit *Klenow*-Enzym ergänzte *Hind* III Schnittstelle im *dSpm* Element wurde das 35S Enhancertetramer aus pPVICEn4HPT (Hayashi *et al.*, 1992) als aufgefülltes *BamH* I/*Bgl* II Fragment eingefügt. Das modifizierte *dSpm* Element wurde durch *Cla* I Verdau ausgeschnitten und nach Behandlung mit *Klenow*-Enzym in die aufgefüllte *BamH* I Schnittstelle in pGPTV-SSU kloniert. Zur Fertigstellung des TAMARA Konstrukts wurde die Transposase aus pRT-*TNP* als *Asc* I Fragment inseriert.

## 2.2. 35S::*DRN*

Die kodierende Sequenz des *DRN* Gens wurde durch PCR mit den Primern DRN1 und DRNcdsR aus BAC F13K23 (Genbank: AC012187) amplifiziert und in den Vektor pCR II TOPO (*Invitrogen*) kloniert. Die *DRN* cDNA wurde als *Bam*H I/ *Xba* I Fragment zwischen den 35S CaMV Promoter und die 3' Terminator Sequenz in pRT $\Omega$  *Not*/ *Asc* I insertiert und als *Asc* I Fragment in den binären T-DNA Vektor pGPTV/*BaR*/*Asc*I überführt.

## 2.3. 35S::*DRN-GR*

Zur Herstellung des 35S::*DRN-GR* Konstrukts wurde mit der Primerkombination DRN1 und DRN13 ein PCR Produkt erzeugt, so dass der Translationsstop der kodierenden *DRN* Sequenz mutiert wurde. Nach der Subklonierung des PCR Produkts in pCR II TOPO (*Invitrogen*) wurde *DRN* unter Erhalt des Leserasters als *Bam*H I/*Xba* I Fragment an die Glucokorticoide-Rezeptordomäne in pBI- $\Delta$ GR kloniert (Aoyama and Chau, 1997).

## 2.4. 35S::*DRN-LIKE*

Der kodierende Bereich des *DRN-LIKE* Gens wurde durch PCR mit den Primern LIKEcdsF und LIKEcdsR aus genomischer *Col-0* DNA amplifiziert und in den Vektor pCR II TOPO (*Invitrogen*) überführt. Die weitere Klonierung erfolgte analog zur Strategie in 35S::*DRN*.

## 2.5. DRN::*GUS*

Um das *DRN* Promoter-*GUS* Konstrukt zu erstellen, wurden 4,8 Kb des 5' und 1,5 Kb des 3' Promoterbereichs von *DRN* stromaufwärts und stromabwärts vom *GUS* Gen in pGPTV/*BaR*/*Asc*I insertiert. Dazu wurden durch PCR mit *Expand Polymerase* (Roche) und den Primern PrDRN1 und PrDRN2 aus BAC F13K23 4,8 Kb des 5' Promoters amplifiziert und in die mit *Klenow*-Enzym aufgefüllten *Xba* I/ *Hind* III Schnittstellen in pGPTV/*BaR*/*Asc*I kloniert. Dem Plasmid wurden 1,5 Kb des 3' Promoterbereichs von *DRN* hinzugefügt, indem das PCR-Produkt der Primer PrDRN3 und PrDRN4 in eine verbleibende *Sac* I Schnittstelle insertiert wurde.

## **2.6. *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Gentransfer**

Um die hergestellten Konstrukte in *Arabidopsis* stabil zu exprimieren, wurden *Col-0* Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* infiltriert (Bechthold *et al.*, 1993; Bechthold und Pelletier, 1998). Die Nachkommenschaft dieser Pflanzen wurden selektioniert, um transgene Pflanzen zu isolieren.

## **3. Anbau von Pflanzen**

### **3.1. Anzucht**

Zur verbesserten Keimung wurden die ausgebrachten *Arabidopsis* Samen einer dreitägigen Kältebehandlung bei 4°C unterzogen. Die Anzucht erfolgte unter Kurztagbedingungen in Phytokammern bei 18°C bei einer Tageslichtlänge von 10 Stunden und einer Dunkelperiode von 14 Stunden. Im Langtag wurden die Pflanzen im Gewächshaus bei 23 °C mit einer Lichtdauer von 16 Stunden kultiviert.

### **3.2. Selektionierung**

Kanamycin-resistente Pflanzen wurden auf Agar-Medien (0,5x MS-Gamborg/1% Sucrose) mit einer Kanamycinkonzentration von 50 mg/L isoliert. Zur BASTA Selektion wurden *Arabidopsis* Keimlinge vierzehn Tage nach Keimung mit einer Lösung von 100 mg/L BASTA (Hoechst) behandelt.

Zur doppelten Selektion von Transpositionseignissen im TAMARA System wurden die Pflanzen sechs Tage nach Keimung mit einer Lösung von 75 µg/L R7402 (Dupont) besprüht, und nach vierzehn Tagen mit einer Lösung, die 150 µg/L R7402 und 100 mg/L BASTA (Hoechst) enthielt.

## 4. Histologische Techniken

Alle morphologischen Ergebnisse wurde in Anlehnung an Bowman (1997) analysiert.

### 4.1. Nicht-radioaktive RNA *in situ* Hybridisierung

Zur Bestimmung zellulärer Expressionmuster wurden an Gewebeschnitten RNA *in situ* Experimente nach Coen *et al.* (1990) und Jackson (1991) durchgeführt. Dazu wurde das Pflanzenmaterial (Keimlinge, junge Hauptinfloreszenzen oder Schoten) in 4 % Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und in einer Stärke von 6 bis 8  $\mu\text{m}$  im Mikrotom geschnitten. Nach Übertragen der Gewebeschnitte auf Objektträger, wurden Transkripte mit Digoxigenin-markierten RNA Sonden in Verbindung mit einem Anti-Digoxigenin AP-gekoppelten Antikörper (Roche) detektiert.

Zur Analyse des *DRN* Expressionsmusters wurde ein 680 Bp großes *Pvu* II/ *Eco*R I Fragment aus der in PCR II TOPO subklonierten *DRN* cDNA in pBlueScriptKS+ überführt. In diesem DNA Abschnitt ist das *AP2* Motiv nicht enthalten, um Kreuzhybridisierungen zu verhindern. Um das Expressionsmuster von *DRN-LIKE* zu untersuchen wurde ein 400 Bp großes *Eco*R V/*Eco*R I Fragment aus dem 3' terminalen Bereich des Gens in pBlueScriptKS+ kloniert.

Zur Detektion von *GUS* RNA im Gewebe von Promoter-*GUS* Linien wurde mit den Primern *GUSup* und *GUSlow* ein 900 Bp großes PCR Fragment erzeugt und in pBlueScriptKS+ kloniert. Zum Nachweis von *CLV3* und *WUS* RNA wurden die Konstrukte pMHwus16 und pNB4/35 verwendet, die von Dr. R. Simon und M. Hobe zur Verfügung gestellt wurden.

### 4.2. $\beta$ -Glucuronidase Färbung von Promoter *GUS* Linien

Die Promoter vermittelte  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität wurde nach dem von Sieburth und Meyerowitz (1997) beschriebenen Protokoll in Embryonen, Keimlinge und Infloreszenzen analysiert. Die *GUS* Färbung wurde für *STM::GUS* 5 h, für *CLV3::GUS* 90 Minuten und für *DRN::GUS* 30 Minuten durchgeführt. Je nach Gewebe konnte das Pflanzenmaterial als „*whole mount*“ untersucht werden (Embryonen), oder wurde nach der Färbung in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Die *CLV3::GUS* Linie wurde freundlicherweise von U. Brand zur Verfügung gestellt (Brand *et al.*, 2002), und die *STM::GUS* Linie wurde von J. König erstellt (Dr. W. Werr unveröffentlicht).

### 4.3. Delafield Färbung

Zellulose- und Pektinwände werden durch die Delafield Färbung intensiv blau gefärbt. Um Gewebestrukturen im mikroskopischen Schnitt sichtbar zu machen, wurde daher Pflanzenmaterial zunächst in 4 % Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger transferiert, mit *Rotihistol* (Roth) entwacht und für zwei bis drei Minuten in Delafield Lösung inkubiert. Zur Farbreaktion (Bläuen) wurde das Gewebe mit 0,5 %  $\text{NaHCO}_3$  Lösung behandelt.

## IV ERGEBNISSE

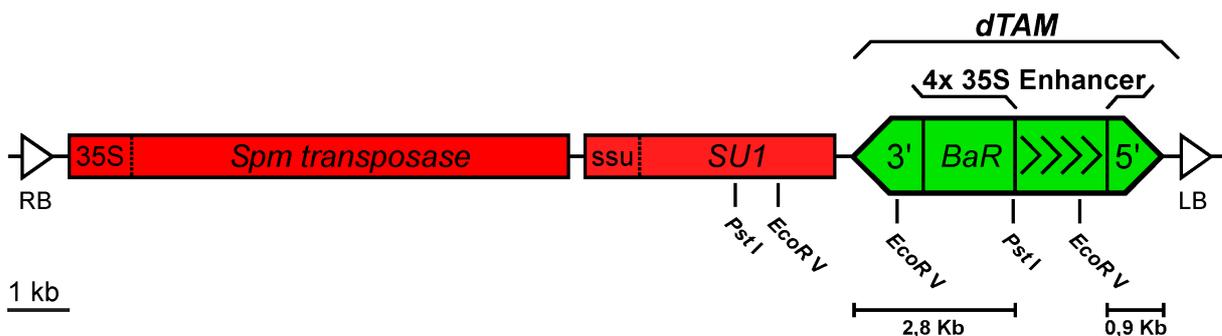
Zur Erzeugung dominanter Mutationen in *Arabidopsis thaliana* wurde ein Transposon-vermitteltes Aktivierungsmutagenesystem (TAMARA) etabliert, in dem durch die Insertion eines 35S Enhancertetramers dominante Mutationen erzeugt werden (Kapitel 1.1 bis 1.3). Hierbei konnten dominante Mutation mit Defekten der Blatt- und Blütenentwicklung und einem verspäteten Blühzeitpunkt identifiziert werden (Kapitel 1.4).

Die isolierte Funktionsgewinnmutante *Dornröschen-ID* zeigte dramatische Defekte des SAM und wurde im Detail analysiert (Kapitel 2).

### 1. TAMARA: Transposon mediated Activation tagging Mutagenesis in ARabidopsis

#### 1.1. Grundlagen des TAMARA Systems

##### 1.1.1. TAMARA Konstrukt

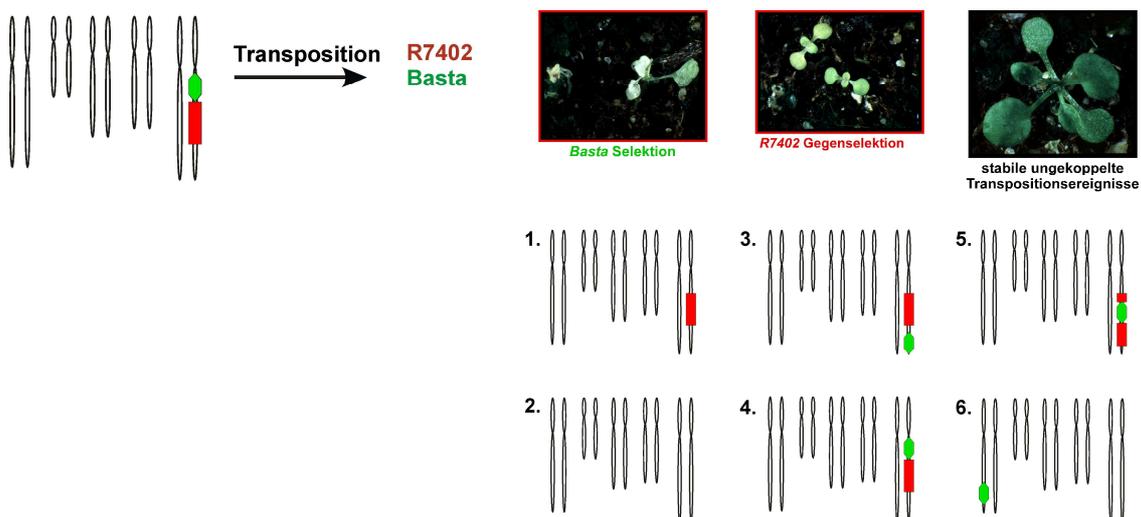


**Abbildung 1:** TAMARA Konstrukt. Das 28 Kb große T-DNA Konstrukt trägt das gegenselektionierbare *SU1*-Marker (rot), eine immobilisierte Transposasequelle (rot) und ein defektes *Spm* Element (grün). Dieses *dSpm* Element enthält ein BASTA Resistenzgen (*BaR*) und ein Enhancertetramer. Das veränderte *dSpm* Element wurde *dTAM* benannt. Rechte (RB)- und linke (LB) T-DNA Endsequenzen umfassen die Komponenten zum *agrobacterium*-vermittelten Gentransfer.

Für das TAMARA System wurde ein T-DNA Konstrukt (Abb.1) erzeugt, in dem zur Mutagenisierung des Arabidopsisgenoms das *En/Spm* Element aus Mais als 2-Element System verwendet wird (Frey *et al.*, 1990; Aarts *et al.*, 1993). Die Transposasequelle ist vom nicht-autonomen, aber transponierbaren defekten *Spm* Element (*dSpm*) getrennt. Dieses *dSpm* Element trägt im TAMARA Konstrukt ein BASTA Resistenzgen, *BaR* (White *et al.*, 1990) als

positiven Selektionsmarker und ein Tetramer der Enhancersequenzen (-90 bis -420) des 35S Promoters des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) (Odell *et al.*, 1985; Benfey *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1989). Diese Multimerisierung bewirkt eine zusätzliche Steigerung der Aktivität der transkriptionellen Enhancersequenzen (Kay *et al.*, 1987). Zur Vereinfachung wird dieses modifizierte *dSpm* Element im Folgenden mit ***dTAM*** bezeichnet. Zusätzlich enthält das T-DNA Konstrukt eine immobilisierte Transposasequelle unter Kontrolle des 35S Promoters und das gegenselektionierbare Markergen *SUI* (O'Keefe *et al.*, 1994). Das *SUI* Gen kodiert eine bakterielle Cytochrom P450 Monooxygenase, die das Proherbizid R7402 in eine phytotoxische Form umsetzt, die weiteres Wachstum verhindert und zum Vergilben der Pflanzen führt. Im Vergleich dazu bewirkt die BASTA-Applikation Welken und rasches Absterben der nicht resistenten Pflanzen (Abb. 2). BASTA und R7402 können schon wenige Tage nach Keimung der Pflanzen in flüssiger Form gesprüht und unter nicht-sterilen Bedingungen verwendet werden. Der Arbeitsaufwand zur Selektion ist daher gering. Die gewählte Kombination der positiven und negativen Markergene *BaR* und *SUI* wurde bereits erfolgreich genutzt, um innerhalb eines 2-Komponenten Systems eine Insertionspopulation zur Identifikation von Funktionsverlustmutationen zu errichten (Tissier *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu dient das TAMARA System der Erzeugung dominanter Mutationen.

### 1.1.2. Arbeitsweise des Systems



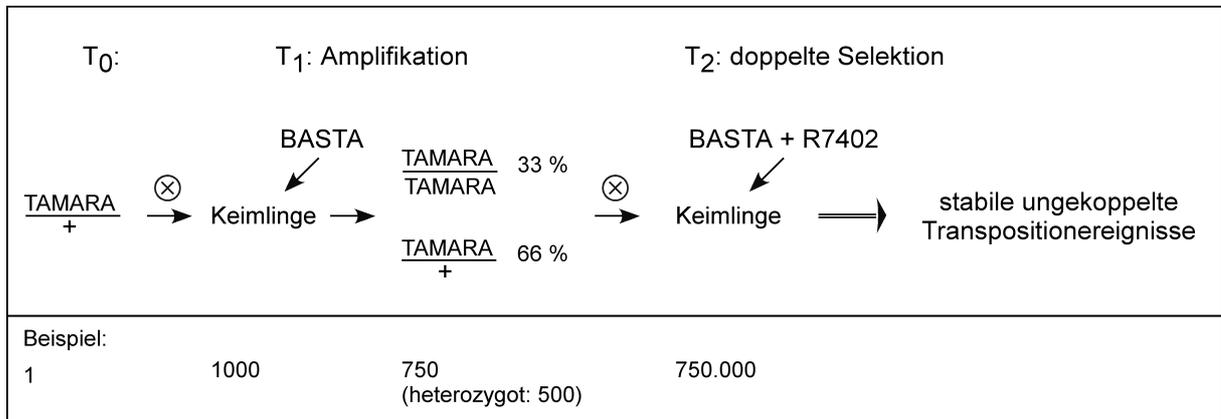
**Abbildung 2:** Selektionsergebnisse verschiedener Transpositionseignisse einer heterozygoten Pflanze. Schematische Darstellung der 5 Arabidopsischromosomen (2n); 1: Verlust des *dTAM* Elements, jedoch noch vorhandene T-DNA; 2: Verlust des *dTAM* Elements und der T-DNA; 3: Transposition an einen gekoppelten Locus; 4: keine Transposition; 5: Transposition in das gegenselektionierbare Markergen; 6: Transposition an einen ungekoppelten Locus unter Verlust der T-DNA durch Segregation.

Rote Box: Transposase und gegenselektionierbares Markergen; grünes Symbol: *dTAM* Element, das ein *BASTA*-Resistenzgen und das Enhancertetramer enthält

Ausgehend von einer für die T-DNA heterozygoten Pflanze, findet Transposon-vermittelte Exzision und Reintegration des *dTAM* Elements innerhalb des Genoms statt (Abb. 2). Die Nachkommen dieser Pflanze werden in der nächsten Generation sowohl mit BASTA, als auch mit R7402 behandelt. Bei Verlust des *dTAM* Elements durch Segregation oder fehlerhafter Reintegration, sterben diese Pflanzen nach Applikation von BASTA (Abb. 2, 1. und 2.). Pflanzen, in denen Transposition in die Nähe der T-DNA Donorstelle stattgefunden hat, sind sensitiv gegenüber R7402, da das Markergen *SUI* nicht durch Segregation vom *dTAM* Element getrennt wird (Abb. 2, 3. und 4.). Es überleben daher nur Pflanzen, die die das Markergen *SUI* nach Transposition des *dTAM* Elements an eine ungekoppelte Position verlieren. In diesem Fall geht auch die Transposasequelle verloren, so dass das *dTAM* Element nicht erneut transponiert werden kann und die Insertion stabil bleibt. Solche Pflanzen sind BASTA-resistent und R7402-insensitiv (Abb2: 5 und 6). Sie werden daher als **DS Pflanzen** bezeichnet (DS=Doppelt Selektiert). Das im *dTAM* Element enthaltene 35S Enhancertetramer kann zur Aktivierung und ektopischen Expression von Genen in der Umgebung der Insertionsstelle führen. Die Identifikation dominanter Phänotypen geschieht damit in der gleichen Generation wie die Selektion. In der folgenden Generation können die DS Pflanzen dazu genutzt werden, um Funktionsverlustmutationen zu isolieren.

### 1.1.3. Amplifikation der TAMARA Starterlinien

Ungekoppelte Transpositionereignisse werden durch die doppelte Selektion nur aus dem heterozygoten Teil der Eltern-Generation isoliert. Daher wird die T<sub>1</sub> Generation dazu genutzt die Zahl heterozygoter Pflanzen zu erhöhen, um eine große Zahl von Ereignissen zu erzeugen (Abb. 3): Produziert eine für das TAMARA Konstrukt primär transgene Pflanze (T<sub>0</sub>) nach Selbstung durchschnittlich 1000 Samen (20 Schoten mit 50 Samen), sind 50 % heterozygot für das TAMARA Konstrukt. Durch den Amplifikationsschritt wird daher Transposition in 500 heterozygoten Pflanzen unabhängig voneinander ermöglicht. Um zu gewährleisten, dass nur Pflanzen propagiert werden, die das TAMARA Konstrukt enthalten, wird die T<sub>1</sub> Generation mit BASTA behandelt. Ungekoppelte Transpositionereignisse dieser Generation werden entfernt, da sie zwar BASTA-resistent sind, jedoch keine Transposase mehr besitzen. Dies gelingt, da Pflanzen, die das gegenselektionierbare Markergen tragen auch ohne R7402 Applikation durch reduziertes Wachstum und dunklere Pigmentierung erkennbar sind (nicht dargestellt). Ungekoppelte Transpositionereignisse werden in Pflanzen der T<sub>2</sub> Generation durch Behandlung mit BASTA und R7402 isoliert.



**Abbildung 3:** Um die Anzahl selektierbarer Pflanzen zu erhöhen wird die T<sub>0</sub> Generation amplifiziert bevor ungekoppelte Transpositionereignisse durch doppelte Selektion in der T<sub>2</sub> Generation isoliert werden (siehe Rechenbeispiel).

## 1.2. Aufbau der TAMARA Population

Durch Einführung des TAMARA Konstrukts durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer (Bechtold *et al.*, 1993) in *Arabidopsis* Wildtyp *Col-0* wurden 67 TAMARA Starterlinien (T<sub>0</sub>) erzeugt. Nachkommen dieser Pflanzen wurden auf 3:1 Segregation der BASTA-Resistenz getestet. 9 Linien wurden verworfen, da sie keine 3:1 Segregation zeigten. Sie trugen wahrscheinlich mehrere T-DNA Insertionen an ungekoppelten Loci, wodurch die Möglichkeit ungekoppelte Transpositionereignisse zu isolieren in diesen Linien stark reduziert wurde. Eine der untersuchten Linien lieferte nur BASTA-resistente Pflanzen, die keine dunkelgrüne Pigmentierung besaßen. Da die dunkle Blattfärbung nur für Pflanzen typisch ist, die das gegenselektionierbare Markergen exprimieren, hat in dieser Linie möglicherweise während der T<sub>0</sub> Generation ein sehr frühes Transpositionereignis stattgefunden, wobei das *dTAM* Element in das gegenselektionierbare Markergen insertiert wurde. Die verbleibenden 57 Linien wurden zur Amplifikation (T<sub>1</sub>) in einer Dichte von 500 Pflanzen pro Schale ausgebracht und nach Keimung mit BASTA behandelt. Pflanzen mit möglichen ungekoppelten Transpositionereignissen wurden aufgrund ihrer wildtypischen, hellgrünen Pigmentierung entfernt. Zwischen 1,5 und 4 g Saatgut konnten so pro Starterlinie geerntet werden. Zur Isolation ungekoppelter Transpositionereignisse in der T<sub>2</sub>-Generation wurden jeweils ca. 2500 Samen (60mg) einer Linie ausgelegt und wenige Tage nach Keimung doppelt selektioniert. DS Pflanzen, die sowohl BASTA-resistent, als auch insensitiv gegen R7402 waren, wurden zu Pools von 77 Pflanzen zusammengefaßt. Um phänotypische Veränderungen und mögliche dominante Mutationen zu erkennen wurden diese Pflanzen bis zur Samenreife beobachtet.

Konnten Pflanzen mit morphologischen Abweichungen identifiziert werden, wurden sie gegen Wildtyp *Col-0* rückgekreuzt, um sie als dominante Mutation in der nächsten Generation zu verifizieren. Die Samen wildtypischer Pflanzen wurden einzeln geerntet, um in weiterführenden Experimenten in der nächsten Generation rezessive Mutationen isolieren zu können oder dominante Mutationen zu identifizieren, die nicht unter Standardbedingungen erkennbar sind.

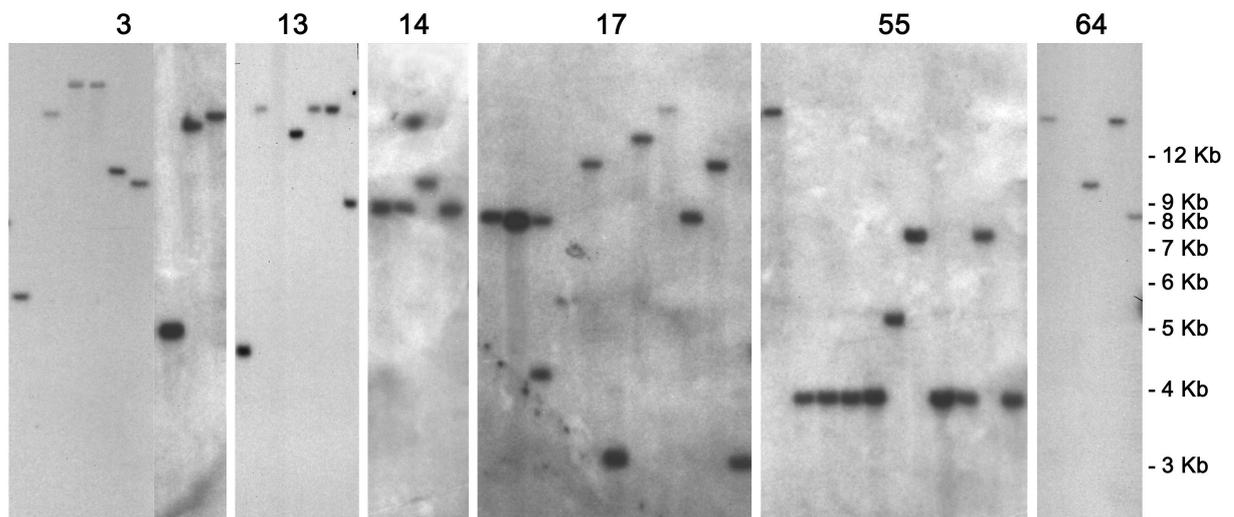
### 1.3. Frequenz und Unabhängigkeit der Transpositionereignisse

Insgesamt wurden 1.895.000 Pflanzen angezogen, aus denen 11.037 DS Pflanzen isoliert werden konnten (Tab. 3). Dies entspricht durchschnittlich einer Frequenz von 5,8 DS Pflanzen pro 1000 Samen (5,8 ‰). In den einzelnen 57 Starterlinien wurde jedoch eine sehr unterschiedliche Frequenz von DS Pflanzen beobachtet, von weniger als 1 bis 24 ‰ (Tab. 1). Linien, die sehr wenige DS Pflanzen lieferten, wurden nur zu Beginn des Projekts ausgebracht.

Linie	Dominante Mutationen	Angebaute Pflanzen pro Linie	DS Pflanzen pro Linie	Frequenz von DS Pflanzen (‰)	% Anteil an Population
3		100000	1179	11,8	10,7
10		60000	190	3,2	1,7
11		35000	177	5,1	1,6
12		7500	12	1,6	0,1
13	1	30000	102	3,4	0,9
14		60000	264	4,4	2,4
16		17500	67	3,8	0,6
17		22500	402	17,9	3,6
18		55000	50	0,9	0,5
22		32500	292	9	2,7
24		35000	357	10,2	3,2
28		20000	66	3,3	0,6
35		7500	177	23,5	1,6
36		12500	181	14,5	1,6
38	3	30000	356	11,9	3,2
41		12500	96	7,7	0,9
53		42500	349	8,2	3,2
55		25000	105	4,2	1
56		12500	5	0,4	0,1
61		42500	325	7,6	3
63		40000	248	6,2	2,2
64	2	67500	271	4	2,5
66		27500	293	10,7	2,7
32		200	200	1000	0
48		25000	65	2,5	<u>0,6</u>
					Σ 51

**Tabelle 1:** Übersicht angebauter und doppelt selektierter Pflanzen in ausgewählten Starterlinien. Für diese Linien ist die Frequenz von DS Pflanzen pro tausend Samen und ihr Gesamtanteil an der TAMARA Population angegeben.

Neben dem Vorteil eine hohe Zahl von DS Pflanzen zu generieren, wird die Qualität einer Starterlinie davon bestimmt wie unabhängig die Transpositionereignisse voneinander sind. Diese Unabhängigkeit wurde definiert als die Anzahl nicht-identischer Transpositionereignisse im Verhältnis zur Gesamtzahl der Ereignisse. Daher wurden an zufällig ausgewählten DS Pflanzen je einer Starterlinie *Southern* Analysen mit einer *dTAM* spezifischen Sonde durchgeführt (Abb. 4). Gleiche Fragmentlängen wurden als identische Transpositionereignisse betrachtet.



**Abbildung 4:** Genomische *Southern* Analysen von DS Pflanzen verschiedener TAMARA Starterlinien. Im *PstI* Verdau werden mit einer *BASTA* Sonde diskriminierende Fragmente detektiert (vgl. Abb. 1).

Linie	DS Pflanzen für Southern (iPCR*)	Insertionen (X)	unabhängige Insertionen (Y)	% Unabhängigkeit (X/Y*100)	Frequenz unabhängiger DS Pflanzen (‰)
3	18	18	15	83,3	9,8
10	3	3	2	66,7	2,1
11	7	7	3	42,9	2,2
12	7	13	9	69,2	1,1
13	28	31	18	58	2
14	5	5	3	60	2,6
16	8	9	6	66,7	2,6
17	11	12	8	66,7	11,9
18	6	6	4	66,7	0,6
22	4	4	3	75	6,7
24	9*	9	8	88,9	9,1
28	7	11	4	36,4	1,2
35	12*	12	3	25	5,9
36	4	4	2	50	7,2
38	10	12	8	66,7	7,9
41	19	19	1	5,3	0,4
53	10	10	7	70	5,7
55	11	11	4	36,4	1,5
56	8	10	7	70	0,3
61	7	7	4	57,1	4,4
63	7	7	2	28,6	1,8
64	18	18	13	72,2	2,9
66	7	7	3	42,9	4,6

**Tabelle 2:** Bestimmung der Unabhängigkeit für ausgewählte Starterlinien anhand von Daten aus *Southern* Analysen und iPCR Ergebnisse. Die geschätzte Frequenz unabhängiger DS Pflanzen pro tausend, ergibt sich aus der Frequenz von DS Pflanzen (Tab 1) relativ zur Unabhängigkeit.

Neben diesen *Southern* Experimenten gingen auch inverse PCR (iPCR) Experimente in die Kalkulationen mit ein (Dr. Anja Schneider, pers. Mitteilung), obwohl für so untersuchte Pflanzen nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie mehr als ein *dTAM* Element enthalten. Das Ergebnis der Analysen zeigt, dass die Unabhängigkeit der Linien im Einzelnen zwar unterschiedlich ist, aber die Mehrzahl der Starterlinien Transpositionsergebnisse mit einer Unabhängigkeit von mehr als 50 % liefert (Tab. 2). Linien mit geringer Unabhängigkeit wurden nur zu Anfang des Projekts angebaut (Linie 35 und 41 in Tab. 2). Linien mit einem großen Anteil unabhängiger Ereignisse und einer hohen Frequenz von DS Pflanzen (Linie 3, 17 oder 24), wurden beim Aufbau der TAMARA Population stärker berücksichtigt (Tab. 1 und Tab.2). Insgesamt repräsentieren die untersuchten Linien einen Anteil von 51 % der erzeugten DS Pflanzen. Anhand des jeweiligen Anteils einer Linie an der TAMARA Population und ihrer Unabhängigkeit wurde die Unabhängigkeit der Gesamtpopulation hochgerechnet und beträgt 63,6 % (Tab. 3). Da die meisten der untersuchten DS Pflanzen nur ein *dTAM* Element enthalten, wird die Gesamtzahl unabhängiger Ereignisse auf 7000 geschätzt.

Linienzahl Total	angebaute Pflanzen total	DS Pflanzen Total	Frequenz von DS Pflanzen (%)	% Unabhängigkeit (Hochrechnung)	Unabhängige Ereignisse (Hochrechnung)	Frequenz unabhängiger Ereignisse (%) (Hochrechnung)	Dominante Mutationen
57	1895000	11037	5,8	63,6	7020	3,7	6

**Tabelle 3:** Gesamtübersicht zur TAMARA Population.

#### 1.4. Dominante Mutationen

Unter den DS Pflanzen der TAMARA Population wurden insgesamt acht Pflanzen mit mutantern Phänotyp beobachtet. Um sie als dominante Mutation in der nächsten Generation zu verifizieren wurden sie gegen *Col-0* Wildtyp rückgekreuzt. Ein dominanter Phänotyp sollte im Verhältnis 1:1 mit der BASTA-Resistenz kosegregieren, wenn die ursprünglich isolierte Mutante nur ein *dTAM* Element besitzt und für das Element heterozygot ist. In diesen Kreuzungsanalysen zeigten zwei Mutationen keine Dominanz und der Phänotyp schien nicht an das *dTAM* Element gekoppelt zu sein. Daher wurden diese beiden Mutationen nicht weiter untersucht. Fünf Mutationen erwiesen sich als dominant und eine als semidominant. Die Frequenz dominanter Mutationen in der TAMARA Population beträgt damit ungefähr eine pro 2000 (0,55 %). Unter Berücksichtigung der Unabhängigkeit liegt die Frequenz mit ungefähr einer dominanten Mutation unter 1000 jedoch deutlich höher (0,86 %). Interessanterweise wurde die Mehrzahl der Mutationen in den Starterlinien 38 und 64 identifiziert (Tab. 1).

Für vier der identifizierten dominanten Mutationen wurde die Anzahl vorhandener *dTAM* Elemente durch *Southern* Experimente ermittelt und die Insertionsstelle durch iPCR bestimmt. Hierzu wurde genomische DNA der Mutanten mit Restriktionsendonukleasen verdaut, die in Nähe der Enden des *dTAM* Elements schneiden und kurze Fragmente liefern (200- 500 Bp). Nach Autoligation der Fragmente wurden flankierende Sequenzen durch PCR mit *dTAM*-spezifischen Primern isoliert.

Nach Veröffentlichung der *Arabidopsis*-Genomsequenz (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) ließen sich die Positionen der Insertionen durch Sequenzvergleiche der PCR Fragmente mit der Datenbank des *Arabidopsis* Genomprojekts bestimmen (TAIR Datenbank). In T-DNA Aktivierungsmutagenesen, in denen ebenso ein Tetramer des 35S Enhancers zur Erzeugung dominanter Mutationen verwendet wurde, wurde gezeigt, dass stets die unmittelbar benachbarten Gene von der Überexpression betroffen waren und der Abstand der Insertion zum aktivierten Gen nicht mehr als vier bis fünf Kb betrug (Weigel *et al.*, 2000). Daher wurden vor allem Gene in Nachbarschaft zur *dTAM* Insertion als Kandidatengene angesehen, deren Überexpression im dominanten Phänotyp resultieren.

Im Folgenden wird die Charakterisierung der *dTAM* Insertion und des Phänotyps für vier der dominanten Mutationen dargestellt. Für die dominante Mutation *Dornröschen-1D* (Kapitel 2) wurde darüberhinaus eine Analyse des von der ektopischen Überexpression betroffenen Gens durchgeführt.

#### 1.4.1. *Pistillata-1D*

In der *pistillata-1D* (*pi-1D*) Mutation sind die äußeren Blütenorgane verändert (Abb. 5B und 5C). Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5A) umschließen die Kelchblätter (Sepalen) nicht eng die Kronblätter (Petalen), sondern stehen ab. Die deutlichste Veränderung betrifft die Pigmentierung der Sepalen, die nicht einheitlich grün, sondern weiß-grün gefärbt sind. In *pi-1D* besitzen die Sepalen damit petaloide Charakter, da eine partielle homöotische Konversion der Sepalen zu Petalen stattgefunden hat.



**Abbildung 5:** Beschreibung des *pi-1D* Phänotyps. Im Vergleich zum Wildtyp (A), stehen die Sepalen in *pi-1D* von der Blüte ab (B), und zeigen petaloide Merkmale (C). Wie die genomische *Southern* Analyse zeigt, sind in der isolierten Mutante zwei *dTAM* Elementen vorhanden.

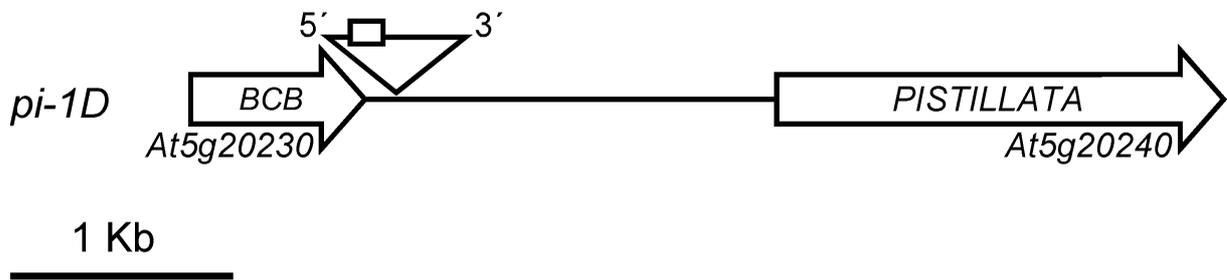
Größenvergleich: weiße Balken 2 mm

In Kreuzungsanalysen wurde demonstriert, dass *pi-ID* eine dominante Mutation darstellt und die *Southern* Analyse ergab, dass zwei *dTAM* Elemente anwesend waren (Abb. 5C). Obwohl die beiden Elemente zunächst nicht durch Rückkreuzung voneinander getrennt werden konnten, wurden iPCR Experimente mit genomischer DNA der Mutante durchgeführt. Die Analyse der flankierenden DNA Sequenzen ergab, dass in *pi-ID* ein *dTAM* Element auf Chromosom 5 bei 31 cM transponiert wurde. In unmittelbarer Nachbarschaft zum *dTAM* Element befindet sich ein Gen, das ein Kupfer-bindendes Protein kodiert (Blue-Copper-Binding protein, BCB) und Schwermetalltoleranz vermittelt (Ezaki *et al.*, 2001). In einer Entfernung von 1,7 Kb zum 3' Ende des *dTAM* Elements und 4,5 Kb zum Enhancertetramer ist das Blütenidentitätsgen *PISTILLATA* lokalisiert (Tab. 4 und Abb. 6), das einen Transkriptionsfaktor der MADS-Box Familie kodiert (Purugganan *et al.*, 1995; Riechmann und Meyerowitz, 1997). Mutationen des *PISTILLATA* Gens führen zur homöotischen Transformation von Petalen zu Sepalen, und Stamen zu Karpellen (Coen und Meyerowitz, 1991; Goto und Meyerowitz, 1994).

Die konstitutive Überexpression von *PISTILLATA* unter Kontrolle des 35S Promoters führt zur partiellen Konversion von Sepalen zu Petalen (Krizek und Meyerowitz, 1996), wie sie auch in *pi-ID* beobachtet wird. Daher kann angenommen werden, dass die homöotische Transformation in *pi-ID* auf eine ektopische Fehlexpression des *PISTILLATA* Gens infolge der *dTAM* Insertion zurückzuführen ist.

Mutation aus Linie	<i>pistillata-ID</i> (pi-1D) aus 38
Phänotyp	dominant:
Position <i>dTAM</i>	NC_003076 Chromosom 5 (Bp 6825510) // BAC F5O24 (Bp 31910) // ~46 cM
Orientierung <i>dTAM</i>	5'-3'
benachbartes Gen	At5g20230: BCB-blue copper binding (Kupfer-bindend)
Position	NC_003076 Chromosom 4 (+6824629...6825411) // BAC F5O24 (+31029...31811)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	1,8 Kb
benachbartes Gen	At5g20240: PISTILLATA (MADS Box)
Position	NC_003076 Chromosom 4 (+6827206...6829211) // BAC F5O24 (+33606...35611)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	4,5 Kb

**Tabelle 4:** Die Zusammenfassung zu *pi-ID* zeigt die Position der *dTAM* Insertion und flankierender Gene.



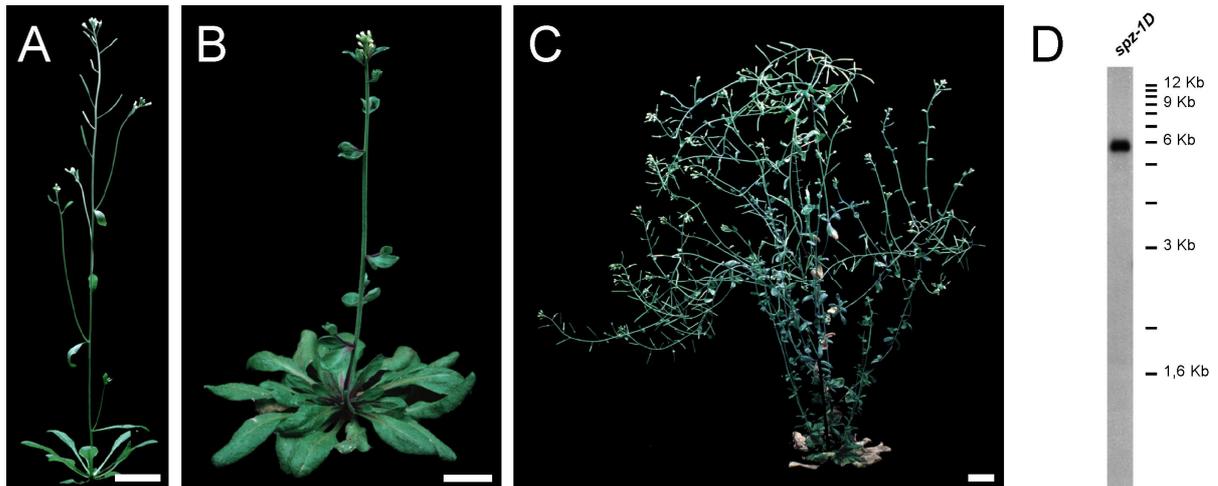
**Abbildung 6:** Graphische Darstellung zur Lokalisation des *dTAM* Elements in *pi-1D*. Die Position des Dreiecks beschreibt die Insertionsstelle und die Orientierung des Elements.

### 1.4.2. Spätzünder-1D

In der *spätzünder-1D* (*spz-1D*) Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 7A) unter Langtagbedingungen ein verspäteter Blühzeitpunkt zu beobachten (Abb. 7B). Mutante Pflanzen beginnen erst nach der Bildung von 45- 50 Rosettenblättern zu blühen (77 untersuchte Pflanzen), wohingegen im Wildtyp bereits nach 10- 12 Blättern die Hauptinfloreszenz sichtbar wird (77 untersuchte Pflanzen). Wie für bereits beschriebene spätblühende Mutationen (Korneef *et al.*, 1991), wird in *spz-1D* eine Vielzahl von Infloreszenzen zweiter und höherer Ordnung gebildet (Abb. 7C), und die Lebensphase ist insgesamt verlängert (18 Wochen im Vergleich zu 6 Wochen im Wildtyp). Eine weitere morphologische Veränderung in *spz-1D* betrifft die Länge des Hypokotyls nach der Keimung. Während in Wildtyppflanzen unter Kurztagbedingungen 14 Tage nach Keimung die Länge des Hypokotyls durchschnittlich 10,9 mm beträgt ( $\pm 0,9$  mm bei 32 untersuchten Pflanzen), ist die Hypokotyllänge in *spz-1D* mit 19,7 mm ( $\pm 1,4$  mm bei 32 untersuchten Pflanzen) deutlich erhöht. Vergleichbare Unterschiede wurden auch unter Langtagbedingungen beobachtet (nicht dargestellt).

Nachkommen der Selbstung von *spz-1D*, aber auch der Rückkreuzung gegen Wildtyp waren BASTA-resistent. Interessanterweise blühten Pflanzen der Rückkreuzung leicht zeitlich verzögert und bildeten durchschnittlich 15 bis 17 Rosettenblätter vor der Blüte (77 untersuchte Pflanzen). Im Vergleich zum Wildtyp war das Hypokotyl dieser Pflanzen im Kurztag 14 Tage nach Keimung ebenfalls elongiert (14,1 mm  $\pm 0,9$  mm bei 32 untersuchten Pflanzen).

Die Southern Analyse ergab, dass in *spz-ID* nur ein *dTAM* Element anwesend ist (Abb. 7D). Aus den beschriebenen Beobachtungen wurde geschlossen, dass *spz-ID* eine semidominante Mutation darstellt. Da das *spz-ID* Allel somit als homozygote Mutation isoliert wurde, hat das verantwortliche Transpositionsereignis wahrscheinlich bereits zwei Generationen zuvor ( $T_0$ -Generation) stattgefunden.



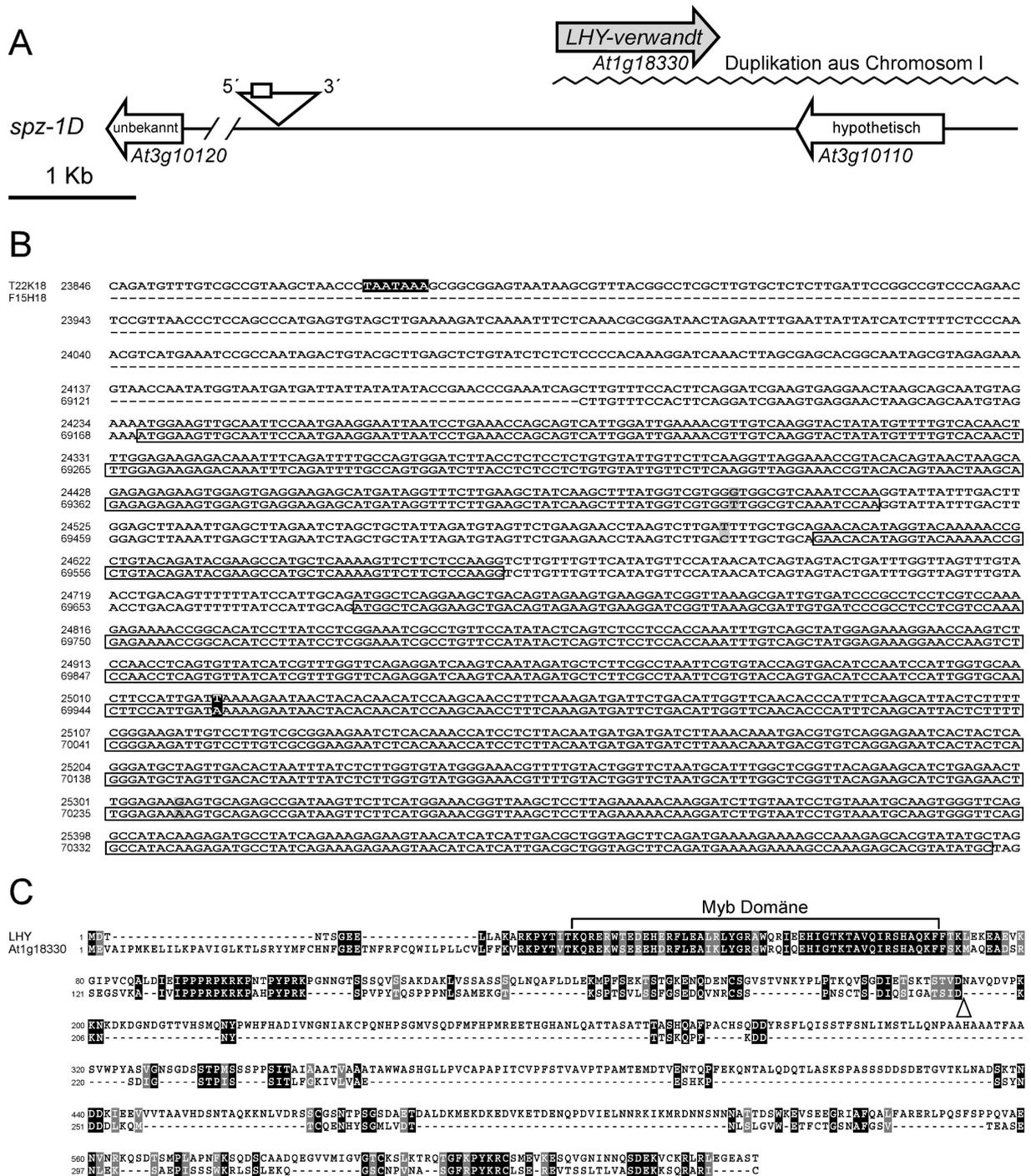
**Abbildung 7:** Phänotyp der *spz-ID* Mutation. Während der Wildtyp (A) nach 6- 8 Rosettenblättern eine Infloreszenz bildet, ist *spz-ID* (B) stark spätblühend und besitzt als adulte Pflanzen (C) eine Vielzahl sekundärer Infloreszenzen. Nach EcoRV Verdau und Hybridisierung mit einer *dTAM* spezifischen Sonde zeigt die genomische Southern Analyse (D) die Anwesenheit nur eines Elements in der Mutante.

Größenvergleich: weiße Balken 20 mm

Mutation aus Linie	<i>spätzünder-ID (spz-ID)</i> aus 13
Phänotyp	semidominant:
Position <i>dTAM</i>	NC_003074 Chromosom 3 (Bp 3121467) // BAC T22K18 (Bp 22077) // ~13 cM
Orientierung <i>dTAM</i>	5'-3'
benachbartes Gen	At3g10120: unbekanntes Protein
Position	NC_003074 (+3130180...3130683) // BAC T22K18 (-13364... 12861)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	9,6 Kb
benachbartes Gen	At3g10110: hypothetisches Protein
Position	NC_003074 (+3116232...3118347) // BAC T22K18 (-27312...25197)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	8 Kb
benachbartes Gen	3,5 Kb Duplikation aus Chromosom 1 enthält At1g18330 (verkürzt): CCA1/LHY-verwandt (MYB)
Position	NC_003074 (-3119307...3118047) // BAC T22K18 (+24237...25497)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	4,9 Kb

**Tabelle 6:** Die Zusammenfassung zu *spz-ID* zeigt die Position der *dTAM* Insertion und flankierender Gene.

Die Sequenz des iPCR Fragments zeigte, dass in *spz-1D* ein *dTAM* Element auf Chromosom 3 bei 17 cM auf BAC T22K18 insertiert ist (Tab. 6). Die das Element flankierenden Gene kodieren ein unbekanntes und ein hypothetisches Protein, wobei der Abstand des Enhancertetramers zum Beginn der kodierenden Region mit 9,6 bzw. 8 Kb für beide Gene groß ist. Interessanterweise befindet sich im Abstand von 4,9 Kb zum Enhancertetramer eine 3,5 Kb große Duplikation aus BAC F15H18 (Chromosom 3) mit einer Sequenzidentität von 98 % (Abb. 8A). Der duplizierte Abschnitt kodiert in BAC F15H18 einen putativen Transkriptionsfaktor der Myb-Familie (*At1g18330*). Der Vergleich der genomischen Sequenz von *At1g18330* und der duplizierten Region auf Chromosom 3 zeigt, dass die Homologie 50 Bp stromaufwärts der kodierenden Sequenz endet (Abb. 8B). Damit fehlen in T22K12 der Promoterbereich von *At1g18330*, und wahrscheinlich auch Teile der 5' untranslatierten Region. Allerdings wird 360 Bp stromaufwärts der „kodierenden“ Region der Duplikation eine mögliche TATA Box prognostiziert (Abb. 8B; *GeneFinder*, Sanger Zentrum). Aufgrund eines Basenaustauschs, der zu einem Stoppcodon führt, könnte ein mögliches Transkript nur ein stark verkürztes Protein kodieren (Abb. 8B).

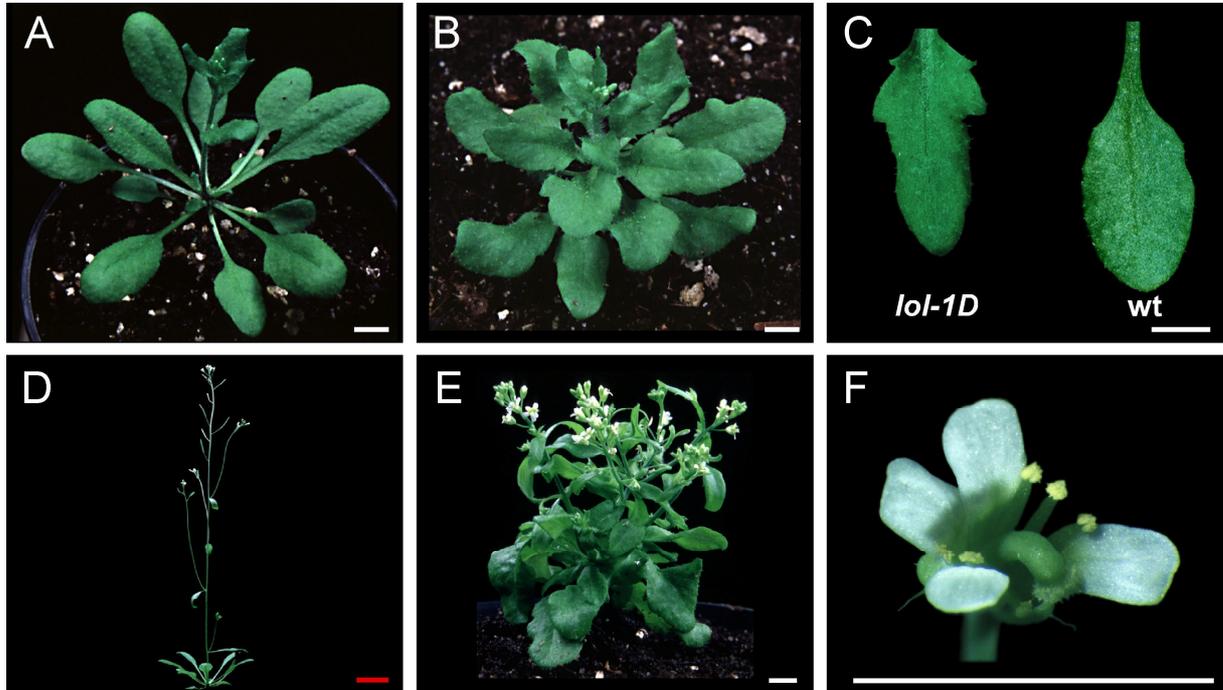


**Abbildung 8:** Graphische Darstellung zur Lokalisation des *dTAM* Elements in *spz-1D* (A). Die Position des Dreiecks beschreibt die Insertionsstelle und die Orientierung des Elements. Für die Duplikation in BAC T22K18 ist die Exon-Intron Struktur von At1g18330 aus F15H18 ohne Promotersequenzen angegeben (B). Eine mögliche TATA-Box in T22K12 ist schwarz hervorgehoben. Ebenso hervorgehoben ist ein Basenaustausch, der einen Translationsstop hervorrufen würde. Grau markierte Basen kennzeichnen Austausche ohne Wirkung. Im Aminosäurevergleich von At1g18330 und LHY (C) ist die MYB Domäne hochkonserviert. Die Markierung kennzeichnet den mutmaßlichen Translationsabbruch in *spz-1D*.

At1g18330 enthält als DNA bindendes Motiv eine einzelne Myb-Domäne (Baranowskij *et al.*, 1994; Martin und Paz-Ares, 1997) und besitzt Ähnlichkeit zu den nah verwandten Proteinen CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) und LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) (Wang *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 1998). Die Ähnlichkeit von At1g18330 zu LHY betrifft vor allem die Myb Domäne (96 %), weiterhin eine sich anschließende Prolin-reiche Region und das C-terminale Ende des Proteins (Abb. 8C). Über weite Bereiche sind die Proteine jedoch unterschiedlich, wobei der Größenunterschied zwischen den Proteinen auffällig ist (At1g18330 361 und LHY 645 Aminosäuren). Für At1g18330 und CCA1, finden sich Verwandtschaften in den gleichen Bereichen wie für LHY (nicht dargestellt). Sowohl die Überexpression von *LHY* als auch von *CCA1* führen unabhängig von der Tageslänge zu spätblühenden Phänotypen, zur Elongation des Hypokotyls und der Fehlregulation von Genen, die dem circadianen Rhythmus unterliegen (Alabadi *et al.*, 2001; Wang und Tobin, 1998). Die Sequenzverwandtschaft zwischen At1g18330 und CCA1 bzw. LHY legt die Vermutung nahe, dass auch At1g18330 an der Regulation der circadianen Uhr beteiligt sein könnte und eventuell überlappende Funktionen zu CCA1 oder LHY besitzt. Die Überexpression eines verkürzten Duplikats von *At1g18330* in *spz-1D* könnte zur Fehlregulation circadian regulierter Gene und zu einem verspäteten Blühzeitpunkt führen. Ob das verkürzte Duplikat von *At1g18330* im Wildtyp oder in *spz-1D* exprimiert wird, wurde hier nicht näher analysiert, ist aber Gegenstand derzeitiger Untersuchungen (Dr. G. Coupland MPIZ Köln, in Bearbeitung).

### 1.4.3. *Lollo-1D*

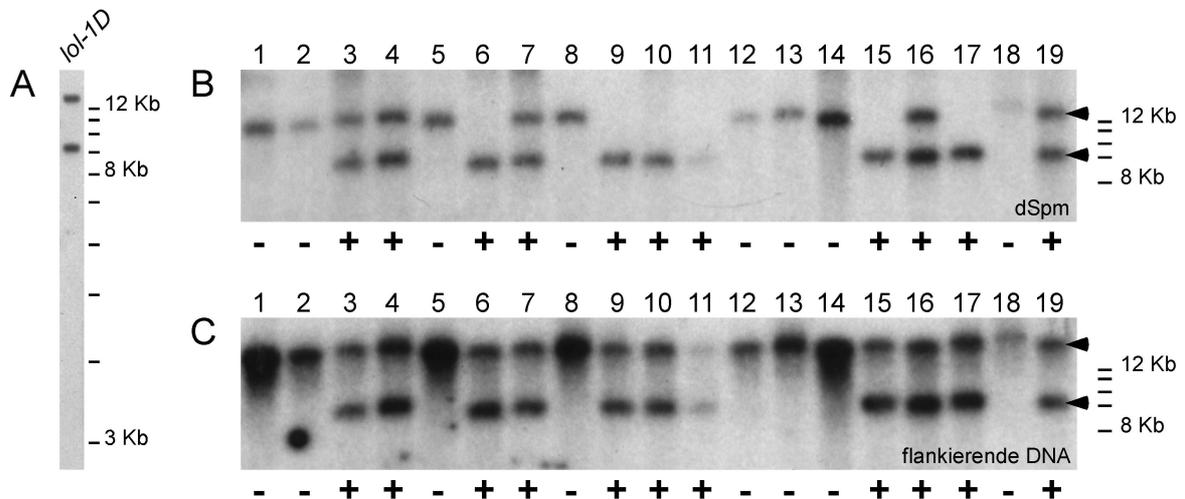
In der dominanten Mutation *lollo-1D* (*lol-1D*) ist im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Abb. 9A) die Blattform verändert. Die Rosettenblätter sind gewellt (italienisch: lollo), entlang der Längsachse verdreht, und die Blattränder sind stärker eingebuchtet als Wildtypblätter (Abb. 9B/C). Zusätzlich sind die Petiolen reduziert. Die Hochblätter zeigen im Vergleich zu den Rosettenblättern keine veränderte Form. Insgesamt ist der Habitus von *lol-1D* kleinwüchsig und gedrungen (Abb. 9E), da die Internodien der Infloreszenzen kürzer als im Wildtyp sind (Abb. 9D) und in der späten Blühphase keine apikale Dominanz erkennbar ist. Auch die Blütenmorphologie ist von der Mutation betroffen, da der Pistil häufig geknickt ist (Abb. 9F). Dies führt bei Selbstung zu verringerter Fertilität, da Staubbeutel und Stempel sich nicht unmittelbar berühren. Die Organe der äußeren beiden Blütenkreise zeigen keine veränderte Morphologie.



**Abbildung 9:** Morphologie des Wildtyps und *lol-1D*. Wildtyp (A) und *lol-1D* (B) unterscheiden sich 25 Tage nach Keimung durch die Blattmorphologie, wie der Vergleich (C) der Rosettenblätter zeigt. Der adulte Wildtyp (D) und *lol-1D* (E): Die Mutante ist zwergwüchsig. In Blüten der *lol-1D* Mutation (F) ist der Pistill stark gekrümmt.

Größenvergleich: weiße Balken 5 mm, rote Balken 20 mm

Die *Southern* Analyse ergab, dass in der isolierten Mutante zwei *dTAM* Elemente vorhanden sind (Abb. 10A). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Selbstung bzw. Rückkreuzung überein, da nicht die Segregationsverhältnisse von 3:1 bzw. 1:1 beobachtet wurden, und neben Pflanzen mit mutantern Phänotyp, auch wildtypische, ungekoppelte BASTA-resistente Pflanzen auftauchten. Die aus der Rückkreuzung stammenden Pflanzen wurden zur Kosegregationsanalyse genutzt (Abb. 10B). Pflanzen mit *lol-1D* Phänotyp (in Abb. 10 mit + gekennzeichnet) zeigen im *Southern*-Experiment stets ein Hybridisierungssignal bei 9 Kb, wenn eine *dTAM* spezifische Probe benutzt wird. Mit genomischer DNA aus Pflanzen, in denen nur das mit dem *lol-1D* Phänotyp kosegregierende *dTAM* Element anwesend war, wurden anschließend flankierende Sequenzen durch iPCR isoliert. Die Hybridisierung des Kosegregationsfilters mit der flankierenden DNA demonstriert die Identität des isolierten Abschnitts, da ein 9 Kb Fragment nur für *lol-1D* positive Pflanzen detektiert wird (Abb. 10C). Das hochmolekulare Signal in Abb. 10C repräsentiert das wildtypische Fragment.

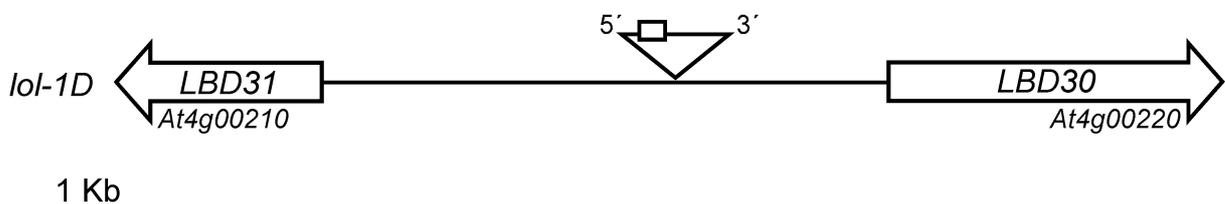


**Abbildung 10:** Das *Southern* Experiment mit genomischer DNA der *lol-1D* Mutante (A) zeigt bei *Pst* I Restriktion und Hybridisierung mit einer *dSpm* spezifischen Sonde die Anwesenheit von zwei *dTAM* Elementen. Kosegregationsanalyse: Nach Rückkreuzung gegen den Wildtyp wurden nach BASTA-Behandlung phänotypisch auffällige (+) und wildtypische (-) Pflanzen in *Southern* Experimenten verglichen. Bei Hybridisierung mit einer *dTAM* spezifischen Sonde (B) zeigen Pflanzen mit *lol-1D* Phänotyp ein Signal bei 9 Kb. Wird die durch iPCR isolierte flankierende DNA als Probe benutzt (C), wird ein Fragment der gleichen Laufhöhe in mutanten Pflanzen detektiert.

Die Position der *dTAM* Insertion in *lol-1D* befindet sich auf Chromosom 4 (Tab. 7 und Abb. 11). Die benachbarten Gene At4g00210 und At4g00220 kodieren die zueinander verwandten Proteine LBD30 und 31 (Lateral organ Boundary Domain), die eine Ähnlichkeit von 60 % besitzen. Gemeinsames Merkmal der LBD Proteine ist die LOB Domäne, für die bislang keine Funktion bekannt ist. Da diese Proteinfamilie erst kürzlich erstmalig charakterisiert wurde, ist nur wenig über die einzelnen Vertreter bekannt (Shuai *et al.*, 2002). Ob die Überexpression eines der Gene zum *lol-1D* Phänotyp führt, wurde nicht näher untersucht. Jedoch führt die konstitutive Überexpression des namensgebenden *LOB* Gens zu Veränderungen der Blattmorphologie (Shuai *et al.*, 2002). *LOB* besitzt zu LBD30 eine Sequenzähnlichkeit von 57%, und zeigt zu LBD 31 eine Verwandtschaft von 66 %.

Mutation aus Linie	<i>lollo-1D (lol-1D)</i> aus 38
Phänotyp	dominant: Rosettenblätter gewellt; Zwergwuchs
Position <i>dTAM</i>	NC_003075 Chromosom 4 (Bp 87944) // BAC F6N15 (Bp 82806) // ~1 cM
Orientierung <i>dTAM</i>	5'-3'
benachbartes Gen	At4g00210: LOB domain Protein 31 (LBD 31)
Position	NC_003075 Chromosom 4 (-84693...85888) // BAC F6N15 (-79555...80750)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	2,9 Kb
benachbartes Gen	At4g00220: LOB domain Protein 30 (LBD 30)
Position	NC_003075 Chromosom 4 (+89147...91087) // BAC F6N15 (+84009...85949)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	4 Kb

**Tabelle 7:** Die Zusammenfassung zu *lol-1D* zeigt die Position der *dTAM* Insertion und flankierender Gene.

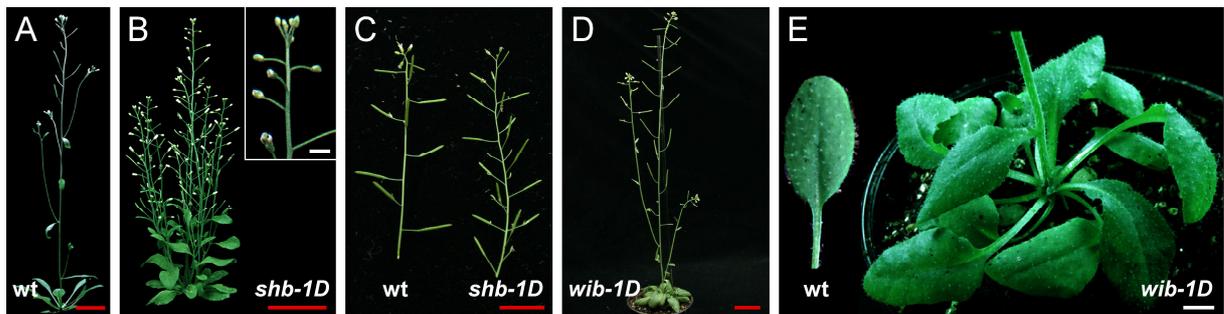


**Abbildung 11:** Graphische Darstellung zur Lokalisation des *dTAM* Elements in *lol-1D*. Die Position des Dreiecks beschreibt die Insertionsstelle und die Orientierung des Elements.

#### 1.4.4. *Wirbel-1D* und *Shrubby-1D*

Die Mutationen *shrubby-1D (shb-1D)* und *wirbel-1D (wib-1D)* wurden unter DS Pflanzen der Starterlinien 38 (*shb-1D*) und 64 (*wib-1D*) erst spät während des Aufbaus der TAMARA Population identifiziert. Daher wurden sie nicht hinsichtlich der Anzahl und Lokalisation anwesender *dTAM* Elemente untersucht. In Kreuzungsanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Mutationen sich strikt dominant verhalten. Die *shb-1D* Pflanzen zeigen ein mildes Zwergwachstum und einen buschigen (englisch: shrubby) Habitus, da die Hauptinfloreszenz im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 12A) kürzer ist und eine Vielzahl von sekundären Infloreszenzen gebildet wird. (Abb. 12B). Hierbei ist die Länge der Internodien der Infloreszenzen häufig geringer als im Wildtyp (Abb. 12C). Die Blüten der *shb-1D* Mutante zeigen keine veränderte Organanzahl, erscheinen jedoch kleiner als wildtypische Blüten (Abb. 12B). Solche Blüten öffnen sich häufig nicht vollständig und bilden keinen reifen Pollen. Daher enthalten die Schoten keine oder nur eine reduzierte Zahl von Samen, d.h. *shb-1D* ist nur eingeschränkt fertil (Abb. 12C).

In der *wib-1D* Mutation ist die Morphologie der Blätter verändert, wobei der Phänotyp erst in adulten Rosettenblättern deutlich erkennbar wird. Im Gegensatz zu Blättern des Wildtyps sind die Rosettenblätter von *wib-1D* leicht eingerollt (Abb. 12E). Die Mittelachse, die von der Petiole und der Mittelrippe gebildet wird, ist im Uhrzeigersinn gedreht (Abb. 12E). Die Mutation ist auf die Blattmorphologie beschränkt und führt nicht zu veränderten Blütenorganen.



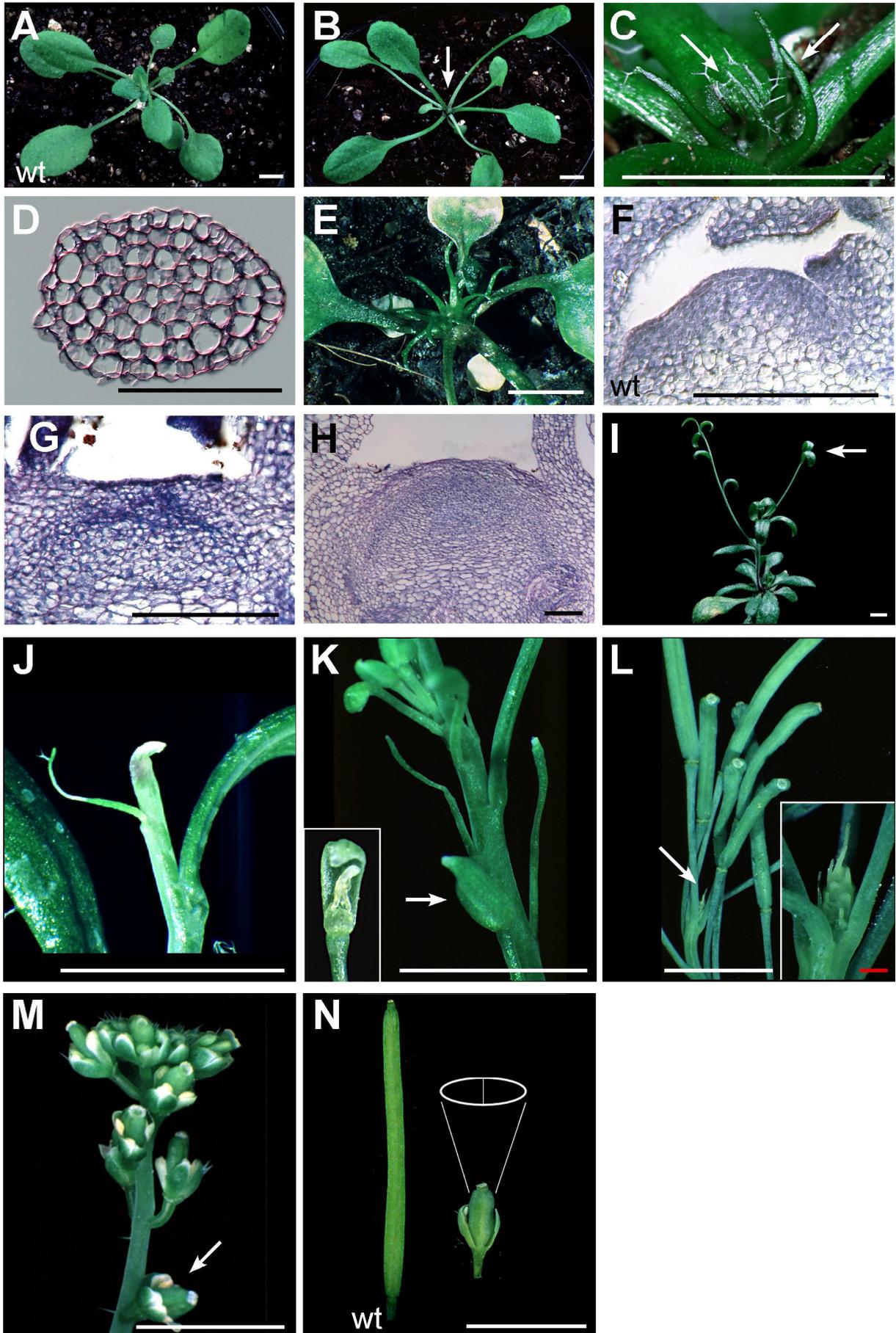
**Abbildung 12:** Phänotyp der *shb-1D* und *wib-1D* Mutationen. Der adulte Wildtyp (A) besitzt eine Hauptinfloreszenz, von der wenige sekundäre Infloreszenzen ausgehen. In *shb-1D* (B) ist die Anzahl sekundärer Infloreszenzen erhöht, und verleihen der Zwergmutante ein buschiges Aussehen. Die Blüten sind klein und nur reduziert fertil. Auch die Internodien sind im Vergleich zum Wildtyp verkürzt (C). In *wib-1D* entspricht die Größe der adulten Pflanzen dem Wildtyp (D). Die während der vegetativen Phase gebildeten Rosettenblätter sind im Vergleich zu wildtypischen Blättern verdreht (E).

Größenvergleich: weiße Balken 5 mm; rote Balken 20 mm

## 2. DORNRÖSCHEN

### 2.1. Phänotyp der *Dornröschen-1D* Mutation

Die aus der TAMARA Starterlinie 64 isolierte Mutation *Dornröschen-1D* (*drn-1D*) führt zum Verlust der Meristemaktivität im vegetativen Meristem, Infloreszenzmeristem und in floralen Meristemen. In Keimlingen stellt das SAM seine normale Aktivität nach Bildung von 6 bis 7 Rosettenblättern ein (Abb. 13B). Während im Wildtyp (Abb. 13A) weitere Blätter das SAM umschließen, vergrößert sich in *drn-1D* das SAM und produziert in unregelmäßigen Zeitabständen von einigen Tagen bis Wochen reduzierte Blattorgane in Form von nadelförmigen mit Trichomen besetzten Appendices (Abb. 13C). Bei einem nur wenige Tage dauernden Entwicklungsstopp sind früh initiierte Filamente trichomarm, während spät gebildete viele Trichome tragen (Abb. 13C). Im Wildtyp zeigt die Blattunterseite (abaxial) der ersten Blätter der juvenilen Lebensphase keinen Trichombesatz, während späte Blätter (adulte Lebensphase) unter Langtagbedingungen an ihrer Blattunterseite Trichome tragen (Telfer *et al.*, 1997). Daher weist der zunehmende Trichombesatz der Filamente in *drn-1D* darauf hin, dass es sich um abaxialisierte Blattorgane handelt. Der histologische Querschnitt zeigt eine Radialisierung dieser Filamente, wobei die Leitbündelelemente Xylem und Phloem fehlen (Abb. 13D). Um zu prüfen, ob der vegetative Entwicklungsstopp in *drn-1D* von der Tageslänge abhängig ist, wurden mutante Pflanzen im Kurztag herangezogen. Unter diesen Bedingungen zeigen sich jedoch keine Unterschiede zu Langtagpflanzen (Abb. 13E). Dass die Filamente nicht mit Trichomen besetzt sind, deckt sich mit der Erwartung für Wildtyppflanzen, da unter Kurztagbedingungen länger juvenile Blätter produziert werden (Telfer *et al.*, 1997). Die Analyse histologischer Querschnitte zeigt, dass sich das mutierte SAM in *drn-1D* in zwei Schritten entwickelt: Zehn Tage nach Keimung ist das SAM in *drn-1D* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13F) abgeflacht und ein apikaler Dom mit sich erhebenden Blattprimordien fehlt (Abb. 13G). Die charakteristische Strukturierung in L1, L2 und L3 Zellschichten ist aufgehoben. Anschließend vergrößert sich das SAM stark und zeigt in älteren *drn-1D* Pflanzen eine Neuorganisation, in der sich kugelförmig eine Population sehr vieler, kleiner und cytoplasmareicher Zellen unterhalb mehrerer Schichten vakuolisierter Zellen befindet (Abb. 13H).



**Abbildung 13:** Phänotyp der *drn-1D* Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Während im wildtypischen Keimling die jüngsten Blätter das SAM umschließen (A), stellt in *drn-1D* das Meristem seine normale Aktivität nach Bildung weniger Blätter ein (B). Das aberante SAM vergrößert sich und wird von trichombesetzten Filamenten umgeben (C), die im histologischen Querschnitt (Delafield) eine Radialisierung zeigen (D). Der *drn-1D* Phänotyp ist nicht von der Tageslänge abhängig (E). Im Vergleich des vegetativen SAM des Wildtyps (F) und der *drn-1D* Mutante (G+H) anhand longitudinaler Schnitte (Delafield), ist das SAM der *drn-1D* Mutante 10 Tage nach Keimung (G) abgeflacht und eine Strukturierung in L1, L2 und L3 Schicht fehlt. Nach 21 Tagen (H) ist das SAM stark vergrößert und mehrere Schichten hochvakuolisierter Zellen umgeben zentral eine Vielzahl kleiner cytoplasmareicher Zellen. Sekundäre Meristemaktivität kann die Bildung von Infloreszenzprossen ermöglichen (I). Die Nahaufnahme zeigt jedoch auch hier Reduktion lateraler Blattoorgane und die Arretierung des Infloreszenzmeristems (J). Werden in *drn-1D* Infloreszenzen gebildet, zeigen die Blüten morphologische Defekte: Reduktion der Blüten zu nadelförmigen Filamenten oder Fehlen der inneren Blütenorgane (K). Deformationen in der Fruchtentwicklung: Gekrümmte Schoten (L) und gestauchte/verbreiterte Schoten geringer Fertilität (M+L).

Größenvergleich: weiße Balken 5 mm, rote Balken 1 mm, schwarze Balken 100  $\mu\text{m}$

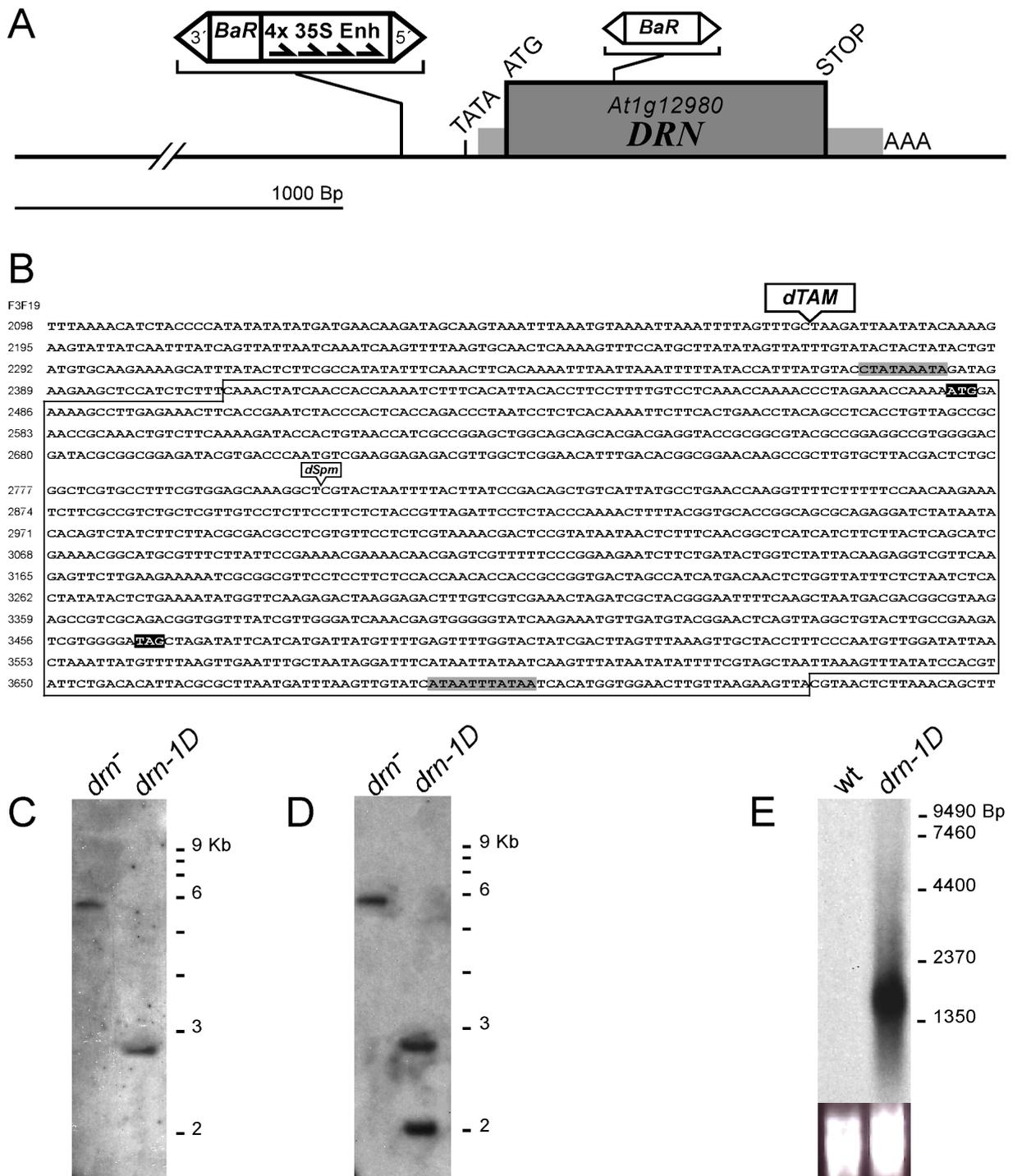
Oft erst nach vielen Wochen bilden mutante Pflanzen sekundäre Infloreszenzprosse aus, die einige Tragblätter formen, dann aber häufig ebenso arretieren wie das primäre SAM (Abb. 13I/J). Werden von *drn-1D* Pflanzen Blüten gebildet, sind diese oft zu nadelförmigen Filamenten reduziert oder die inneren Blütenorgane fehlen (Abb. 13K). Nach Bildung einiger Appendices verliert das Infloreszenzmeristem erneut seine Aktivität (Abb. 13L). Ungefähr 10% der *drn-1D* Infloreszenzen sind gestauchte, haben kurze Internodien und bilden Blüten mit kurzen Sepalen und Petalen (Abb. 13M, 14N). Die Schoten dieser Blüten sind stark verkürzt, jedoch lateral zur Mittelachse verbreitert und tragen nur wenige Samen. Fertile Blüten produzieren gekrümmte Schoten (Abb. 13 L).

## 2.2. Analyse des *Dornröschen-1D* Allels

Im ersten Schritt der Analyse sollte ermittelt werden, ob *drn-1D* eine Funktionsgewinnmutante darstellt. Die dazu durchgeführte Rückkreuzung und Selbstung ergab, dass der *drn-1D* Phänotyp im Verhältnis 1:1 und 3:1 an die nächste Generation vererbt wird, und mit der BASTA-Resistenz kosegregiert. Die *drn-1D* Mutation verhält sich also strikt dominant. Im *Southern* Experiment mit einer *dTAM* spezifischen Probe wurde gezeigt, dass in der Mutante nur ein *dTAM* Element anwesend ist (Abb. 14C). Durch iPCR mit Primern des *dTAM* Elements wurden flankierende genomische Sequenzen isoliert. Bei Hybridisierung des zuvor benutzten Filters mit diesem genomischen Abschnitt wird ein Signal der gleichen Laufrhöhe wie bei *dTAM*-spezifischer Hybridisierung detektiert. Da die für das *Southern* Experiment eingesetzte genomische DNA aus einer heterozygoten *drn-1D* Pflanze stammt, wird auch das wildtypische Restriktionsfragment bei 2 Kb markiert (Abb. 14D).

Mutation aus Linie	<i>dornröschen-1D</i> (drn-1D) aus 64
Phänotyp	dominant:
Position <i>dTAM</i>	NC_003070 Chromosom 1 (Bp 4429486) // BAC F3F19 (Bp 2175) // ~13 cM
Orientierung <i>dTAM</i>	3'-5'
benachbartes Gen	At1g12980: AP2/ERF Faktor
Position	NC_003070 Chromosom 1 (+4429792...4430778) // BAC F3F19 (+2481...3467)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	1,2 Kb
benachbartes Gen	At1g12970: unbekanntes Protein
Position	NC_003070 Chromosom 1 (+4423728...4425633) // BAC F13F23 (+70545...72450)
Entfernung Enhancer in <i>dTAM</i> zu Beginn kodierender Region	8,6 Kb

**Tabelle 8:** Die Zusammenfassung zu *drn-1D* zeigt die Position der *dTAM* Insertion und flankierender Gene.



**Abbildung 14:** Graphische Darstellungen zur Lokalisation und Orientierung des *dTAM* Elements in *drn-1D* und im Funktionsverlustallel *drn<sup>-</sup>* (A+B). 5' und 3' UTR von *DRN* wurden durch graue Balken gekennzeichnet (A) oder als Kästen hervorgehoben (B). Die Position der TATA Box und des Polyadenylierungssignals wurden grau unterlegt (B), während der Translationsstart und -stop schwarz markiert wurden. Im *Southern* Experiment mit *EcoR* V geschnittener genomischer DNA des Funktionsverlustalles und *drn-1D* wird durch Hybridisierung mit einer *dSpm* spezifischen Sonde gezeigt, dass jeweils nur ein Element anwesend ist (C). Wird der Filter mit den 3' terminalen 300 Bp der kodierenden Region von *DRN* hybridisiert (D), wird für das homozygote Funktionsverlustallel ein Signal identischer Laufhöhe detektiert, während für *drn-1D* zusätzlich das wildtypische Fragment markiert wird. Das *Northern* Experiment (E) mit je 10 µg Gesamt RNA aus Keimlingen zeigt bei Hybridisierung mit einer *DRN* spezifischen Sonde im Wildtyp kein Signal, während für *drn-1D* die Transkription deutlich erhöht ist. Als Ladungskontrolle wurde die Ethidiumbromid Färbung verwendet.

Die Datenbankanalyse der iPCR Fragmente ergab, dass das *dTAM* Element ungefähr bei 13 cM auf Chromosom 1 inseriert ist. Die Organisation der Insertionsstelle und der genomischen Region ist in Tabelle 7 und Abbildung 14A und 14B dargestellt. In unmittelbarer Nachbarschaft zur Insertionsstelle befindet sich nur 305 Bp entfernt das vorhergesagte Gen *At1g12980*, das nach Proteindatenbankvergleich (BLAST, Altschul *et al.*, 1997) einen potentiellen Transkriptionsfaktor der AP2/ERF (APETALA2/ Ethylen-responsives Element bindende Faktoren) Klasse repräsentiert (Weigel, 1995; Riechmann *et al.*, 1998).

Die Überexpression von *At1g12980* im *drn-1D* Allel, wurde im *Nothern* Experiment (s.o) mit Total Gesamt-RNA aus vierzehn Tage alten Keimlingen des Wildtyps und der Mutante (Abb. 14E) untersucht. Im *drn-1D* Hintergrund wird eine große Transkriptmenge der erwarteten Größe detektiert, während im Wildtyp kein Signal erkennbar ist. Die Insertion des *dTAM* Elements in den Promoterbereich von *At1g12980* führt also zur transkriptionellen Hochregulation.

*At1g12980* wurde erst kürzlich als cDNA isoliert und unter dem Namen *ESRI* für *Enhancer of Shoot Regeneration* veröffentlicht, da die konstitutive Überexpression in Zellen einer Wurzel-Gewebekultur die Cytokinin-unabhängige Regeneration von Sprossen ermöglicht (Banno *et al.*, 2001). Aufgrund der Assoziation von *At1g12980* zum *drn-1D* Phänotyp (Eckardt *et al.*, 2001), wird hier *At1g12980* als *DORNRÖSCHEN* (*DRN*) bezeichnet.

### 2.3. *DORNRÖSCHEN* Gen- und Proteinstruktur

Die 5' und 3' nicht-kodierenden Bereiche des *DRN* Gens wurden durch 5' und 3' *RACE* Experimente (*rapid amplifikation of cDNA ends*) ermittelt (Abb 15B). Demnach befindet sich der Transkriptionsstart rund 70 Bp stromaufwärts des ATG an einem Triplet von Adeninresten und wird im Abstand von 30 Bp von einer TATA-Box flankiert. Obwohl die exakte Position der Transkriptionsinitiationsstelle nicht durch S1-Nuklease Mapping oder Primer-Extension festgelegt wurde, deckt sich das Ergebnis mit der vorhergesagten Lage der TATA-Box durch das *GeneFinder* Programm (GCC, Sanger Centre). Die Analyse von 3' *RACE* Klonen ergab, dass sich das Polyadenylierungssignal 230 Bp entfernt vom Stopcodon befindet. Die Sequenz des Polyadenylierungssignals ist in Pflanzen im Vergleich zu Tieren wenig konserviert und wird als Adenin-reich beschrieben (Graber *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der *RACE* Experimente bestätigen die Vorhersage der Annotation, dass *DRN* nur aus einem Exon besteht und die Länge des kodierenden Bereichs 987 Bp beträgt.

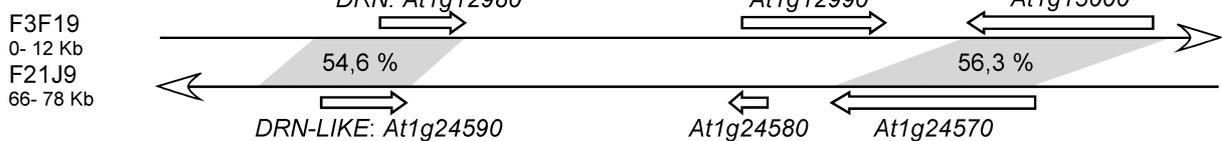
DRN besitzt mit 328 Aminosäuren ein errechnetes Molekulargewicht von 36,3 KDa und zählt zur ERF-Subfamilie der AP2/ERF Transkriptionsfaktoren. Die Proteine der ERF-Subfamilie besitzen im Vergleich zur AP2-Subfamilie nur ein DNA bindendes Motiv und werden stets nur von einem Exon kodiert (Riechmann *et al.*, 1998). Die am Aminoterminus des Proteins lokalisierte AP2 Domäne kennzeichnet u.a. die Strukturverwandtschaft von DRN zur Gruppe II der ERF Faktoren, die durch ERF3 und ERF4 repräsentiert werden.

Das DRN nächst verwandte Protein wurde DRN-LIKE benannt und wird von dem Gen At1g24590 kodiert, das ungefähr 24 cM entfernt von *DRN* ebenso auf Chromosom 1 lokalisiert ist. Der Aminosäurevergleich der beiden Proteine ist in Abbildung 15A dargestellt. Insgesamt besitzen die Proteine eine Ähnlichkeit von 56,5 % bei einer Identität von 35,6 %. Die höchste Ähnlichkeit von 94 % betrifft die 60 Aminosäuren große AP2-Domäne, in der sechs Reste ausgetauscht sind. Außerhalb der AP2 Domäne fehlen in DRN und DRN-LIKE bereits bekannte funktionelle Domänen und Struktur motive. Für beide Proteine finden sich jedoch eine Reihe von lokalen Homologien insbesondere im Bereich des C-Terminus. Weiterhin ist sowohl DRN als auch DRN-LIKE carboxyterminal zur AP2 Domäne Prolin- und Serin-/Threonin-reich. In DRN ist der Anteil von Serinresten mit 34 gegenüber der statistischen Erwartung von 19 stark erhöht. Darüberhinaus befinden sich in DRN zusätzlich hinter einer in beiden Proteinen stark konservierten Domäne eine Folge von sieben Prolinresten, die von je einem Serin- und Threoninrest unterbrochen wird. Prominente Kernlokalisierungs-Signale (NLS) (Hicks *et al.*, 1995) finden sich weder in DRN noch DRN-LIKE, jedoch könnte die basische Folge (RRRP) am Aminoterminus der AP2 Domäne ein potentielles NLS-Signal darstellen.

## A

DRN	1	MEKALRNFTTESTHSP-DPNPLTKFFTEPTAS-PVSRNRKLSKDDTTVTIAGA-GSSTTRYRGVRRRPW
DRN-LIKE	1	MEEATMRLEGAEHRETNIHSLKRRKPSRTSSTAPGSPGGVTAK--AASGAGASGVSTIRYRGVRRRPW
		AP2 Domäne <span style="margin-left: 100px;">▽</span>
DRN	66	GRYAAEIRDPMSEKERRWLGTFDTAEQAACAYDSAAARAFRGAKARTNFTYPTAVIMPEPRFSFSNKK-S
DRN-LIKE	67	GRYAAEIRDPLSKERRWLGTFDTAEQAACAYDCAARAMRGLKARTNFVYP----MPSLD-SYHHRIFS
DRN	133	SPSARCPLPSLPIDSSSTQNFYGAFAAQRIYNTQSIIF-LRDASCSSRKTTPYNNNSFNGSSSSYSASKTA
DRN-LIKE	130	SP----PMNMFLLRDVLNSQSLSPPLTTTFAYPPCNLSNVNDVVHES--FTNVNDVCEDLSPKAKRSSTI
DRN	209	CVSYSENEN--NESFFPEESSDTGLLQEVVQEFLLKKNRGVPPSPPTPPVTSHHDNSGYFSNLTIIYSE
DRN-LIKE	192	-----ENESLISNIREPEPAS-SGLLQEIIVQGFLPK----PISQHASTPPKSNQQSVGVFPTMP---E
DRN	266	NMVQETKETLSSKLDRYGNFQANDDGVRAVA-DGGLSLGSNEWGYQEMLY----GTQLGCTCRRSWG
DRN-LIKE	247	SGFQTDV-----RLADRFHVEGNQGFQGVKYHGELGWADHENGFDQSAKMQQNGCGMIFYQYCFHDDY

## B



**Abbildung 15:** Vergleich der Aminosäuresequenzen von DRN und des nah verwandten DRN-LIKE Proteins (A). Identische Reste wurden schwarz, und konservative Austausche grau unterlegt. Die hochkonservierten Proteinbereiche der 60 Aminosäuren große AP2 Domäne und ein C-terminaler Abschnitt wurde unterstrichen. Regionen mit einem hohen Anteil von Serin- Threonin und Prolinresten wurden wellenförmig gekennzeichnet. Eine Folge von Prolinresten in DRN wurde als Kasten hervorgehoben. Die Position an der im Funktionsverlust alle die Translation unterbrochen wird, wurde durch ein Dreieck markiert. Zum Vergleich der BAC Sequenzen von F3F19 und F21J9 wurde ein Ausschnitt von jeweils 10 Kb gewählt, der DRN bzw. DRN-LIKE enthält. Der Vergleich zeigt, dass in konserviertem Abstand zu DRN und DRN-LIKE zwei weitere Gene mit hoher Sequenzverwandtschaft vorhanden sind (B). Diese Bereiche wurden grau gekennzeichnet. Die Orientierung der BACs wurde durch Pfeile angegeben.

Die Verwandtschaft der beiden Proteine DRN und DRN-LIKE lässt sich möglicherweise auf eine intrachromosomale Duplikation zurückführen. Der Vergleich der BAC Sequenzen in Abbildung 15B zeigt nicht nur Homologien für die kodierende Region von DRN und DRN-LIKE, sondern auch für 1,3 Kb Sequenz stromaufwärts. Zusätzlich befindet sich ein homologer Bereich von ungefähr 5 Kb in konserviertem Abstand zu DRN und DRN-LIKE, der die Gene unbekannter Funktion At1g13000 und At1g24570 enthält.

## 2.4. DORNRÖSCHEN Funktionsverlustallel

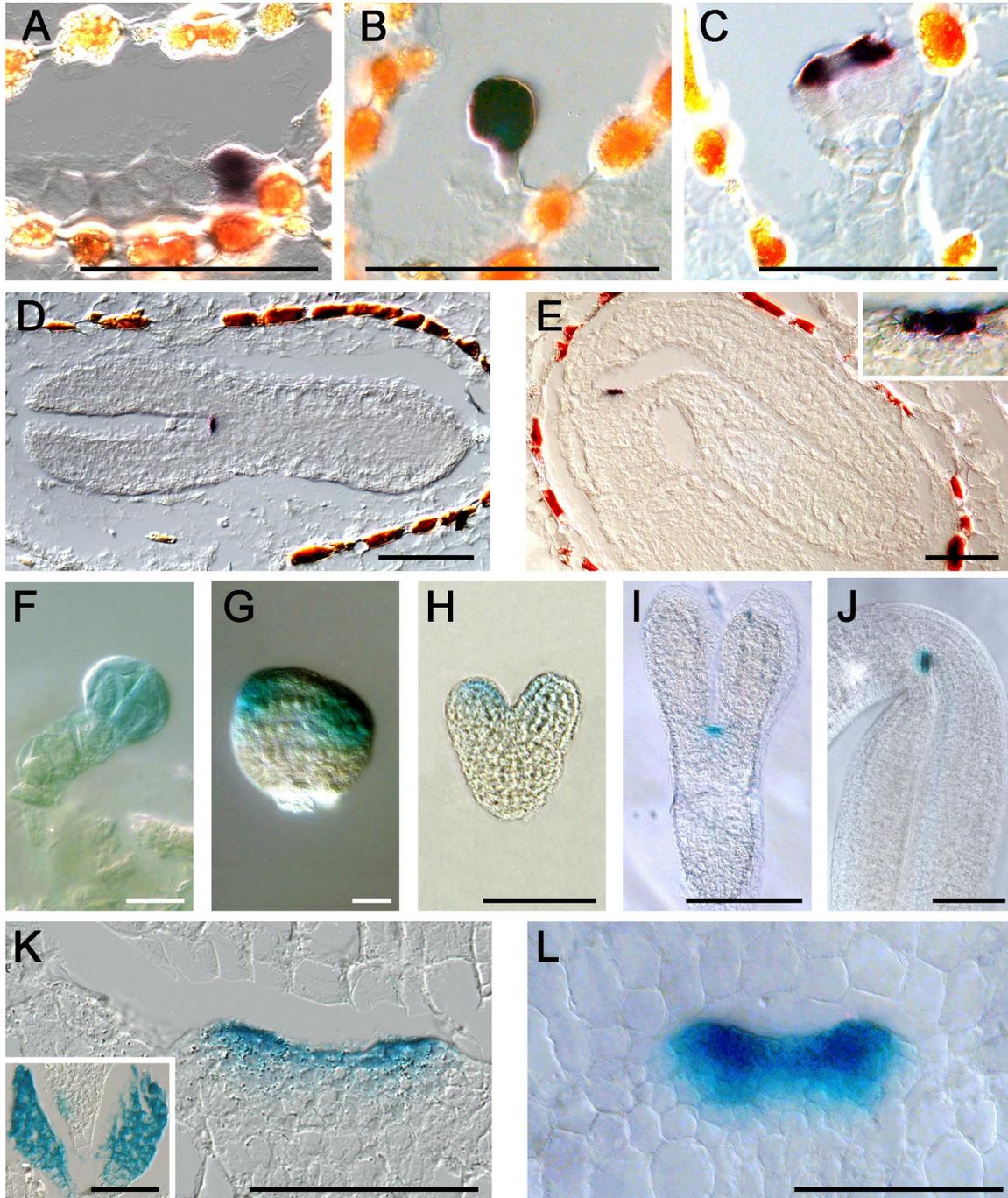
Die Analyse des Funktionsverlusts erlaubt Rückschlüsse auf die biologische Funktion eines Genprodukts. Als Population für die Suche nach einer Funktionsverlustmutante des *DRN* Gens wurde aufgrund der hohen Insertionsdichte und der Ähnlichkeit zum TAMARA System die *dSpm* Insertionskollektion der SLAT Population gewählt (Tissier *et al.*, 1999). Die Durchsuchung der SLAT Linien basiert auf genspezifischer Hybridisierung eines Filters, auf dem insertionsspezifische Fragmente in vielen Untergruppen (Subpool) zusammengefaßt sind (Tissier *et al.*, 1999). Durch Hybridisierung der kodierenden Region von *DRN* als Probe, wurde ein spezifisches Signal im Subpool 21.32 detektiert (Daten nicht gezeigt). Mittels PCR mit *DRN* und *dSpm* spezifischen Primern konnte unter den ungefähr 500 Pflanzen des Subpools eine Insertionslinie identifiziert werden. Im *Southern* Experiment mit genomischer DNA einer homozygoten *drn*<sup>-</sup> Pflanze wurde mit einer *dSpm* spezifischen Probe (Abb.15C) ein Fragment der gleichen Länge detektiert wie mit einer *DRN* spezifischen Sonde (Abb.15D). Die Hybridisierung mit markiertem *dSpm* Fragment demonstriert die Anwesenheit von nur einem Element in dem isolierten Allel.

Die *dSpm* Insertion im *drn*<sup>-</sup> Allel zerstört die kodierende Region nach 324 Bp (Abb. 14A und 14B) und führt dazu, dass keine Translation erfolgt oder die Proteinsequenz nach 108 Aminosäuren innerhalb der hoch konservierten AP2 Domäne abbricht (Abb 15A). Obwohl anzunehmen ist, dass im *drn*<sup>-</sup> Allel kein funktionelles Protein gebildet werden kann, zeigen homozygote *drn*<sup>-</sup> Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp keinen sichtbaren mutanten Phänotyp (nicht dargestellt), wodurch genetische Redundanz angedeutet wird. Möglicherweise besitzt *DRN-LIKE* eine zu *DRN* teilweise überlappende Genfunktion.

## 2.5. Zelluläres Expressionsmuster von *DORNRÖSCHEN*

Zur Charakterisierung des zellulären Expressionsmusters von *DRN*, wurde die Entwicklung des SAM von seiner Etablierung während der Embryogenese, bis hin zur Blütenbildung auf *DRN* Expression untersucht. Dazu wurden RNA *in situ* Hybridisierungsexperimente durchgeführt, in denen ein 680 Bp Fragment der kodierenden Region als Sonde benutzt wurde, dem die AP2 Domäne fehlt, um Kreuzhybridisierung zu verhindern. Weiterhin wurde eine *DRN::GUS*-Reporterlinie etabliert (Jefferson *et al.*, 1987), in der das *GUS*-Gen vom *DRN*-Promoter kontrolliert wird. Zur Herstellung des Reportergenkonstrukts wurden Sequenzen 4,8 Kb des 5' Promoterbereich und 1,5 Kb des 3' Promoters stromaufwärts und stromabwärts der kodierenden Region an *GUS* im T-DNA Vektor pGPTV-BAR-Asc kloniert (Werr *et al.*, 1996). Nach *Agrobacterium*-vermitteltem Gentransfer (Bechthold und Pelletier, 1998) in *Arabidopsis Col-0* Pflanzen wurde eine homozygote Einzelkopie-Linie etabliert, die ein zu *in situ* Hybridisierungs-Ergebnissen vergleichbares Expressionsmuster besitzt.

In der frühen Embryogenese wird *DRN* im Proembryo (Vierzellstadium) exprimiert (Abb. 16A), während im Suspensor keine Expression erkennbar ist. Dieses Muster bleibt auch im globulären Embryo erhalten (Abb. 16B und 17F). Im Transitions- und frühen Herzstadium ist die Expression in die apikalen Zelllagen des Embryos verlagert. Die stärkste Expression findet sich hier in den präsumtiven Kotyledonen, während die zentrale Region, in der das SAM angelegt wird nur wenig Signal zeigt (Abb. 16C und 17G). In älteren Embryonen des Herzstadiums konnte im *in situ* Experiment kein *DRN* Transkript detektiert werden (nicht dargestellt), jedoch zeigt die *GUS*-Linie im Embryo des Herzstadiums eine schwache *GUS*-Färbung der äußeren, adaxialen Zellschichten der sich entwickelnden Kotyledonen (Abb. 16H). In Embryonen des Torpedo- und *Walking-Stick* Stadiums wird *DRN* in den obersten Zelllagen des SAM, vorwiegend in der L1 Schicht transkribiert (Abb. 17D/I und 17E/J). Longitudinale Schnitte durch das vegetative Meristem eines jungen Keimlings zeigen ein verwandtes Expressionsmuster, da auch hier *GUS* Aktivität präferentiell in der L1 Schicht des SAM beobachtet wird. Hierbei ist die Expressionsdomäne deutlich in die sich erhebenden ersten beiden Blattprimordien ausgedehnt (Abb. 16K). Die starke primordiale Expression wird im „Whole mount“ besonders deutlich, da die Darstellung die Färbung mehrerer Zellschichten zeigt (Abb. 16K). Zusätzlich zur Expression im vegetativen SAM wird überraschenderweise starke *GUS* Aktivität in den Stipulen und in geringem Umfang an der Blattbasis beobachtet. In anderen Geweben des Blatts trat keine *GUS* Färbung auf.



**Abbildung 16:** Zelluläres Expressionsmuster von *DRN* im Embryo (A-J) und im vegetativen SAM (K-L) durch RNA *in situ* Hybridisierungen mit einer *DRN* spezifischen Sonde (A-E) und durch die Analyse einer homozygoten *DRN::GUS*-Reportergenlinie (F-L): Proembryo (A); globulärer Embryo (B); frühes Herzstadium (C); Torpedostadium (D); *Walking-Stick* Stadium (E); *Whole mount*: globulärer Embryo (F); *Whole mount*: Transitionsstadium (G); *Whole mount*: Herzstadium (H); *Whole mount*: Torpedostadium (I); *Whole mount*: *Walking-Stick* Stadium (J); longitudinaler Querschnitt: vegetatives SAM (4 dag) (K); *Whole mount*: vegetatives SAM (4 dag) (L)

dag = Tage nach Keimung; Größenvergleich: weiße Balken 10  $\mu\text{m}$ ; schwarze Balken 50  $\mu\text{m}$

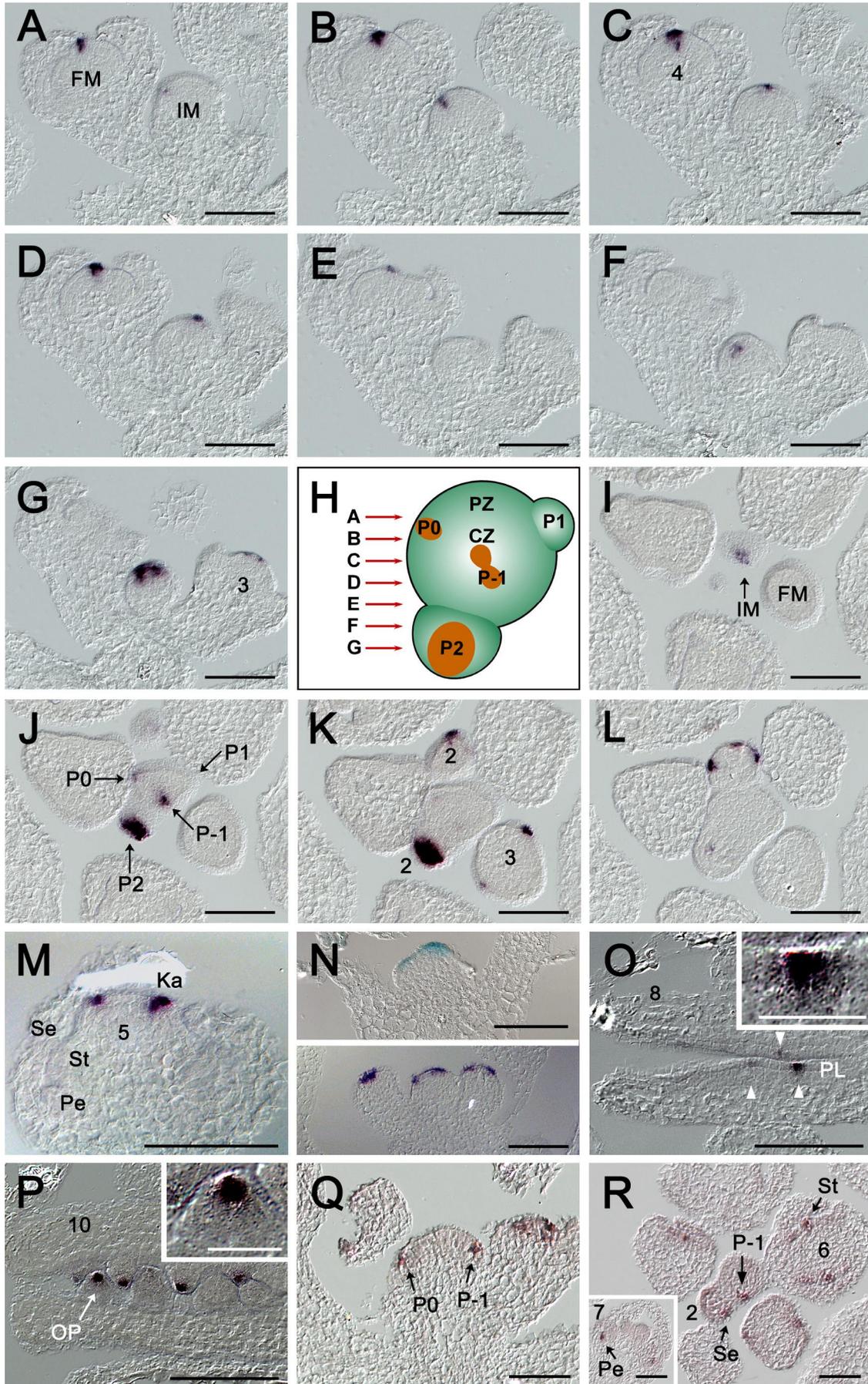
Während der Blühphase zeigt das *DRN* Gen ein dynamisches Expressionsmuster: Die Lage der longitudinalen Schnitte in Abb. 17A bis 17G ist zusammen mit dem Expressionsmuster des Infloreszenzmeristems als transversale Übersicht in 17H dargestellt und stimmt mit dem in Transversalschnitten erhaltenen Muster überein (Abb. 17I bis 17L).

Im Infloreszenzmeristem (Abb. 17A bis 17C) verläuft die *DRN* Expression in der zentralen Zone vom P-1 Primordium über das Zentrum in das P0 Primordium außerhalb der zentralen Zone. Hierbei wird Transkript in eng benachbarten Zellen der L1 und L2 Schicht detektiert. Im P1 Primordium wird hingegen keine Expression beobachtet (Abb. 17J), während im P2 Blütenprimordium (Blütenstadium 2) starke *DRN* Expression in mehrere Zellschichten hineinreicht und auf die apikale Hälfte der jungen Blüte beschränkt bleibt, wie die transversale Schnittfolge verdeutlicht (Abb. 17J bis 17L). Möglicherweise markiert *DRN* hier bereits die Anlagen von Sepalenprimordien oder trägt zur Etablierung des floralen Meristems bei. Insgesamt wird *DRN* im Infloreszenzmeristem also innerhalb der Stammzellpopulation und in den Anlagen der Blütenprimordien exprimiert, ist dann kurzzeitig nicht aktiv und wird im frühen Stadium 2 der Blütenentwicklung erneut angeschaltet.

Etwas später (Blütenstadium 2) wird *DRN* nicht mehr im Zentrum des Blütenmeristems, sondern in wenigen lateralen Zellen exprimiert, die Sepalenanlagen markieren (Abb. 17K und 17L). Im Blütenstadium 3 wird *DRN* Expression in den Organanlagen der Stamen in zwei Zellen der L1 Schicht (Abb. 17G) detektiert. Die Expressionsdomäne von *DRN* umfaßt im Stadium 4 zwei bis drei zentrale Zellen und reicht bis in die L3 Schicht (Abb. 17A bis 17D). Im späten Blütenstadium 5 wird *DRN* Transkript in wenigen Zellen der L1 Schicht beobachtet, an denen Karpelle geformt werden (Abb. 17M). Es ist möglich, dass die bereits im Blütenstadium 4 beobachtete zentrale Expressionsdomäne die Initiation späterer Karpelle markiert (Abb. 17A bis 17D). Für Sepalen, Stamen und Karpelle wird also bereits *DRN* Expression beobachtet, bevor das Primordium selbst sichtbar wird. Obwohl zwar keine Expression für Primordien der Petalen nachgewiesen werden konnte, zeigt die Expression von *DRN* damit Korrelation zur Organinitiation. Diese Annahme wird durch das vegetative und embryonale Muster unterstützt. Das Infloreszenzmeristem einer homozygoten *DRN::GUS* Linie zeigt nach GUS Färbung und im *in situ* Experiment mit einer *GUS* antisense Sonde, ein identisches Expressionsmuster (Abb. 17N). Auch im Hintergrund des vergrößerten Infloreszenzmeristems der *clv3-2* Mutante wird mit der *DRN::GUS* Linie dieses Expressionsverhalten beobachtet (nicht dargestellt).

Zusätzlich zur Expression im Infloreszenz- und Blütenmeristem wird *DRN* während der frühen Ovulenentwicklung exprimiert. Ovulen werden in der Plazenta an der Grenze der beiden fusionierten Karpelle angelegt. Im Blütenstadium 8 wird *DRN* auf gegenüberliegenden Plazenten in einzelnen Zellen der L1 Schicht exprimiert und markiert Ovulenanlagen (Abb. 17O). Signale einer Plazenta sind durch zwei bis drei unmarkierte Zellen voneinander getrennt und tauchen zuerst proximal an der Plazenta auf. Dies deutet möglicherweise an, dass in *Arabidopsis* Ovulen an der Basis der Plazenta früher initiiert werden als distal gelegene. Im Blütenstadium 10 (Abb. 17P) ist die Ovule nach periklinen Zellteilungen der L2 und L3 Schicht und antiklinen Teilungen der Epidermis zum Ovulenprimordium ausgewachsen. *DRN* Expression wird hier in einer einzelnen apikalen Zelle eines Ovulenprimordiums detektiert. Unterhalb dieser apikalen Zelle bildet sich in *Arabidopsis* eine vergrößerte Archesporen-Zelle, aus der im weiteren Verlauf der Ovulenentwicklung die Megasporen-Mutterzelle differenziert (Schneitz *et al.*, 1995). Das bemerkenswerte Expressionsmuster von *DRN* in der Ovulenentwicklung wird auch im Blütenstadium 11 beobachtet (nicht dargestellt). Spätere Blütenstadien wurden bislang nicht untersucht.

Um zu ermitteln, ob das verwandte *DRN-LIKE* ein zu *DRN* vergleichbares Expressionsmuster besitzt, wurden auch für dieses Gen *in situ* Hybridisierungsexperimente in der Infloreszenz durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass auch *DRN-LIKE* im vegetativen Meristem die jüngsten Blattanlagen markiert (nicht dargestellt) und im Infloreszenzmeristem in den Blütenprimordien P-1 und P0 exprimiert wird (Abb. 17Q). Es wird jedoch kein zentrales Signal innerhalb der zentralen Zone detektiert. In Blütenmeristemen markiert *DRN-LIKE* sowohl die sich entwickelnden Sepalen, Petalen und Stamen (Abb. 17R) als auch Karpelle (nicht dargestellt). Obwohl die Expression im Vergleich zu *DRN* mehr Zellen umfaßt und länger andauert, überlappen damit beide Expressionsmuster. Für *DRN-LIKE* wurde in Ovulen keine Expression beobachtet.



**Abbildung 17:** Zelluläres Expressionsmuster von *DRN* und *DRN-LIKE* in der reproduktiven Phase: *In situ* Hybridisierungsexperimente mit einer *DRN* spezifischen Sonde im Infloreszenzmeristem und in floralen Meristemen (A-M) in longitudinalen (A-G+M) und transversalen Schnittfolgen (I-L) im Abstand von 7 µm. Die relativen Positionen der longitudinalen Schnitte wurden innerhalb einer transversalen Übersicht des Infloreszenzmeristems gekennzeichnet (H). Das Expressionsmuster im Infloreszenzmeristem wird in der verwendeten *DRN::GUS*-Reportergermlinie nach GUS Färbung und durch *in situ* Hybridisierung mit *GUS* RNA reproduziert (N). *In situ* Experimente mit *DRN* RNA in longitudinalen Schnitten der Gynoeceen (O+P). Expressionsverhalten von *DRN-LIKE* mittels *in situ* Hybridisierung im longitudinalen (Q) und transversalen (R) Querschnitt des Infloreszenzmeristems und umgebender Blüten.

FM=florales Meristem; IM=Infloreszenzmeristem; CZ=zentrale Zone; PZ=periphere Zone; P=Primordium; Se=Sepale; Pe=Petale; St=Stamen; Ka=Karpell; PL=Plazenta; OP=Ovulenprimordium; Entwicklungsstadien der Blüten wurden durch Zahlen gekennzeichnet

Größenvergleich: weiße Balken 10 µm; schwarze Balken 50 µm

## 2.6. Neuorganisation des SAM in *Dornröschen-1D*

Die wichtigste phänotypische Veränderung in *drn-1D* Pflanzen ist der Verlust normaler Meristemaktivität und die Vergrößerung des Meristems. Im Vergleich zum Wildtyp ist das *drn-1D* SAM neu organisiert und nicht funktionell. Der mutante Phänotyp ist das Resultat der Ereignisse, die zuvor im SAM stattgefunden haben. Die *in situ* Hybridisierung mit *DRN antisense* RNA zeigt, dass das Expressionsmuster des *DRN* Gens infolge der Insertion des Enhancertetramers bereits vor sichtbarem *drn-1D* Phänotyp (10 dag) dramatisch verändert ist. *DRN* Expression ist nicht mehr auf wenige Zellen der oberen Zellschichten des SAM beschränkt, sondern in das differenzierte zentrale Grundgewebe ausgedehnt (Abb. 18A). Expression wird zudem an der Blattbasis beobachtet. Der *DRN* Promoter ist zu diesem Zeitpunkt herunterreguliert (Abb. 18D). Drei Wochen nach Keimung ist *DRN* Expression auf eine ausgedehnte Zone kleiner und cytoplasmareicher Zellen im Zentrum des stark vergrößerten *drn-1D* Meristems beschränkt (Abb. 18G). Insgesamt führt also die Enhancerinsertion zwar zur ektopischen, aber nicht zur konstitutiven Expression von *DRN*.

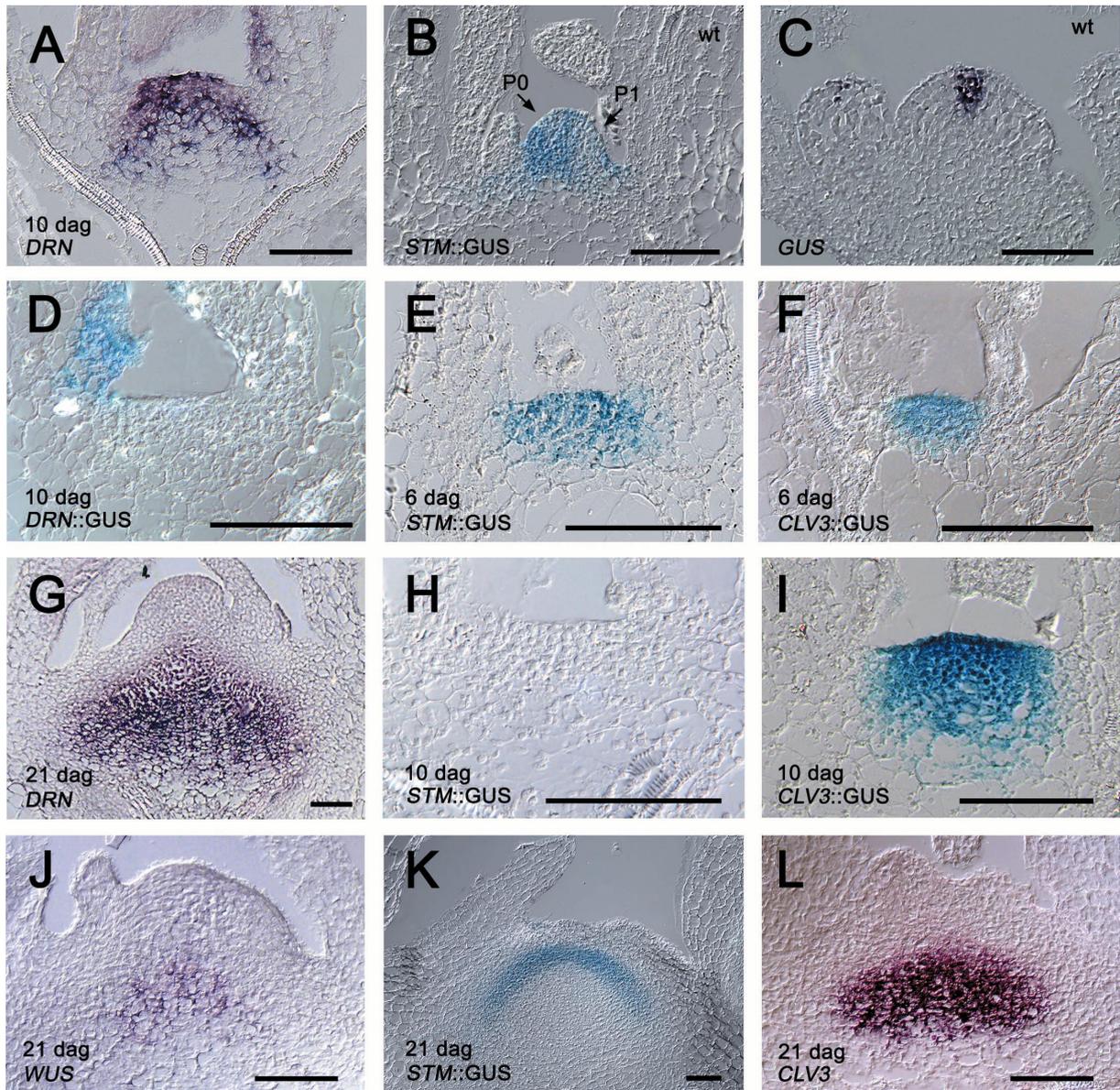
Zur Charakterisierung der Neuorganisation wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Expressionsmuster bekannter molekularer Markergene in *drn-1D* Pflanzen untersucht. Dazu wurden *in situ* Experimente durchgeführt und Kreuzungen mit homozygoten Promoter-GUS Linien analysiert. *Drn-1D* Pflanzen an denen der Phänotyp noch nicht erkannt werden konnte, wurden durch PCR identifiziert. Als Markergene wurden *STM*, *WUS* und *CLV3* gewählt, da sie Schlüsselgene bei der Organisation des SAM darstellen und ihr Funktionsverlust Aspekte des *drn-1D* Phänotyps zeigen.

Die verwendete *STM* Promoter GUS Linie zeigt das beschriebene Expressionsmuster (Long *et al.*, 1996; Long und Barton, 2000): Im gesamten apikalen Meristem mit Ausnahme der lateralen Organprimordien und der sich entwickelnden Blätter wird GUS Expression beobachtet (Abb. 18B; König und Werr, unveröffentlicht). Im Wildtyp werden *STM* und *DRN* in der zentralen Zone koexprimiert, die primordiale *DRN* Expression außerhalb der zentralen Zone und *STM* Expression schließen sich jedoch gegenseitig aus (Abb. 17A bis 17D).

In jungen *drn-1D* Keimlingen (6 dag) ist das SAM im Vergleich zum Wildtyp bereits leicht abgeflacht und Blattprimordien fehlen (Abb. 18E). *STM* Promoter vermittelte GUS Expression wird hier noch wie im Wildtyp in den Zellschichten L1 bis L3 beobachtet. Der *STM* Promoter stellt seine Aktivität jedoch im flachen und arretierten *drn-1D* Meristem zehn Tage nach Keimung ein (Abb. 18H), während die *DRN* Expressiondomäne zu diesem Zeitpunkt in tiefere Zellschichten ausgedehnt ist und *DRN* Transkript im gesamten Meristem detektiert wird. Im Endzustand des *drn-1D* SAM (21 dag) wird *STM* Promoter-vermittelte GUS Expression halbkugelförmig in kleinen, möglicherweise meristematischen Zellen oberhalb der *DRN* Domäne erneut beobachtet (Abb. 18K). Die *STM::GUS* Expressiondomäne ist zudem nach unten verlagert und wird apikal von größeren Zellen begrenzt, die differenziert erscheinen. Während in jungen *drn-1D* Pflanzen *DRN* und *STM* überlappend exprimiert werden, scheinen sich *STM* und *DRN* Expression im neu organisierten *drn-1D* SAM gegenseitig auszuschließen.

Für die benutzte *CLV3::GUS* Reportergermlinie wird im *in situ* Experiment mit *GUS* RNA das für *CLV3* beschriebene Expressionsmuster beobachtet (Abb. 18C), da *CLV3* in wenigen Zellen der zentralen Zone vorwiegend der L1 und L2 Schicht transkribiert wird und die mutmaßliche Stammzellpopulation oberhalb von *WUS* markiert wird (Fletcher *et al.*, 1999, Brand *et al.*, 2002). Bereits in sechs Tage alten *drn-1D* Keimlingen ist die *CLV3* Promoter vermittelte GUS Expressionsdomäne leicht vergrößert (Abb. 18F) und dehnt sich zehn Tage nach Keimung parallel zur *DRN* Expression basal aus (Abb. 18I). Nach 21 Tagen markiert *CLV3* die Population kleiner Zellen im Zentrum des SAM der *drn-1D* Mutante (Abb. 18I). Insgesamt überlappen die Expressionsdomänen von *DRN* und *CLV3* weitgehend in der *drn-1D* Mutante.

*WUS* wird im Wildtyp zentral in wenigen Zellen unterhalb der L3 Schicht des Meristems exprimiert (Mayer *et al.*, 1998). Im Meristem von 21 Tage alten *drn-1D* Keimlingen ist die *WUS* Expression zu einer großen Domäne im Zentrum erweitert, die aber kleiner als die *CLV3* Domäne und etwas basal verschoben erscheint (Abb. 18J).



**Abbildung 18:** Das Expressionsverhalten von *DRN* und der Markergene *STM*, *CLV3* und *WUS* wurde im mutanten SAM des *drn-1D* Allels zu verschiedenen Zeitpunkten durch *in situ* Hybridisierungsexperimente und Promoter-GUS Studien untersucht: *DRN* RNA in *drn-1D* (A+G) und *DRN::GUS* in *drn-1D* (D); *STM::GUS* im Wildtyp (B) und *drn-1D* (E+H+K); *GUS* RNA im *CLV3::GUS* Hintergrund (C) und *CLV3::GUS* in *drn-1D* (F+I+L); *WUS* RNA in *drn-1D* (J)

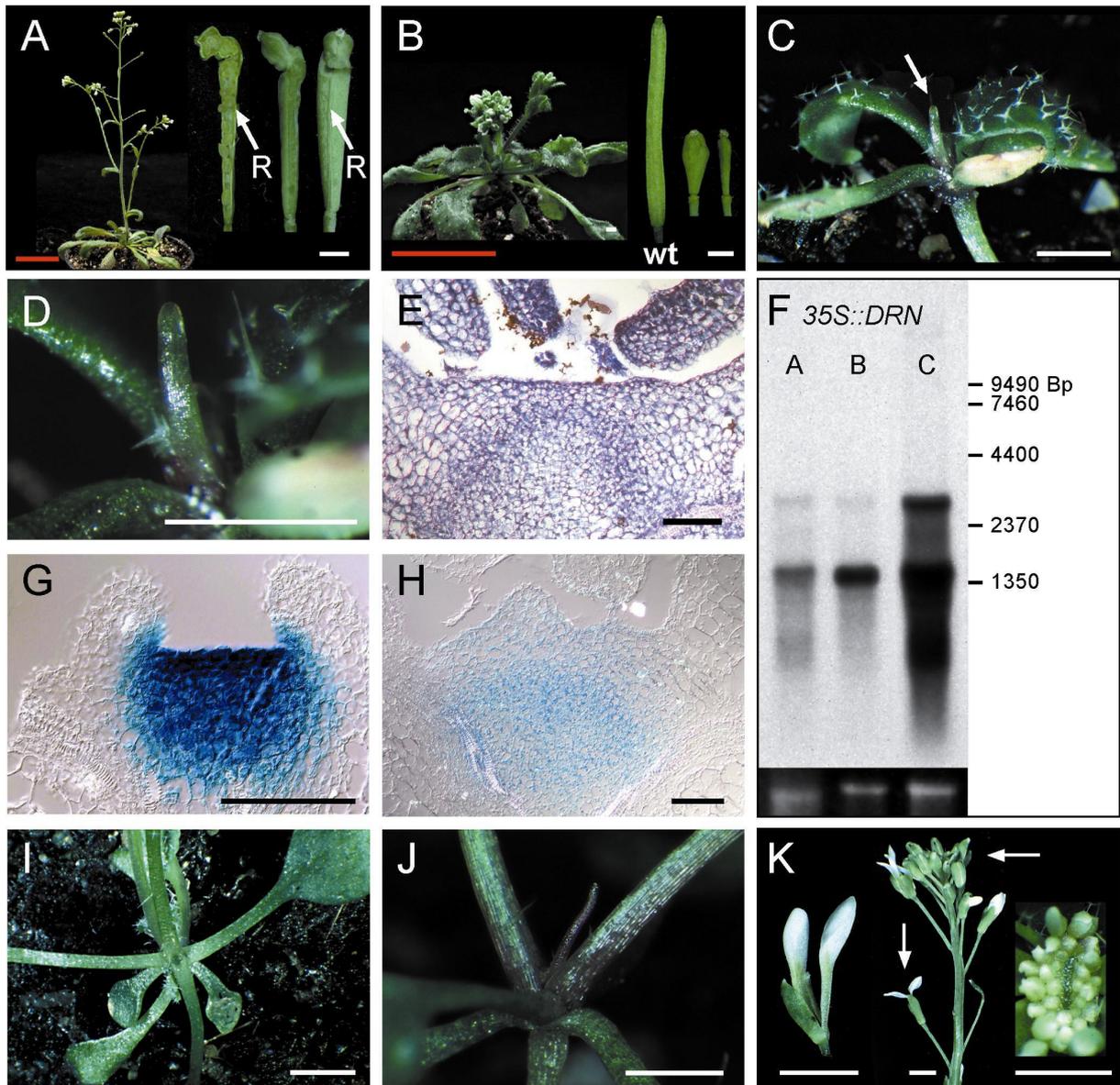
Größenvergleich: schwarze Balken 50 µm; dag=Tage nach Keimung

## 2.7. DORNRÖSCHEN Überexpressionsstudien

Um zu zeigen, dass sich der *drn-1D* Phänotyp ursächlich auf die Überexpression von *DRN* zurückführen lässt, wurde die kodierende Region des Gens unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promoters konstitutiv in *Arabidopsis Col-0* überexprimiert. Aufgrund der möglicherweise vorliegenden Redundanz wurde zum Vergleich *DRN-LIKE* ebenso konstitutiv überexprimiert. Um zu prüfen, ob die *35S* Überexpression wie in der *drn-1D* Mutante zu einer erweiterten *CLV3::GUS* Expression führt, wurde das Experiment auch im Hintergrund der Reportergerlinie durchgeführt. Zusätzlich wurde die kodierende *DRN* Region aminoterminal an die hormonbindende Domäne des Glukokorticoirezeptors (*GR*) fusioniert und konstitutiv in *Arabidopsis* überexprimiert (Lloyd *et al.*, 1994). Da das im Zytoplasma lokalisierte *DRN-GR* Fusionsprotein erst nach Hormongabe in den Kern transportiert wird, lässt sich in transgenen Pflanzen, die das *DRN-GR* Konstrukt tragen der Zeitpunkt der Kernlokalisierung kontrollieren.

Überexpression	<i>35S::DRN</i>	<i>35S::DRN-LIKE</i>
wildtypisch	<b>6 (3,5 %)</b>	10 (6 %)
Schoten deformiert und geknickt; verringerte Fertilität	<b>68 (41 %)</b>	74 (38 %)
Größe reduziert (bis 10 cm); ovale Schoten; selten fertil	<b>60 (36 %)</b>	78 (40 %)
starker Zwergwuchs; 3- 6 dunkelgrüne Blätter; keine Blüte; Appendices falls nicht letal	<b>22 (13 %)</b>	-
starker Zwergwuchs; dunkelgrüne Blätter; ovale Schoten: nicht fertil	-	32 (16 %)
dunkelgrüne Kotyledonen; letal nach Keimung	<b>9 (5,5 %)</b>	-
Σ	<b>165 (100 %)</b>	194 (100 %)

**Tabelle 9:** Verteilung phänotypischer Klassen bei konstitutiver Überexpression der kodierenden Sequenzen von *DRN* und *DRN-LIKE*. Obwohl überwiegend identische morphologische Veränderungen auftreten, wird nur mit *35S::DRN* ein Verlust der Meristemaktivität beobachtet.



**Abbildung 19:** Analyse der Phänotypen bei konstitutiver Überexpression von *DRN* (A-H) und *DRN-GR* (I-K). Häufig zeigen die Überexpressionspflanzen einen milden Phänotyp, bei dem die Schoten deformiert sind und die Fertilität herabgesetzt ist (A). Ein Teil der *35S* Pflanzen ist zwergwüchsig und besitzt verkleinerte, ovale Schoten, die selten Samen tragen (B). Ein geringer Teil der Überexpressionspflanzen ist durch extremen Zwergwuchs, epinastische Blätter und eine Arretierung des SAM gekennzeichnet (C-E+G-H). Bei diesen Pflanzen wird eine Konversion von Blattorganen zu Filamenten beobachtet (D). Der histologische Querschnitt durch das arretierte SAM zeigt den Verlust der Organisation und eine Vergrößerung des SAM (E). Die *CLV3* Promoter vermittelte GUS Expression ist in 14 Tage alten Keimlingen expandiert (G), und dehnt sich in 21 Tage alten Pflanzen weiter ins Zentrum aus (H). Das *Northern* Experiment mit je 10 μg Gesamt RNA aus Keimlingen der drei Klassen der *35S::DRN* Überexpression zeigt eine Korrelation der Transkriptionsstärke zur Stärke des Phänotyps (F). Als Sonde wurde ein *DRN* spezifisches Fragment verwendet. Ein zusätzlich detektiertes Signal bei 3 Kb stellt transkriptionellen Hintergrund dar, da die hohe Transkriptionsrate des viralen Promoters zum Überlesen des polyA Signals führen kann. Werden *35S::DRN-GR* Pflanzen ( $T_2$  Generation) vier Tage nach Keimung mit Dexamethason behandelt, werden noch wenige wildtypische Blätter gebildet und das SAM verliert seine Aktivität (I). Wie in *drm-1D* werden radialisierte Blattorgane gefunden (J). Die mit abnehmender Hormonwirkung auftretenden Infloreszenzen besaßen ein stark vergrößertes Meristem. Die Blüten sind jedoch zu Filamenten reduziert oder zeigen den Verlust der inneren Blütenorgane (K). Als Ladungskontrolle wurde die Ethidiumbromid Färbung verwendet.

R=Replum; Größenvergleich: schwarze Balken 100 μm; weiße Balken 2 mm; rote Balken 20 mm

Unter 170 primären Transformanten der *35S::DRN* Überexpression wurden drei Klassen von Phänotypen variabler Stärke beobachtet (Tab. 8). Neben einer geringen Anzahl ohne sichtbaren Phänotyp, zeigten ungefähr 41 % der Pflanzen leicht verringerte Fertilität und eine Veränderung der Schotenform, da die Schoten im oberen Drittel mehrfach eingeknickt waren (Abb. 19A). Der Defekt wird durch eine Deformation des Replums hervorgerufen, das in Brassicaceen aus einer Fusion der Fruchtblattränder und den Plazenten entsteht. Eine große Zahl von Überexpressionspflanzen (36 %) waren durch deutlichen Zwergwuchs, epinastische Blätter und verkleinerte, ovale Schoten mit geringer Zahl von Samen gekennzeichnet (Abb. 19B). Diese veränderte Schotenform wird auch in *drn-1D* Pflanzen gefunden (Abb. 13N). 22 transgene Pflanzen der *DRN* Überexpression zeigten einen sehr starken Zwergphänotyp und stellten ihr Wachstum nach Bildung von 3 bis 6 kleinen und dunkelgrünen Primärblättern ein. Nach mehreren Wochen wurden gelegentlich einzelne radialisierte Appendices gebildet (Abb. 19C und 20D), es kam aber nie zur Blütenbildung. Einzelne Keimlinge mit dunkelgrünen Kotyledonen starben bereits vor der Primärblattentwicklung (Tab. 8). Die Überexpression des zu *DRN* verwandten *DRN-LIKE* resultierte weitgehend in identischen Phänotypen (Tab. 8). Extrem zwergwüchsige Pflanzen zeigten jedoch keinen Entwicklungsstopp und bildeten keine Filamente, sondern einen Blütenstand mit unfertilen Blüten (nicht dargestellt).

Der histologische Querschnitt durch das SAM einer ungefähr 21 Tage alten *35S::DRN* Zwergpflanze mit Entwicklungsstopp (Abb. 19C und 19D) zeigt die für die *drn-1D* Mutante typische Organisation. Im Vergleich zum Wildtyp fehlt ein apikaler Dom mit sich entwickelnden jungen Blättern (Abb. 13F). Anstelle dessen bildet sich ein vergrößertes, nicht-funktionelles SAM (Abb. 19E), das im *CLV3::GUS* Hintergrund näher analysiert wurde: Ungefähr 14 Tage nach Keimung zeigt das arretierte SAM eine Erweiterung der *CLV3* Promoter vermittelten GUS Expression (Abb. 19G). In älteren Pflanzen (30 dag) wird *CLV3::GUS* in einer Population cytoplasmareicher Zellen im Zentrum exprimiert (Abb. 19H). In den darüber liegenden Zellschichten hochvakuolisierter Zellen wird im Gegensatz zur *drn-1D* Mutante ebenfalls geringe GUS Färbung beobachtet.

Das *Nothern* Experiment mit Gesamt-RNA von *35S::DRN* Keimlingen der drei phänotypischen Klassen Schotendefekt, Zwergwachstum und Entwicklungsstopp illustriert, dass die mit einer *DRN* Sonde detektierte Transkriptmenge mit der Stärke des Phänotyps korreliert (Abb.19 F). Der Verlust der Meristemfunktion wird nur bei dem geringen Anteil der Überexpressionspflanzen mit extremen Zwergwuchs beobachtet. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass Pflanzen, die *DRN* sehr stark überexprimieren, negativ selektioniert werden, und starke *DRN* Expression frühe Entwicklungsprozesse beeinträchtigt und damit zu Zwergwachstum oder Letalität führt. Gleichzeitig scheinen aber nur diese Pflanzen *DRN* im Sprossmeristem so hoch zu exprimieren, dass wie in *drn-1D* ein Meristemarrest sichtbar wird. Diese Annahme wird durch die lokal sehr hohe Expression von *DRN* im *drn-1D* Meristem und das Überexpressionsexperiment von *35S::DRN-GR* unterstützt.

Im Unterschied zu *35S::DRN* tritt mit *35S::DRN-GR* kein Zwergwuchs auf und die Überexpression von *DRN-GR* zeigt eine hohe Ähnlichkeit zum *drn-1D* Phänotyp: Während unbehandelte Pflanzen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigten, wurden in allen 30 untersuchten Linien ein Meristemarrest und gelegentlich Filamente beobachtet, wenn Dexamethason vier Tage nach Keimung appliziert wurde (Abb. 19I und 19J). Der Meristemarrest wurde erst nach Ausbildung mehrerer wildtypischer Rosettenblätter sichtbar, da zum Zeitpunkt der Dexamethasonapplikation bereits die Initiation der ersten Blätter im SAM stattgefunden hat. Nach einigen Wochen nimmt die Dexamethason-Wirkung ab und es konnten sich 6 bis 8 Wochen nach Aussaat Infloreszenzen entwickeln, die ein sehr stark vergrößertes Infloreszenzmeristem besaßen (Abb.19K, Rechts). Die zuerst gebildeten Blüten besaßen deutliche Meristemdefekte, da die inneren Blütenorgane fehlten oder reduziert waren (Abb.19K, Links).

Da der Verlust der Meristemfunktion nur bei Hormongabe beobachtet wird, und damit vom Transport des DRN Proteins in den Nukleus abhängig ist, wird die Annahme unterstützt, dass DRN kernlokalisiert ist und eine Funktion in der transkriptionellen Kontrolle besitzt.

## 2.8. *Dornröschen-1D* im mutanten Hintergrund

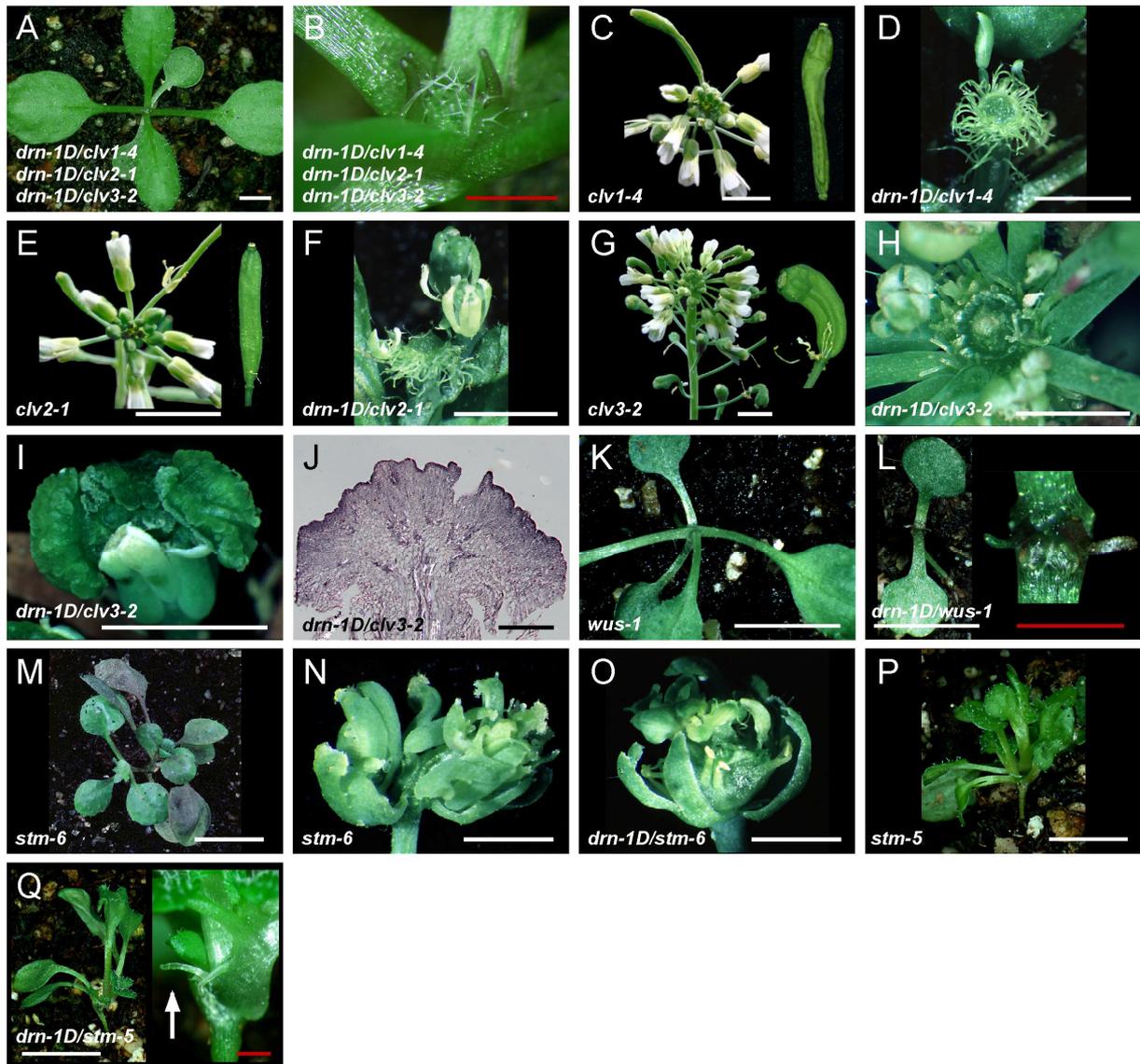
Es wurden Doppelmutanten der Funktionsgewinnmutante *drn-1D* und Funktionsverlustallelen der *CLAVATA* Gene, *WUS* und *STM* erzeugt, um zu prüfen inwieweit die ektopische Expression von DRN zur Funktion dieser Gene beiträgt oder von ihr abhängig ist. Die Analyse der Doppelmutanten erfolgte in der F<sub>2</sub> Generation, wobei das dominante *drn-1D* Allel anhand seiner BASTA-Resistenz verfolgt werden konnte. Da die Funktionsverlustmutationen im *Ler* Hintergrund isoliert wurden, wurden sie vor den Kreuzungsexperimenten über drei Generationen hinweg in den *Col-0* Hintergrund rückgekreuzt.

In Allelen der *clavata* Mutanten (*clv1-4*, *clv2-1*, *clv3-2*) sind die apikalen Meristeme vergrößert. Dies führt in Blüten zu einer Erhöhung der Organanzahl, die sich bei Schoten in zusätzlich angelegten Karpellen zeigt (Abb. 20C+21E+21G). Die Kreuzungsexperimente von *drn-1D* und *clv1-4*, *clv2-1* bzw. *clv3-2* zeigten zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung additive Veränderungen des Phänotyps im Vergleich zu den Einzelmutanten. Wenige Tage nach Keimung wird in allen *clavata* Hintergründen eine Arretierung und Vergrößerung des SAM, sowie die Bildung von Filamenten wie in *drn-1D* Pflanzen sichtbar (Abb. 20A+B). Wird ein Blütenstand entwickelt, erscheint das Infloreszenzmeristem im Vergleich zur jeweiligen *clavata* Einzelmutation dramatisch vergrößert und wird von einer Vielzahl von Filamenten umgeben, die wahrscheinlich reduzierte Blüten darstellen (Abb. 20D+20F+20H). Da das Nullallel *clv2-1* nur einen schwachen *clavata* Phänotyp besitzt, der sich vorwiegend in geringer Zunahme der Karpellzahl äußert (Abb. 20E), ist diese Verstärkung des Phänotyps in *drn-1D/clv2-1* besonders auffällig. Werden in *drn-1D/clv2-1* fertile Blüten gebildet, ist die Anzahl der Karpelle im Vergleich zu *clv2-1* erhöht (Abb. 20F). Im sehr starken *clv3-2* Allel ist die Größe der Stammzellpopulation im Vergleich zu beiden anderen verwendeten *clavata* Allelen am stärksten fehlreguliert und die Determinierung des floralen Meristems ist reduziert, was die Bildung mehrerer zusätzlicher Karpelle bewirkt (Abb. 20G). In der Doppelmutante *drn-1D/clv3-2* ist die Terminierung der floralen Meristeme weiter aufgehoben, da am Ende der Karpellentwicklung die Schote an ihrer Spitze aufbricht und kallusartiges Gewebe entsteht (Abb. 20I+20J). Die ektopische Expression von DRN fördert im *clv3-2* Hintergrund während der Karpellentwicklung also zusätzlich massive Zellproliferation und die Bildung von undifferenziertem Gewebe.

Im Funktionsverlustallel *wus-1* verbraucht sich das SAM in der Produktion weniger Blätter und arretiert als abgeflachte Struktur differenzierter Zellen (Abb. 20K). In der *drn-1D/wus-1* Doppelmutante tritt der Verlust der Meristemaktivität frühzeitiger ein als in der Einzelmutante, und die ersten Primärblätter werden zu Filamenten konvertiert (Abb. 20L). Insgesamt ist der Phänotyp der *drn-1D/wus-1* Doppelmutante additiv im Vergleich zur Einzelmutante.

Keimlinge des sehr schwachen *stm-6* Allels unterscheiden sich während der frühen vegetativen Entwicklung nur wenig vom Wildtyp (Abb. 20M). Bricht die Meristemaktivität nach Bildung mehrerer Blätter ab, wird weiteres Wachstum durch sekundäre Meristemaktivität umgehend wieder aufgenommen. Blüten zeigen in *stm-6* Mutanten eine variable Anzahl von Organen, wobei häufig die Zahl der Petalen stark reduziert ist (Abb. 20N). Die Bildung zusätzlicher Karpelle unter Verlust der Phyllotaxis zeigt die gestörte Meristemfunktion und auch einen Verlust der Determination des floralen Meristems in dem schwachen Allel an (Endrizzi *et al.*, 1996). Die Kreuzung von *drn-1D* und *stm-6* ist während der vegetativen Phase nicht von *drn-1D* zu unterscheiden. Werden in der Doppelmutante Blüten geformt, zeigen diese einen additiven Phänotyp. *Drn-1D/stm-6* bildet ein sehr stark vergrößertes kugelförmiges Blütenmeristem, das innerhalb des ersten Blütenkreises dem Pedicel aufsitzt und dem mehrere Karpelle und Staubgefäße entspringen (Abb. 20O). Wie in der *stm-6* Einzelmutante fehlen Petalen oder sind in ihrer Anzahl reduziert. Im stärkeren *stm-5* Allel wird kein sichtbares primäres SAM angelegt. Nach einem Entwicklungsstopp werden nach der Keimung Blattoorgane lateral aus den fusionierten Petiolen der Kotyledonen gebildet. Da nach der Bildung von ein bis zwei Blättern die Meristemaktivität erneut abbricht, entsteht keine Blattrosette, sondern ein aufsteigendes Bündel von Blättern, die oft an der Basis fusioniert sind (Abb. 20P). In der *drn-1D/stm-5* Doppelmutante wird nach der Keimung kein von der *stm-5* Mutation abweichender Phänotyp sichtbar, jedoch addiert sich zum *stm-5* Phänotyp die Bildung radialisierter Filamente (Abb. 20S).

Insgesamt weist die Analyse der Doppelmutanten darauf hin, dass der *drn-1D* Phänotyp nicht von den untersuchten Genfunktionen abhängig ist.



**Abbildung 20:** Kombination des *drn-1D* Allels mit *wus*, *clv* und *stm* Funktionsverlustmutanten: Nach der Keimung tritt in den Doppelmutanten von *drn-1D* und den *clavata* Allelen *clv1-4*, *clv2-1* und *clv3-2* ein Meristemarrest auf und Blattorgane werden zu trichombesetzten Filamenten reduziert (A+B). Im Vergleich zu den Infloreszenzen der Einzelmutanten *clv1-4* (C), *clv2-1* (E) und *clv3-2* (G) zeigen die Doppelmutanten ein wesentlich vergrößertes Meristem, das von einer Vielzahl radialisierter Organe umgeben ist. An dem schwachen *clv2-1* Allel ist die Verstärkung des Phänotyps besonders deutlich, da die Zahl zusätzlicher Karpelle deutlich zunimmt. In der Doppelmutante *drn-1D/clv3-2* bildet sich an der Spitze der Schote kallusartiges Gewebe (I). Der histologische Querschnitt zeigt, dass dieses Gewebe aus cytoplasma-reichen, stark proliferierenden Zellen besteht (J). Während der Keimling der *wus-1* Mutante bis zum Verlust der Meristemfunktion zwei bis drei Blätter ausbildet (K), werden in der *drn-1D/wus-1* Doppelmutante bereits die ersten Primärblätter radialisiert, bevor das SAM arretiert (L). Die Kombination des schwachen *stm-6* Allels (M) mit *drn-1D* zeigt erst in der Blüte eine deutliche Addition der Phänotypen, da das Blütenmeristem der Doppelmutante (O) im Vergleich zur Einzelmutante (N) stark kugelförmig vergrößert ist. Auch in der *drn-1D/stm-5* Doppelmutante wird der *drn-1D* Phänotyp sichtbar, da Blattorgane zu Filamenten reduziert werden.

Größenvergleich: schwarze Balken 100 µm; weiße Balken 5 mm; rote Balken 1 mm

## V DISKUSSION

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zunächst das Aktivierungsmutagenesesystem TAMARA in *Arabidopsis thaliana* etabliert, mit dessen Hilfe mehrere dominante Mutationen identifiziert werden konnten. Mit der *drn-1D* Mutation wurde ein AP2-Transkriptionsfaktor identifiziert, der möglicherweise in den Prozess der Organbildung eingreift und an der Kontrolle der Stammzellpopulation beteiligt ist. Die Analyse des *DRN* Gens war das Hauptanliegen dieser Arbeit.

### 1. TAMARA

#### 1.1. Analyse des TAMARA Systems

Im TAMARA System wurde zur Erzeugung dominanter Mutationen das *En/Spm* Element aus Mais als modifiziertes 2-Element System (Tissier *et al.*, 1999) mit einem Enhancertetramer des 35S Promoters kombiniert (*dTAM*). Für das *Spm* Element ist seit langem bekannt, dass häufig mehr als 50 % der Transpositionereignisse an gekoppelten Positionen stattfinden (Dooner und Belachew, 1989; Cardon *et al.*, 1993; Aarts *et al.*, 1995; Machida *et al.*, 1997). Daher wurde das System mit positiven und negativen Markern ausgestattet, um ungekoppelte Transpositionereignisse selektionieren zu können, und so eine Population mit *dTAM* Insertionen zu erzeugen, die einen hohen Anteil unterschiedlicher Ereignisse besitzt.

Um die Zahl doppelt selektierbarer Pflanzen zu erhöhen, wurde die T<sub>1</sub> Generation amplifiziert. Die doppelte Selektion ist nur für die Nachkommenschaft T-DNA heterozygoter Pflanzen wirksam, deshalb wurde bewußt auf weitere Amplifikationsschritte verzichtet. Mit jedem Amplifikationsschritt steigt der Anteil an Pflanzender für die T-DNA homozygot sind. Zudem wächst mit jeder Generation die Möglichkeit, dass durch sekundäre Exzisionsereignisse Transposon-*Footprints* hervorgerufen werden und ungekoppelte Mutationen auftreten (Schwarz-Sommer *et al.*, 1985; Frey *et al.*, 1989). Dieses Problem wird durch eine Zunahme der Kopienzahl des Elements verstärkt, wenn während der Zellteilung Transposition von einem bereits replizierten Genomabschnitt zu einem noch nicht duplizierten Bereich stattfindet (Osborne *et al.*, 1991; Dash und Peterson, 1994). Eine hohe Kopienzahl von *dTAM* Elementen erschwert zudem die Analyse möglicher Mutanten.

Der Grad der Unabhängigkeit der erzeugten Insertionen wird maßgeblich vom Zeitpunkt der Transposaseaktivität beeinflusst. Ein Transpositionsereignis in einem frühen Entwicklungsstadium produziert einen großen klonalen Sektor bis zum Zeitpunkt der Gametenbildung und führt damit zu einer Vielzahl identischer Ereignisse (Baker *et al.*, 1986; Dooner und Belachew 1989; Cardon *et al.*, 1993). Die höchste Zahl unabhängiger Ereignisse läßt sich daher bei gametophytischer Transposition erwarten (Firek *et al.*, 1996). Im TAMARA System wurde der virale 35S Promoter zur Kontrolle der Transposasequelle gewählt, da gezeigt werden konnte, dass der 35S Promoter in *Arabidopsis* zahlreiche Transpositionen auch spät in der reproduktiven Phase vermittelt (Aarts *et al.*, 1995). Dies konnte durch die Analyse der TAMARA Starterlinien bestätigt werden, da die Mehrzahl der Linien eine Unabhängigkeit von mehr als 50 % besaßen (Tab.2). Einige Linien zeigten eine sehr hohe Frequenz unabhängiger Transpositionsereignisse und waren daher besonders gut zur Erzeugung vieler Transpositionsereignisse geeignet (Linie 3, 17 oder 24). Die hohe Effizienz dieser Linien ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass aufgrund von Positionseffekten der T-DNA besonders starke Transposase-Aktivität erst spät in der Entwicklung auftritt. Umgekehrt wurden auch Linien identifiziert mit denen zwar viele DS Pflanzen erzeugt wurden, die jedoch nur eine geringe Unabhängigkeit besaßen (Linie 35). Diese umgekehrte Korrelation der Unabhängigkeit zur Frequenz isolierter DS Pflanzen tritt auf, wenn frühe Transpositionsereignisse stattfinden oder Ereignisse über die Parentalgeneration hinweg vermehrt werden.

Insgesamt besteht die TAMARA Population zur Zeit aus 13000 Pflanzen mit einem geschätzten Anteil von 7000 unabhängigen Ereignissen. Die Unabhängigkeit von 63,6 % ist zu verwandten 2-Elementen Systemen vergleichbar (Tissier *et al.*, 1999; Marsch-Martinez *et al.*, 2002).

Innerhalb der TAMARA Population konnten sechs dominante Mutationen identifiziert werden. Dies entspricht bezogen auf die Anzahl unabhängiger Ereignisse einer Frequenz von ungefähr einer Mutante pro 1000. Im Vergleich zu konventionellen Insertionsmutagenesen erscheint diese Anzahl gering (Altmann *et al.*, 1995; Azpiroz-Leehan und Feldmann, 1997; Budziszewski *et al.*, 2001). Für die niedrige Frequenz dominanter Mutationen kommen mehrere mögliche Erklärungen in Betracht. Da das Arabidopsisgenom eine hohe Gendichte aufweist, wird die Wirkung des Enhancertetramers eventuell durch Insulatorsequenzen eingeschränkt, die benachbarte Gene vom Einfluß umgebender Enhancer- und

Silencersequenzen abschirmen (Chung *et al.*, 1993; Geyer, 1997; Müller, 2000). Eine alternative Erklärung könnte darin bestehen, dass die Insertion von Enhancersequenzen seltener zu einem mutanten Phänotyp führt, da im Gegensatz zur konstitutiven Überexpression die Expression des betroffenen Gens lediglich erhöht wird (Weigel *et al.*, 2000).

In dem Aktivierungsmutagenesesystem von Marsch-Martinez *et al* (2002), das dem TAMARA System ähnelt, konnte eine höhere Zahl dominanter Mutationen identifiziert werden. Durchschnittlich traten hier 5 Mutationen pro 1000 auf, und durch die Wahl besonders effizienter Linien konnte die Frequenz auf zehn dominante Mutationen pro 1000 gesteigert werden. Die höhere Frequenz lässt sich teilweise wahrscheinlich darauf zurückführen, dass neben morphologischen Defekten der oberirdischen Pflanzenteile wie Blatt- und Blütenform, Pflanzengröße, Blühzeitpunkt und Fertilität auch Veränderungen der Wurzel und physiologische Merkmale untersucht wurden. Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass das *dSpm* Element in dem von Marsch-Martinez *et al* benutzten System kleinere terminale Sequenzen als das *dTAM* Element besitzt und das Enhancertetramer lediglich 200 bzw. 2000 Bp von dem 5' bzw. 3' Ende des Elements entfernt ist. Das Enhancertetramer im *dTAM* Element weist hingegen einen Abstand von 900 bzw. 2800 Bp zu den Enden auf. Möglicherweise ist diese größere Entfernung ein weiterer Grund für eine geringere Frequenz dominanter Mutationen. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass alleine die unterschiedliche Entfernung zu diesem großen Effizienzunterschied führt, da in der dominanten *pi-ID* Mutante das Enhancertetramer eine Entfernung von 4,5 kB zu *PISTILLATA* besitzt und in *spz-ID* eine ektopische Expression möglicherweise über 4,9 kB hinweg vermittelt wird. Es ist jedoch denkbar, dass durch längere terminale Sequenzen, die Fähigkeit der transkriptionellen Aktivierung benachbarter Gene durch das Enhancertetramer eingeschränkt wird, indem Methylierung des *dTAM* Elements oder umliegender Promoterbereiche stattfindet. Der Einfluss des Methylierungszustands auf die Kontrolle der Regulation ist für transponierbare Elemente ein verbreitetes Phänomen (Banks und Fedoroff, 1989; Martin *et al.*, 1989; Brutnell und Dellaporta, 1994). Eine alternative Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung, dass fünf der im TAMARA System identifizierten Mutationen aus nur zwei Starterlinien isoliert wurden (Linie 38 und 64). Betrachtet man die Effizienz dieser beiden Linien getrennt von der Gesamtpopulation, so wurden in Linie 38 aus 356 DS Pflanzen drei Mutationen und in Linie 64 aus 271 DS Pflanzen zwei Mutationen isoliert (Tab. 1). Daher werden in diesen beiden Linien dominante Mutationen mit ähnlicher Frequenz isoliert, wie in dem von Marsch-Martinez *et al* (2002) beschriebenen System.

## 1.2. Das TAMARA System im Vergleich

Allgemein sind T-DNA und Transposon-gestützte Mutagenesesysteme gleichwertig weit verbreitet. Die Verteilung der Insertionen ist im Genom verschiedener Pflanzenspezies für beide Systeme weitgehend zufällig, wobei T-DNA Integrationen eine gewisse Präferenz für aktiv transkribierte Bereiche des Genoms besitzen (Barakat *et al.*, 2000) und transponierbare Elemente vorzugsweise in 5' Bereich kodierender Regionen insertieren (Parinov *et al.*, 1999; Greco *et al.*, 2001).

Andererseits haben T-DNA Mutagenesen in der Praxis einige Nachteile gegenüber Transposon-vermittelten Systemen. Da die T-DNA häufig nicht einzeln, sondern als Concatamer integriert und chromosomale Rearrangements auftreten, wird die Anwendung PCR-basierender Methoden erschwert oder eine Mutation ist nicht an die Insertion gekoppelt (Nacry *et al.*, 1998; De Buck *et al.*, 1999). Einer der wichtigsten Vorzüge eines selektierbaren 2-Element Systems besteht im Vergleich zur T-DNA Integration in der Remobilisierbarkeit des transponierbaren Elements. Da durch doppelte Selektion stabile ungekoppelte Transpositionsereignisse isoliert werden, läßt sich durch erneutes Einführen einer Transposasequelle das Element remobilisieren. Dieser Vorteil kann in einem Aktivierungsmutagenesesystem wie TAMARA dazu genutzt werden, um nach der Identifikation einer dominanten Mutation den Wildtyp wiederherzustellen. Durch Transposition in die kodierende Sequenz des zuvor überexprimierten Gens können andererseits allelische Serien von Funktionsverlustmutationen zur funktionellen Analyse erzeugt werden. Auf ähnliche Weise kann die Umgebung einer *dTAM* Insertion unter der besonderen Berücksichtigung dominanter Mutationen regional mutagenisiert werden (Moreno *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996; Dubois *et al.*, 1998; Seki *et al.*, 1999).

Die Nutzung einer Aktivierungsmutagenese als selektierbares 2-Element System ist als genetisches Instrument besonders für Nutzpflanzen wie Mais, Reis, Weizen oder Gerste geeignet, da diese aufgrund von Polyploidisierung hohe genetische Redundanz innerhalb ihres Genoms zeigen (Gale und Devos, 1998). Die Verwendung von Transposon-Elementen ist vor allem für solche Pflanzenarten von Interesse, die nur mit einer geringen Frequenz mit T-DNA transformiert werden können, wie Mais, Tomate oder *Antirrhinum*. Zwar konnte der *Agrobacterium*-vermittelte T-DNA Transfer bereits für eine Reihe von Nutzpflanzen etabliert

werden, und wurde sogar für Pilze und menschliche Zellen gezeigt (Trieu *et al.*, 2000; Abuodeh *et al.*, 2000; Kunik *et al.*, 2001), jedoch sind Transposon-vermittelte Mutagenese-Systeme für alle Organismengruppen über das Pflanzenreich hinaus geeignet (Searles *et al.*, 1982; Starich *et al.*, 1985; Garfinkel *et al.*, 1988; Klinakis *et al.*, 2000) und werden zur Erzeugung dominanter Mutationen in *Drosophila* häufig verwendet (Brand und Perrimon, 1993; Rorth *et al.*, 1998; Toba *et al.*, 1999).

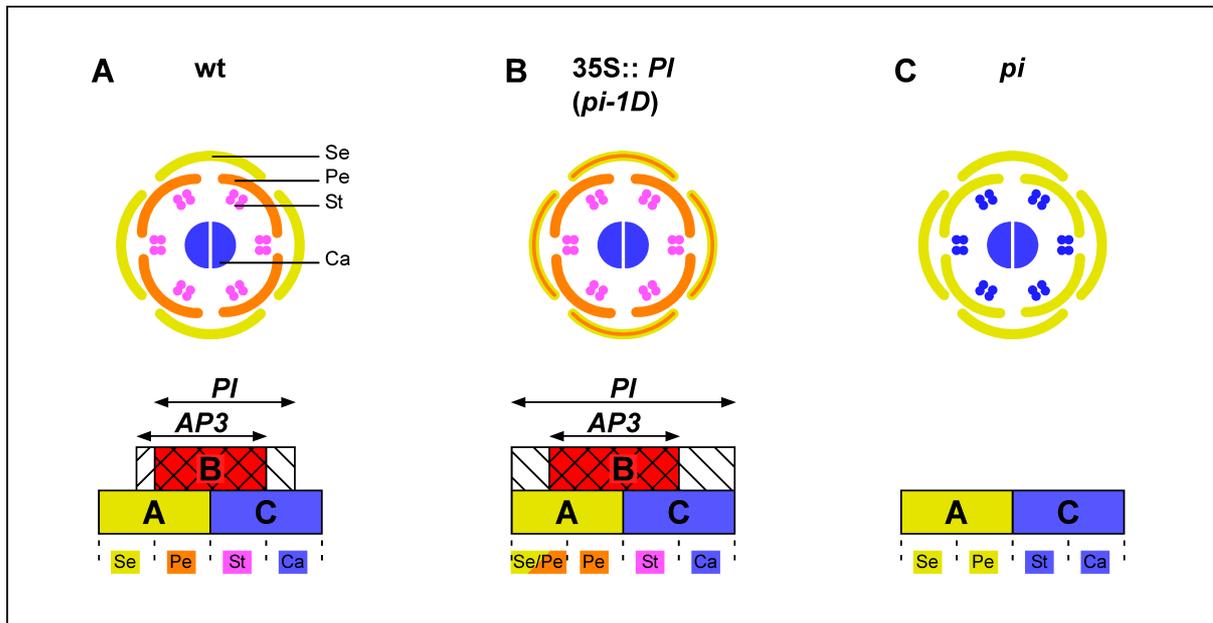
Für Tabak wurde bereits unter Benutzung des Ac/Ds Elements aus Mais ein 2-Element System als Aktivierungsmutagenese entwickelt (Suzuki *et al.*, 2001). Die Isolation dominanter Mutationen steht in diesem System bislang aus, obwohl das mobilisierbare Ds Element zur Überexpression benachbarter Gene interessanterweise sowohl den konstitutiven 35S Promoter als auch 35S Enhancersequenzen enthält. Aufgrund der gewählten Markergene erlaubt dieses *AcREH* genannte System im Vergleich zu TAMARA jedoch keine Selektion ungekoppelter Transpositionsereignisse und erfordert einen höheren Arbeitsaufwand.

### 1.3. Analyse dominanter Mutationen

Da in den analysierten dominanten Mutationen wie in der gesamten TAMARA Population nur eine geringe Anzahl an *dTAM* Insertionen vorhanden war, konnten nach Isolation flankierender DNA Kandidatengene identifiziert werden, deren ektopische Expression für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein könnten. In allen untersuchten dominanten Mutationen konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp streng an die *dTAM* Insertion gekoppelt war.

#### 1.3.1. *Pistillata-1D*

Die Arabidopsisblüte ist eines der am besten untersuchten genetischen Systeme in Pflanzen. Die Blüte besteht aus vier konzentrisch angeordneten Organkreisen und die Identität der Blütenorgane wird durch drei Klassen von Organidentitätsgenen festgelegt, deren Zusammenwirken sich im ABC Modell zusammenfassen läßt (Bowman *et al.*, 1991; Coen und Meyerowitz, 1991; Weigel und Meyerowitz, 1994). Das ABC Modell (Abb. 21A) basiert darauf, dass die Klassen der Organidentitätsgene zusammenwirken, um einen bestimmten Organtyp zu spezifizieren: Sepalen werden durch A Aktivität spezifiziert, Petalen durch A und B Aktivität, die Stamen durch B und C Aktivität und die Karpelle als Organe des innersten Blütenkreises durch C Aktivität. Während *APETALA1* (*AP1*) und *APETALA2* (*AP2*) zur A Klasse zählen, agieren die MADS-Box Gene *APETALA3* (*AP3*) und *PISTILLATA* (*PI*) gemeinsam als B-Funktionsgene und *AGAMOUS* (*AG*) bestimmt die C-Funktion. *AP3* und *PI* sind essentiell für die Entwicklung der Petalen und Stamen, da der Funktionsverlust von *AP3* oder *PI* zur homeotischen Transformation von Petalen zu Sepalen, und von Stamen zu Karpellen führt (Abb. 21C; Coen und Meyerowitz, 1991). In der Kontrolle der B-Funktion agieren *AP3* und *PI* gemeinsam als Heterodimer (Riechmann *et al.*, 1996). Sie besitzen jedoch kein identisches Expressionsmuster (Abb. 21A ). Während *PI* in Organprimordien der Petalen, Stamen und auch in Karpellen exprimiert wird (Goto und Meyerowitz, 1994), beginnt die *AP3* Expression bereits in Sepalenprimordien und ist sonst auf die Organprimordien der Petalen und Stamen beschränkt (Jack *et al.*, 1992; Weigel und Meyerowitz, 1993). Da die B-Funktion von der gemeinsamen Expression von *PI* und *AP3* abhängig ist, führt die konstitutive Überexpression von *PI* zu einer partiellen Konversion der Sepalen zu Petalen, da auch im Wildtyp *AP3* in Sepalenprimordien exprimiert wird (Abb. 21B; Krizek und Meyerowitz, 1996).



**Abbildung 21:** ABC Modell unter Berücksichtigung von *PI* im Wildtyp (A), in *35S::PI* Pflanzen (B) und im *pi* Funktionsverlustallel (C). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Krizek und Meyerowitz (1996) erstellt. Se=Sepalen; Pe=Petale; St=Stamen; Ca= Karpelle

Die dominante *pi-ID* Mutation zeigt einen zu *PI* überexprimierenden Pflanzen identischen Phänotyp und trägt eine *dTAM* Insertion im Promoterbereich des *PISTILLATA* Gens (Honma und Goto, 2000). Daher kann angenommen werden, dass in *pi-ID* die ektopische Expression von *PI* zu einer Ausweitung der B-Funktion in den ersten Blütenorgankreis führt, und Sepalen partiell homeotisch transformiert werden. Durch die Isolation des *pi-ID* Allels wird daher belegt, dass durch das Enhancertetramer die Aktivierung von Genen in Nachbarschaft zur *dTAM* Insertionsstelle vermittelt werden kann und ein erwarteter Phänotyp resultiert.

### 1.3.2. *Lollo-ID*

In der *lol-ID* Mutante befindet sich die *dTAM* Insertion zwischen zwei verwandten Genen, die die Faktoren LBD30 und LBD31 der LOB-Familie kodieren. Der Phänotyp der *lol-ID* Mutante zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu den morphologischen Veränderungen der Blätter, die in den Funktionsverlustmutationen *as1* und *as2* beobachtet werden, da auch hier die Blattränder stark eingebuchtet sind und die Blattoberfläche gewellt erscheint (Byrne *et al.*, 2000; Semiarti *et al.*, 2001). Insgesamt sind die Blattdefekte in *as1* und *as2* jedoch stärker als in *lol-ID*. Die Veränderungen der Blattmorphologie lassen sich in *as1* und *as2* Pflanzen darauf zurückführen, dass sich die Expression der *KNOTTED1*-verwandten Homeoboxgene *KNAT1* und *KNAT2* in die Blätter ausdehnt (Byrne *et al.*, 2000; Semiarti *et al.*, 2001). Wird *KNAT1* konstitutiv in Arabidopsis überexprimiert, wird die Bildung stark gelappter Blätter beobachtet (Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996). Eine Funktion von *AS1* und *AS2* besteht somit wahrscheinlich darin *KNAT1* und *KNAT2* in Blättern zu reprimieren.

Möglicherweise läßt sich der Phänotyp der *lol-ID* Mutante ebenso auf eine Fehlregulation von *KNOTTED1*-verwandten Homeobox Faktoren durch *LBD30* und/oder *LBD31* zurückführen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass auch *AS2* ein Mitglied der LBD Familie darstellt (Iwakawa *et al.*, 2002). Zudem ergaben Untersuchungen des namensgebenden Vertreters der *LBD* Genfamilie *LOB*, dass *LOB* in *as1* und *as2* Mutanten herunterreguliert wird und daher vermutlich durch *AS1* und *AS2* positiv reguliert wird (Byrne *et al.*, 2002). Da *AS1* einen Myb Transkriptionsfaktor kodiert, der in Organprimordien exprimiert wird (Byrne *et al.*, 2000) und die Expression von *LOB* in einer bandförmigen Domäne an der adaxialen Basis der lateralen Organe und Organprimordien des Sprosses und der Wuzel verläuft, besteht eine mögliche Funktion von *LOB* darin, die Organprimordien von dem umgebenden Gewebe des SAM abzugrenzen (Shuai *et al.*, 2002). Leider zeigen Funktionsverlustmutationen von *LOB* keinen sichtbaren Phänotyp.

### 1.3.3. Spätzünder-ID

Der spätblühende Phänotyp in der *spz-ID* Mutante ist möglicherweise das Ergebnis der ektopischen Expression des bislang nicht charakterisierten Myb-Faktors At1g18330, der Ähnlichkeit zu CCA1 und LHY besitzt. Interessanterweise wurde auch *LHY* als dominante Mutation durch Aktivierungsmutagenese identifiziert. In dem dort verwendeten System wurde ein modifiziertes Ac/Ds Element aus Mais zusammen mit dem 35S Promoter verwendet (Wilson *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die wildtypische Expression von *LHY* im Tagesrhythmus diurnal oszilliert und *LHY* seine eigene Expression in einem Rückkopplungsmechanismus reguliert. Der verzögerte Blühzeitpunkt in *lhy* lässt sich darauf zurückführen, dass in der Mutante *LHY* verstärkt und gleichförmig transkribiert wird (Schaffer *et al.*, 1998). In der Kontrolle der circadianen Uhr besitzt *CCA1* vermutlich eine ähnliche Funktion wie *LHY*, da *CCA1* neben einer hohen Sequenzwandtschaft ein zu *LHY* identisches Expressionsprofil zeigt. Zudem führt die konstitutive Überexpression von *CCA1* zur verspäteten Blüte und zur Suppression von *LHY* und *CCA1* selbst (Wang und Tobin, 1998; Alabadi *et al.*, 2001). Da *Arabidopsis* eine fakultative Langtagpflanze ist, die unter Langtagbedingungen zu blühen beginnt und die Transition vom vegetativen Wachstum zur Blühphase von Umwelteinflüssen wie der Tageslänge gesteuert wird, wird angenommen dass in *LHY* und *CCA1* überexprimierenden Pflanzen die Perzeption der Photoperiode gestört ist (Barak *et al.*, 2000).

Da *spz-ID* den gleichen Phänotyp wie *LHY* und *CCA1* überexprimierende Pflanzen zeigt, könnte die unregulierte Expression des verwandten Myb-Faktors At1g18330 ebenso in der Fehlregulation der circadianen Uhr resultieren. Da *spz-ID* eine semidominante Mutation darstellt und wahrscheinlich nur ein verkürztes Protein von At1g18330 gebildet werden kann, handelt es sich möglicherweise um einen dominant-negativen Dosis-Effekt, in dem ein nicht-funktionelles Duplikat von At1g18330 mit dem wildtypischen Protein um Zielgene konkurriert, oder in Protein-Protein Interaktionen eingreift. Alternativ könnte das in *spz-ID* gebildete Transkript die Expression des nativen *At1g18330* beeinflussen.

---

Insgesamt stellt die *spz-ID* Mutation ein Beispiel für den Prozess der Diversifikation eines duplizierten Gens dar. Da Transposon-Sequenzen als natürliches Mutagen den Austausch von Genomabschnitten vermitteln, kann die Insertion eines Transposons *cis*-agierende Elemente voneinander trennen oder verknüpfen (Kloeckener-Gruissem und Freeling, 1995; Chuzhanova *et al.*, 2000; Hoshino *et al.*, 2001). Eine Transposoninsertion kann jedoch auch direkt das Expressionsverhalten eines Gens beeinflussen. In *Drosophila* können Retrotransposons wie das *tom* Element gewebespezifische Expression vermitteln (Tanda und Corces, 1991) und die Insertion eines P-Elements kann zur transkriptionellen Aktivierung führen (Ito *et al.*, 1993). Für das *Ty* Element aus Hefe wurde gezeigt, dass die terminalen Sequenzen Enhancer-ähnliche Elemente enthalten, die zur 20-fach verstärkten Expression des betroffenen Gens führen können (Errede *et al.*, 1987; Roelants *et al.*, 1997). In *spz-ID* wird die Regulation eines duplizierten Gens durch die Insertion eines Transposons, das Enhancersequenzen trägt, „künstlich“ verändert.

## 2. DORNRÖSCHEN

### 2.1. Struktur und Phylogenie

Das DRN Protein ist ein Mitglied der ERF Familie, die eine Subgruppe der AP2/ERF Familie von Transkriptionsfaktoren darstellt. Diese pflanzenspezifische Genfamilie umfasst in *Arabidopsis* 150 Mitglieder (*Arabidopsis Genom Projekt*, Stand 08/2002) und innerhalb des Pflanzenreichs wurden bislang ungefähr 250 AP2/ERF Faktoren identifiziert, von denen die Mehrzahl der ERF Subfamilie angehören.

Charakteristisch für die AP2/ERF Familie ist das hoch konservierte 60 Aminosäuren große DNA Bindungsmotiv der AP2 Domäne (Weigel, 1995; Riechmann und Meyerowitz, 1998). Im phylogenetischen Stammbaum auf der Basis dieser hochkonservierten Domäne, wird die Multigenfamilie in Subgruppen aufgetrennt, wobei die AP2- und ERF Subfamilien unterschiedlichen phylogenetischen Linien angehören (Abb.22A).

Die Mitglieder der AP2 Subfamilie wurden als Regulatoren der Blüten- und Meristementwicklung isoliert, wie das namensgebende APETALA2 Protein, INDETERMINATE SPIKELET oder AINTEGUMENTA (Bowman *et al.*, 1989; Jofuku *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1998; Elliot *et al.*, 1996; Klucher *et al.*, 1996). Ein weiteres Merkmal der Proteine der AP2 Subfamilie ist die Tatsache, dass sie zwei AP2 Domänen enthalten, wobei die Kombination der DNA bindenden Motive notwendig zur Bindung an DNA ist, wie für AINTEGUMENTA gezeigt wurde (Nole-Wilson und Krizek, 2000).

Die ERF Faktoren wurden aufgrund ihrer gemeinsamen Eigenschaft identifiziert, an das kurze Ethylen-responsive *cis*-Element der GCC-Box binden zu können (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995). Die GCC-Box wird in Pathogenabwehr-assoziierten Genen gefunden, die durch Ethylen induziert werden (Ohme-Takagi und Shinshi, 1990). Indem biotischer und abiotischer Stress in Form von Pathogenbefall, Verwundung, Temperatur oder Trockenheit zur Produktion von Ethylen führen, nehmen viele ERF Faktoren an dieser Stressantwort teil (Ecker, 1995; O'Donnell *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998). Obwohl die Mitglieder der ERF Subfamilie nur eine AP2 Domäne besitzen, ist die Interaktion mit einem zweiten ERF Faktor nicht notwendig zur Bindung an DNA. Für eine Reihe von ERF Faktoren, darunter AtERF1 bis AtERF5 konnte gezeigt werden, dass sie spezifisch die Kern-Zielsequenz AGCCGCC (GCC-Box) erkennen (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995; Zhou *et al.*, 1997;

Solano *et al.*, 1998). An AtERF1 wurde nachgewiesen, dass die einzelne AP2 Domäne stabile Interaktionen mit der GCC-Box ausbilden kann (Allen *et al.*, 1998, Hao *et al.*, 1998). Daher wird angenommen, dass die AP2 und ERF Faktoren bezüglich ihrer DNA-Bindung unterschiedliche Transkriptionsfaktoren darstellen (Fujimoto *et al.*, 2000).

Da die Interaktion von Transkriptionsfaktoren die transkriptionelle Genregulation durch Spezifizierung einer Zielsequenz und Erhöhen der Bindungsaffinität zu Promoterelementen beeinflusst (Blackwood und Eisenmann, 1991; Sessa *et al.*, 1993; Stark und Johnson 1994; Huang *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999), werden Homo- und Heterodimerisierung auch für die Proteine der ERF Subfamilie angenommen (Riechmann und Meyerowitz, 1998). Unter den ERF Faktoren konnte für AtEBP eine Interaktion mit dem bZip-Faktor OBF4 beobachtet werden (Büttner und Singh, 1997).

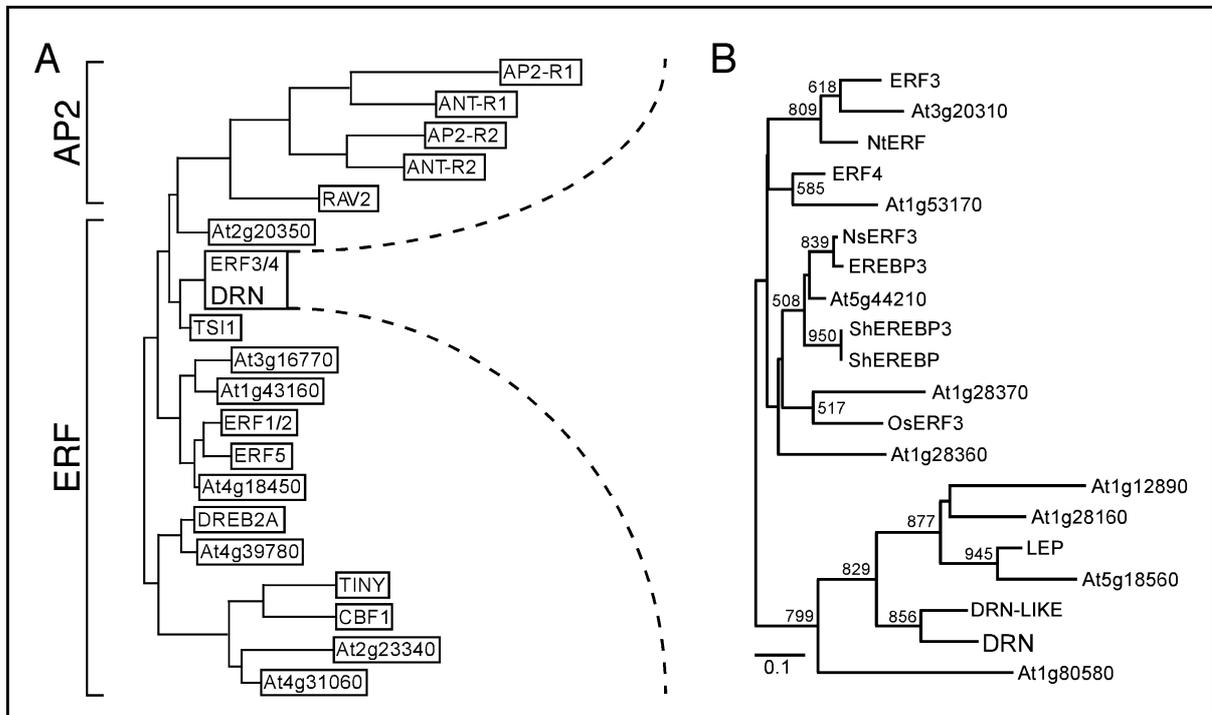
Innerhalb der AP2 Domäne weist DRN an den Positionen, die in AtERF1 DNA-Basenkontakte zur GCC-Box vermitteln nur einen einzelnen Aminosäureaustausch auf, wobei Lysin an die Stelle von Arginin tritt. Daher kann angenommen werden, dass auch das DRN Protein die GCC-Box erkennt. Das DRN Protein läßt sich aufgrund der Sequenzähnlichkeit der N-terminal gelegenen AP2 Domäne innerhalb der ERF Subfamilie zur Klasse II der ERF Proteine zählen. Für die Funktion als Transkriptionsfaktor ist die nukleäre Lokalisation von DRN eine notwendige Voraussetzung und wird dadurch demonstriert, dass bei Überexpression von *DRN-GR* in Abhängigkeit zur Hormongabe ein weitgehend übereinstimmender Phänotyp zu *drn-ID* beobachtet wird. Als mögliches Kernlokalisierungssignal (NLS) befindet sich eine kurze basische Sequenz am Aminoterminus der AP2 Domäne. Damit überlappt das mögliche NLS mit dem DNA Bindungsmotiv wie es auch für Opaque2, SRY oder EKLF gezeigt werden konnte (Varagona *et al.*, 1994; Sudbeck und Scherer, 1997; Pandya und Townes, 2002).

Außerhalb der AP2 Domäne besitzt DRN keine signifikante Homologien zu bereits charakterisierten Motiven. Es sind keine Dimerisierungsmotive wie Leucin-Zipper oder Helix-Loop-Helix Motive, keine bekannten transkriptionsaktivierenden Domänen wie ausgedehnte Cluster aus Glutamin-, Serin-/Threonin- oder sauren Resten (Mitchell und Tjan, 1989; Gerber *et al.*, 1994; Remacle *et al.*, 1997). Für die bekannten Vertreter der ERF Klasse II AtERF3 und AtERF4 konnte gezeigt werden, dass es sich um transkriptionelle Repressoren handelt. Das DRN Protein besitzt jedoch nicht die für AtERF3 und AtERF4 beschriebene Repressordomäne (EAR Domäne). Allerdings zeigt der Vergleich von DRN und DRN-LIKE, dass der Anteil von Prolin- und Serin-/Threonin Resten in beiden Proteinen carboxyterminal

zur AP2 Domäne signifikant erhöht ist. Für die PAX Proteine (PAX-5) wurde gezeigt, dass eine C-terminal gelegene 55 Aminosäuren große Domäne mit einem hohen Anteil von Prolin und Serin-/Threonin Resten Transkriptionsaktivierung vermittelt (Dorfler und Busslinger, 1996). In SPI-B wurde eine Prolin-/Serin/Threonin- reiche Region als transaktivierende Domäne identifiziert (Rao *et al.*, 1999). Daher könnten auch DRN und DRN-LIKE im C-terminalen Bereich eine aktivierende Domäne enthalten.

Eine Folge von konservierten Prolinresten am Carboxyterminus von DRN ist hierbei besonders auffällig. Dieses Motiv könnte auch zusammen mit dem hohen Anteil an Serin- und Threoninresten eine Funktion als PEST-Sequenz besitzen. Solche PEST-Sequenzen bestehen aus einer Abfolge von Prolin-, Aspartat-, Serin oder Threoninresten und markieren ein Protein für den raschen proteolytischen Abbau (Rogers *et al.*, 1986; Chevallier, 1993; Rechsteiner und Rogers, 1996). Auch das DRN nah verwandte LEAFY PETIOLE (LEP) Protein enthält einen mehr als 20 Aminosäuren großen Bereich aus Serin- und Prolinresten, der wahrscheinlich eine PEST Sequenz darstellt (van der Graaf *et al.*, 2000).

Neben *TINY* ist *LEP* zudem bislang der einzige Vertreter der ERF Subfamilie, der nicht an Abwehrreaktionen beteiligt ist. Interessanterweise wurden *TINY* und *LEP* wie *DRN* als Funktionsgewinnmutationen isoliert (Wilson *et al.*, 1996; van der Graaf *et al.*, 2000). Während die semidominante *tiny* Mutante pleiotrophe Veränderungen der Morphologie in Form von Zwergwachstum, Etiolierung des Hypokotyls und reduzierter Fertilität zeigt, führt die Überexpression vom *LEP* zur Bildung von Blättern mit fehlender Petiole und kürzeren Schoten. In der phylogenetischen Rekonstruktion befindet sich *LEP* zusammen mit *DRN*, *DRN-LIKE* und vier weiteren Vertretern aus *Arabidopsis* in einer abgegrenzten Subgruppe von Proteinen mit Verwandtschaft zu ERF3 und ERF4 (Abb. 22B). Die Phylogenie läßt die Vermutung zu, dass alle Mitglieder dieses Zweiges eher an der Kontrolle entwicklungsbiologischer Prozesse beteiligt sind als an den Signalwegen einer Stressantwort. Möglicherweise besitzen diese Faktoren teilweise überlappende Funktionen, wie sie für die KNOTTED I Familie der Homeobox-Faktoren aus *Arabidopsis* beschrieben sind (Chan *et al.*, 1998). Die nahe Verwandtschaft von *DRN* und *DRN-LIKE* erklärt sich durch den Ursprung beider Gene aus einer intrachromosomalen Duplikation auf Chromosom 1. Nach einer Duplikation kann eines der duplizierten Gene Mutationen akkumulieren. Unter positivem Selektionsdruck entstehen abweichende Funktionen, während die ursprüngliche Funktion nicht völlig verloren wird (partielle Redundanz) (Nowak *et al.*, 1997; Wagner, 2001; Long, 2001).



**Abbildung 22:** Phylogenetische Analysen der AP2 Proteine. Zum globalen phylogenetischen Vergleich der AP2 Proteine (A) wurden die Sequenzen der 60 Aminosäuren große AP2-Domäne von 168 Vertretern einander zugeordnet und nach der ClustalW Methode als multiples Alignment analysiert (Thompson *et al.*, 1994). Zur Vereinfachung ist jeweils nur ein Vertreter einer Subgruppe dargestellt. Die Phylogenie-Rekonstruktion der ERF3/4 Subgruppe (B) wurde in Phylip 3.5 (Felsenstein, 1986; Fink, 1986) nach Fitch-Margoliash mit einer Distanz Matrix erstellt. Bootstrap Werte von weniger als 500 wurden vernachlässigt. Die Proteinsequenzen wurden der ProDom Datenbank entnommen (Corpet *et al.*, 2000). Die Länge der horizontalen Zweige sind proportional zum geschätzten phylogenetischen Abstand.

## 2.2. *DRN* Expressionsmuster im Wildtyp

Das Expressionsverhalten von *DRN* unterliegt während des gesamten Lebenszyklus einer hohen zeitlichen und gewebespezifischen Kontrolle. *DRN* wird bereits in der frühen Phase der Embryogenese ubiquitär im 4-Zellstadium exprimiert und nimmt möglicherweise in der frühen Embryogenese an Musterbildungsprozessen teil. Während im späten globulären Embryo das präsumptive SAM angelegt wird und *STM* Expression beginnt (Long und Barton, 1998), verlagert sich die *DRN* Expression in die sich bildenden Kotyledonen und markiert erst ab dem Torpedostadium das embryonale SAM. Bemerkenswerterweise ist das Muster sehr lokal und betrifft nur wenige Zellen der L1 und L2 Schicht im Zentrum des embryonalen SAM. *DRN*-Aktivität beginnt damit erst nach der Strukturierung des SAM in L1, L2 und L3 Schicht (Long und Barton, 1998) und nach der Etablierung der Expression der *CLV* Gene 1 und 3 im Herzstadium (Long und Barton, 1998; Fletcher *et al.*, 1999). Auch nach der Keimung wird *DRN* Transkript stets in wenigen apikalen Zellen der zentralen Zone des vegetativen, Infloreszenz- und der Blütenmeristems gefunden.

Zusätzlich markiert *DRN* in der vegetativen und reproduktiven Phase die Anlagen der lateralen Blatt- und Blütenorgane und der Blütenmeristeme. Da die Position für die Anlagen von Blütenmeristemen bereits als P-1 Primordium angezeigt wird, stellt *DRN* eines der frühesten bekannten molekularen Markergene für Blütenprimordien innerhalb des SAM dar. Während der Fruchtentwicklung besitzt *DRN* ein bemerkenswertes Expressionsmuster, da kein anderer Marker die Positionen der späteren Ovulenprimordien anhand einzelner Zellen prognostiziert, bevor sie histologisch sichtbar werden. Im Ovulenprimordium selbst wird *DRN* Transkript in einer zentralen, apikalen Zelle detektiert. Da zur Bildung des Ovulenprimordiums in *Arabidopsis* vor allem perikline Zellteilungen der L2 und L3 Schicht beitragen, und die Archesporenmutterzelle des Ovulenprimordiums aus der Zelle unterhalb der *DRN* Expression hervorgeht (Schneitz *et al.*, 1995; Drews *et al.*, 1998; Sessions, 1999), setzt eine Beteiligung von *DRN* bei der Ovulenentwicklung voraus, dass *DRN* hier nicht zell-autonom agiert. Da das Expressionsmuster von *DRN* insgesamt synchron zur Anlage von Organen während der Embryogenese, der Blatt- und Blütenentwicklung und der Ovulenentwicklung verläuft, besteht eine mögliche Funktion von *DRN* darin, primordiales Schicksal festzulegen und Organogenese zu fördern. Eine redundante Funktion zu *DRN* könnte hierbei *DRN-LIKE* besitzen, da seine Expression ebenso die jüngsten Organprimordien markiert. Auch *LEP* zeigt ein mit *DRN* überlappendes Muster, da Blattprimordien und Stipulen *LEP*-Aktivität zeigen (van der Graaf *et al.*, 2000). Im Unterschied zu *LEP* und *DRN-LIKE* wird *DRN* allerdings zusätzlich kontinuierlich innerhalb der Stammzellpopulation der zentralen Zone des SAM exprimiert. Möglicherweise weist dieses Ergebnis darauf hin, dass *DRN* eine zusätzliche Funktion in der Kontrolle der Stammzellpopulation besitzt, die eventuell unabhängig von seiner Rolle bei der Organinitiation ist.

### 2.3. Konsequenzen der Fehlexpression und biologische Aufgaben von *DRN*

In der durch Aktivierungsmutagenese isolierten *drn-ID* Mutante verliert das SAM wenige Tage nach Keimung seine wildtypische Aktivität und vergrößert sich. Hierbei unterliegt das SAM grundlegenden Veränderungen der Organisation, da die typische Strukturierung in L1, L2 und L3 Schicht verloren geht.

#### 2.3.1. Vergleich ektopischer und konstitutiver Expression

Die beobachteten Veränderungen lassen sich darauf zurückführen, dass der *DRN* Promoter aufgrund der Insertion des Enhancer-Tetramers nur noch eingeschränkt einer transkriptionellen Kontrolle unterliegt. Eine räumliche Kontrolle bleibt in *drn-ID* allerdings grundsätzlich erhalten, da die *DRN* Expression auf das SAM beschränkt bleibt und sich nur wenig in die Blätter ausdehnt.

Im Vergleich dazu zeigt die Überexpression unter der Kontrolle eines viralen Promoters, dass auch Unterschiede in der Transkriptionsstärke einen Einfluss auf die phänotypischen Veränderungen besitzen, da Phänotypen variabler Stärke auftraten. Die beobachteten Defekte waren hierbei weitgehend auf die Gewebe und Organe beschränkt, in denen *DRN* wildtypisch exprimiert wird, da sowohl die Frucht- und Embryonalentwicklung (Schotenform und verringerte Fertilität) als auch die Meristemfunktion (Zwergwüchsigkeit und Meristemdefekte) durch die konstitutive Überexpression betroffen wurden. Die extreme Zwergwüchsigkeit und die morphologische Veränderungen der ersten Blätter bei sehr hohen Expressionsstärken deuten zudem an, dass bei konstitutiver Expression bereits die Blattanlage im embryonalen SAM gestört wird. Dagegen wirkt sich die Enhancerinsertion in *drn-ID* erst postembryonal aus. Da das wildtypische Expressionsmuster lediglich verstärkt wird, verringert sich das Ausmaß der Fehlexpression und die Zahl pleiotropher Defekte. Bei der Überexpression von *DRN-GR* traten im Vergleich zur *drn-ID* Mutante keine zusätzlichen phänotypische Veränderungen auf. Dies läßt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die Funktion von *DRN* von zusätzlichen Faktoren im SAM abhängig ist.

Insgesamt besitzt die Enhancer-vermittelte Überexpression gegenüber einer konstitutiven Expression vermutlich den Vorteil, dass der Phänotyp mehr Rückschlüsse auf die wildtypische Funktion zulässt. Dies zeigt sich auch darin, dass bei der konstitutiven Überexpression von *DRN* nur ein geringer Teil der transgenen Pflanzen einen Meristemarrest zeigt und die Überexpression von *DRN-LIKE* zwar zu weitgehend identischen Phänotypen führt, aber keine Arretierung des SAM beobachtet wird. Eventuell äußert sich gerade in den 35S:: *DRN* Pflanzen, die einen Verlust der Meristemfunktion zeigen, ein funktioneller Unterschied zwischen *DRN* und *DRN-LIKE*, obwohl sie sonst vielleicht partiell eine Redundanz besitzen.

Da die Überexpression von *DRN* zu dramatischen morphologischen Veränderungen des SAM führt und das SAM seine wildtypische Funktion der Selbsterhaltung und fortwährender Organbildung verliert, ist anzunehmen, dass *DRN* an diesen Prozessen grundlegend beteiligt ist, obwohl der Funktionsverlust von *DRN* keinen sichtbaren Phänotyp zeigt. Es erscheint wahrscheinlich, dass das Fehlen eines mutanten Phänotyps sich auf genetische und/oder funktionelle Redundanz zurückführen lässt. Das Phänomen der Redundanz wird besonders häufig für transkriptionelle Regulatoren beobachtet, da diese im Vergleich zu Komponenten der Signaltransduktion weniger konserviert erhalten werden, und während der Evolution stärker evolvieren (Doebley und Lukens, 1998). Dies äußert sich darin, dass Mitglieder von Signalkaskaden bei Funktionsverlust wesentlich häufiger einen starken Phänotyp zeigen als Transkriptionsfaktoren. Auch für eine Reihe wichtiger Regulatoren des Meristems ist bekannt, dass Mutationen nicht in einem Phänotyp resultieren (Aida *et al.*, 1997; Pelaz *et al.*, 2000; McConnell *et al.*, 2001). Aufgrund der phylogenetischen Analyse (Abb. 22B) erscheint *DRN-LIKE* als der wahrscheinlichste Kandidat, der eine zu *DRN* redundante Funktion besitzen könnte. Allerdings zeigen sowohl die Expressionsmuster als auch die Phänotypen der Überexpressionsexperimente wesentliche Unterschiede zwischen *DRN* und *DRN-LIKE*. Daher besitzt *DRN-LIKE* vermutlich nur partiell eine redundante Funktion zu *DRN*. Da *DRN* und *DRN-LIKE* Mitglieder einer untereinander hochverwandten Subgruppe von AP2/ERF Faktoren sind, könnte es erforderlich sein, Funktionsverlustmutationen mehrerer Vertreter zu durch multiple Kreuzungen vereinigen, um einen sichtbaren Phänotyp zu erzeugen.

### 2.3.2. *DRN* beeinflusst die Regulation von Schlüsselgenen des SAM

In der *drn-1D* Mutante zeigt das SAM eine grundlegend neue Organisation, da wichtige Regulatoren der Meristemfunktion wie *STM*, *CLV3* und *WUS* ihre wildtypischen Muster und ihre relative Lage zueinander verlieren. Während im Wildtyp *STM* Expression alle Zellschichten des SAM, mit Ausnahme der Primordien umfasst und die Expressionsdomänen von *CLV3* und *WUS* einschließt, wird *STM* im jungen *drn-1D* Keimling reprimiert. Da die Repression von *STM* eine Konsequenz der ektopischen *DRN* Expression darstellt, könnte *STM* ein mögliches Zielgen von *DRN* sein. Die *DRN* Expression alleine erscheint jedoch nicht ausreichend zur Repression von *STM*, da vor einem histologisch sichtbaren Meristemarrest *DRN* und *STM* in einer apikalen Domäne koexprimiert werden. Eine ähnliche Situation findet sich auch im wildtypischen SAM, wo *STM* und *DRN* gemeinsam in der zentralen Zone exprimiert werden. Im P0 Primordium wird *STM* jedoch herunterreguliert (Long und Barton, 2000), während *DRN* diese Anlagen markiert. Auch im vergrößerten mutanten *drn-1D* SAM schließen sich die Expressionsdomänen von *DRN* und *STM* gegenseitig aus, da *STM* in einer halbkugelförmigen Domäne oberhalb der *DRN* Expression erneut angeschaltet wird. Nach oben wird *STM* durch mehrere Schichten hoch vakuolisierter Zellen begrenzt, die wahrscheinlich ausdifferenzierte Zellen darstellen. Die Repression von *STM* im jungen *drn-1D* SAM löst möglicherweise den Differenzierungsprozess aus, da *STM* den meristematischen Zustand des SAM aufrechterhält und Gene der lateralen Organentwicklung reprimiert (Byrne *et al.*, 2000; Ori *et al.*, 2000; Semiarti *et al.*, 2001). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die ektopische Expression von *DRN* den Differenzierungsprozess bereits zu einem frühen Zeitpunkt fördert, und *STM* wie im Wildtyp in sich differenzierenden und differenzierten Zellen anhaltend herunterreguliert wird (Long *et al.*, 1996; Long und Barton, 2000). Da die Kombination von *drn-1D* mit Funktionsverlustallelen von *stm* zu additiven Phänotypen führt, scheint die Funktion von *DRN* nicht notwendig an die Anwesenheit von *STM* geknüpft zu sein.

Im Gegensatz zu *STM* verändert sich die Expressionsdomäne von *CLV3* in *drn-1D* parallel zur *DRN* Expression, indem sie sich lateral und basal ausdehnt. Im Endzustand werden *DRN* und *CLV3* in einer weitgehend identischen Expressionsdomäne exprimiert, die vermutlich die aberante Stammzellpopulation in *drn-1D* repräsentiert. Die verstärkte *CLV3* Expression in *drn-1D* führt jedoch nicht zur erwarteten Repression von *WUS*, da auch *WUS* in einer ausgedehnten Domäne gemeinsam mit *DRN* koexprimiert wird (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). Eine angenommenen Aktivierung von *WUS* durch *DRN* kann umgekehrt in einer erweiterten Expression von *CLV3* resultieren, wenn in *drn-1D* die Repression von *WUS* durch *CLV3* gestört ist. Im mutanten *drn-1D* SAM unterliegt damit anscheinend die Kontrolle der Stammzellpopulation aufgrund der ektopischen *DRN* Expression nicht mehr dem negativen Rückkopplungsmechanismus durch *CLV3* und *WUS* (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000), die auch nicht mehr räumlich voneinander getrennt exprimiert werden. *DRN* wirkt jedoch nicht direkt auf diesen Regelkreis, da in den Doppelmutanten von *drn-1D* und den Funktionsverlustallelen von *CLV3* und *WUS* additive Phänotypen auftraten. Da die *DRN* Promoter GUS-Linie im *drn-1D* Hintergrund keine Expression zeigt, wird *DRN* nicht direkt von *CLV3* oder *WUS* positiv reguliert. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass *DRN* seine eigene Transkription herunterreguliert. Interessanterweise zeigen Blüten der *drn-1D* Mutante und der Überexpressionspflanzen zwar auch eine frühzeitige Arretierung des Meristems, da die inneren Blütenorgane fehlen, allerdings wird keine Vergrößerung des Blütenmeristems beobachtet. Dies läßt sich eventuell darauf zurückzuführen, dass das florale Meristem im Gegensatz zum vegetativen Meristem und Infloreszenzmeristem terminiert ist. Da die Termination des floralen Meristems durch die Repression von *WUS* durch den MADS-Box Faktor AGAMOUS (AG) kontrolliert wird (Lohmann *et al.*, 2001; Lenhard *et al.*, 2001), ist eine Vergrößerung der Stammzellpopulation in *drn-1D* möglicherweise von *WUS* abhängig. Bei Fehlregulation von *DRN* proliferiert die Stammzellpopulation unkontrolliert und unterliegt ständiger Zellteilung. Neu gebildete Zellen werden nicht wie im Wildtyp in der Anlage neuer Organe verbraucht, da die Integrität des SAM in *drn-1D* insgesamt aufgehoben wird. Der Mechanismus der Organbildung ist nicht mehr funktionell, da die *STM* Expressionsdomäne nicht mit der *WUS* und *CLV3* Expression überlappt (Brand *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2002).

### 2.3.3. Einfluss von *DRN* auf die laterale Organentwicklung

Ein weiteres wichtiges Merkmal des *drn-1D* Phänotyps ist, dass Blattorgane häufig zu radialisierten Filamenten reduziert sind. Dies zeigt an, dass die ad-/abaxiale Polarität der lateralen Organe durch eine Fehlexpression von *DRN* schwerwiegend beeinträchtigt wird, indem die *DRN* Expression in den Blattprimordien verstärkt wird, und auch in jungen Blättern auftritt. Es kann angenommen werden, dass Gene, die für den Aufbau der ad-/abaxiale Polarität essentiell sind in *drn-1D* fehlreguliert werden (Siegfried *et al.*, 1999; Bohmert *et al.*, 1998; McConnell *et al.*, 2001). Hierbei kommen die HD-ZIP Gene *PHABULOSA* (*PHB*) und/oder *PHAVOLUTA* (*PHV*) als Zielgene von *DRN* in Betracht oder könnten an der Regulation von *DRN* beteiligt sein, da beide Gene sowohl im Zentrum des SAM als auch in Organanlagen exprimiert werden (McConnell *et al.*, 2001). Weitere Evidenz für diese Vermutung liefert die Beobachtung, dass in der Funktionsverlustmutation des *PHB/PHV* nah verwandten *REVOLUTA* (*REV*) Gens wie in *drn-1D* eine Radialisierung der Blattorgane und eine Arretierung und Vergrößerung des SAM auftritt (Talbert *et al.*, 1995). In den semidominanten Mutationen *phb-1D* und *phv-1D* entstehen an der Basis der adaxialisierten Organe ektopisch sekundäre Meristeme (McConnell *et al.*, 1998), während in der *rev* Mutante die Bildung sekundärer Meristeme reduziert ist. Daher wird angenommen, dass *PHB/PHV* und *REV* partiell redundant sein könnten (Bowman *et al.*, 2002). Da die radialisierten Filamente in *drn-1D* abaxialisierten Merkmale zeigen, agieren *PHB/PHV* und/oder *REV* möglicherweise antagonistisch zu *DRN*. Die Proteine *PHB/PHV* besitzen eine putative Sterol/Lipid- bindende Domäne und es wird diskutiert, dass *PHB* und *PHV* zur Spezifizierung der adaxialen Identität Signale aus dem Zentrum des SAM perzipieren. An diesem Prozess könnte *DRN* antagonistisch beteiligt sein und am Informationsaustausch zwischen der peripheren und zentralen Zone teilnehmen. Hierbei könnte *DRN* in Zellen, die die zentrale Zone verlassen Differenzierung und Zellteilung zu einem frühen Zeitpunkt fördern, um den Eintritt dieser Zellen in die periphere Zone zu beschleunigen. Durch eine Fehlexpression von *DRN* wird in einem ersten Schritt ein ungerichteter Differenzierungsprozess ausgelöst, durch den die kontrollierte Organbildung zum Stillstand kommt. Für die Stammzellpopulation hat dies zur Folge, dass sie sich nach basal ausdehnen muß und anschließend unter erhöhter Proliferation vergrößert.

#### 2.3.4. *DRN* als "Enhancer of Shoot Regeneration" ?

Zusätzliche Informationen zur möglichen Funktion und Regulation von *DRN* liefern die von Banno *et al.* (2001) dargestellten Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass *DRN* möglicherweise durch Cytokinin positiv reguliert wird.

Die Regeneration von Wurzeln oder Sprossen in Gewebekulturen ist vom Mengenverhältnis der zugeführten Hormone Auxin und Cytokinin abhängig. Sind beide Hormone im gleichen Verhältnis im Nährmedium anwesend wird Callus gebildet und eine Regeneration unterbleibt. Bei einem hohen Anteil von Auxin im Verhältnis zu Cytokinin werden Wurzeln gebildet, bei einem umgekehrten Verhältnis bilden sich Sprosse (Reinert und Bajaj, 1977).

In einer Wurzelgewebekultur konnten Banno *et al.* (2001) zeigen, dass die konstitutive Überexpression der *DRN* cDNA zu einer Cytokinin-unabhängigen Regeneration von Sprossen führt. Da zudem in Cytokinin-haltigen Medium die Fähigkeit zur Sprossbildung in *DRN* überexprimierenden Wurzelzellen insgesamt verstärkt wurde, nehmen Banno *et al.* an, dass *DRN* synergistisch zu Cytokinin agiert.

Weiterhin wurde *DRN* in Auxin-vorbehandelten Wurzelzellen durch Cytokininbehandlung nach 24 Stunden transient aktiviert. Nach 72 Stunden konnte kaum noch *DRN* Transkript detektiert werden, jedoch nahm die *DRN* Expression während der nächsten 14 Tage erneut zu. Da nach dieser Zeit auch *STM* Expression nachgewiesen werden konnte, wird von Banno *et al.* vorgeschlagen, dass *DRN* unter der direkten positiven Kontrolle durch Cytokinin steht und die *de novo* Bildung von Sprossen fördert, wenn die Zellen die Kompetenz zur Organogense besitzen.

Die von Banno *et al.* gezeigten Beobachtungen liefern zwar einen bemerkenswerten Beitrag zur einer möglichen Regulation von *DRN* durch Cytokinin, jedoch ist eine direkte Regulation von *DRN* durch Cytokinin nicht anzunehmen. Ein signifikanter Anstieg nach 24 Stunden deutet vielmehr darauf hin, dass es sich um eine sekundäre Antwort handelt. Es erscheint wahrscheinlicher, dass durch die Cytokiningabe Zellteilungen ausgelöst werden und Proliferation gefördert wird, mit der auch *DRN* aktiviert wird.

Eine Beteiligung von *DRN* an den von Banno *et al.* beschriebenen Prozessen ist in ihrer Einfachheit fraglich, da die Wirkungsweise von Cytokinin innerhalb des SAM wahrscheinlich eher grundsätzlicher Natur ist und nicht an eine örtlich begrenzte, und komplexe Regulation geknüpft ist, wie sie das Expressionsmuster von *DRN* im SAM fordert. Zudem wurden die Analysen durch Banno *et al.* an Wurzelexplantaten durchgeführt, während *DRN* jedoch im Wildtyp dort nicht exprimiert wird.

In der *pt/amp1* Mutante aus *Arabidopsis* wird eine erhöhte Cytokinin Konzentration festgestellt, und eine von mehreren phänotypische Veränderungen ist eine Vergrößerung des SAM bereits während der Embryogenese (Conway und Poethig, 1997; Mordhorst *et al.*, 1998). *PT/AMPI* kodiert für ein Protein mit Ähnlichkeit zu einer Glutamat-Carboxypeptidase und wird in allen Geweben exprimiert (Helliwell *et al.*, 2001). Obwohl die Funktion von *PT/AMPI* nicht völlig geklärt ist, wird angenommen, dass die erhöhte Cytokinin Konzentration eine Folge der Vergrößerung des SAM ist, und nicht die Ursache (Helliwell *et al.*, 2001).

Die Überexpression von *DRN* führt als erste Konsequenz zu einer Repression des *KNOX* Gens *STM* und zu einem Verlust der Meristemfunktion. Jedoch zeigen Pflanzen, in denen Cytokinin überproduziert wird, eine erhöhte Expression von *KNOX* Genen und einen ähnlichen Phänotyp wie Pflanzen, die *KNOX* Gene überexprimieren. Daher wird vermutet, dass Cytokinin die Expression von Homöobox Genen wie *STM* fördert (Rupp *et al.*, 1999). Eine Cytokinin-unabhängige Sprossbildung in *DRN* überexprimierenden Wurzelzellen, läßt sich daher möglicherweise darauf zurückführen, dass *DRN* Gene positiv reguliert, die an Meristembildung beteiligt sind, oder Meristemaktivität fördern. Die von Banno *et al.* dargestellten Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass *DRN* während der frühen Embryogenese die Bildung des Meristem unterstützt. Weiterhin decken sich die Beobachtungen von Banno *et al.* mit einer möglichen Funktion von *DRN* darin, Zellteilung zu fördern, da Cytokinin in diesen Prozess maßgeblich eingreift.

### 3. Ausblick

Einige der zuvor für das TAMARA System erwähnten Anwendungen sind in Vorbereitung, oder werden bereits durchgeführt. Die für *DRN* vorliegenden Resultate bedürfen weiterer und fortführender Experimente, die zum Teil bereits eingeleitet sind, oder bearbeitet werden.

#### TAMARA:

- Die TAMARA Insertionslinien werden zur Zeit unter veränderten Umweltbedingungen im Hinblick auf Trocken- und Salztoleranz durchmustert, und physiologische Untersuchungen sind geplant.
- Zur Erzeugung weiterer stabiler Insertionen ist vorgesehen, solche TAMARA Starterlinien stärker zu propagieren, in denen die Mehrzahl dominanter Phänotyp identifiziert werden konnte.
- Experimente zur Remobilisierung von *dTAM* Elementen sind initiiert.
- Eine Übertragung des TAMARA Systems in *Antirrhinum* ist eingeleitet (Dr. S. Schwarz-Sommer, MPIZ Köln).

#### DORNRÖSCHEN:

- Für das *DRN* nah verwandte Gen *DRN-LIKE* konnte bereits eine Verlustmutation innerhalb einer *En/Spm* Insertionspopulation identifiziert werden (Aarts *et al.*, 1995). Eine Charakterisierung des Allels, und Kreuzungen zum Funktionsverlustallel von *DRN* werden zur Zeit bearbeitet.
- Umfangreiche Untersuchungen auf mögliche Interaktionspartner des DRN Proteins werden zur Zeit im Zwei-Hybrid System durchgeführt (Fields und Song, 1989).
- Durch die weitere Analyse der *DRN::GUS* Linie im Hintergrund verschiedener Verlustmutationen könnten positive oder negative Regulatoren der *DRN* Expression identifiziert werden. Die Applikationen verschiedener Hormone wird möglicherweise darüber Auskunft geben, inwieweit der *DRN* Promoter einer hormonellen Kontrolle unterliegt. Es erscheint zudem sinnvoll den *DRN* Promoter durch Deletionen näher zu charakterisieren, um Promoterabschnitte zu identifizieren, die Gewebespezifität vermitteln oder das Expressionsmuster von *DRN* lokal diskriminieren.
- Weiterhin sollte die Charakterisierung der *drn-ID* Mutante mit Hilfe weiterer Markergene fortgesetzt werden. Hierbei sind Gene, die wie *AINTEGUMENTA* in Organprimordien exprimiert werden besonders interessant, aber auch *PHABULOSA* oder Zellzyklus-spezifische Gene.

## VI ZUSAMMENFASSUNG

Für den pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wurde das Transposon-vermittelte Aktivierungsmutagenesesystem TAMARA etabliert, um dominante Mutationen zu erzeugen. Zur transkriptionellen Aktivierung benachbarter Gene trägt im TAMARA System ein modifiziertes *dSpm* Element (*dTAM*) ein Tetramer des CaMV 35S Enhancers. Durch Verwendung positiver und negativer Selektionsmarker werden im TAMARA System ungekoppelte und stabile Transpositionereignisse isoliert:

Insgesamt wurde eine Population von 13000 Pflanzen mit stabilen Transpositionereignissen erzeugt, die einen geschätzten Anteil von 7000 unabhängigen Ereignissen enthält. Aufgrund ihrer veränderten Morphologie konnten in der TAMARA Population mehrere dominante Mutationen identifiziert und die Insertionsstelle des *dTAM* Elements durch inverse PCR bestimmt werden.

Eine der identifizierten dominanten Mutationen wurde aufgrund ihres Phänotyps detailliert untersucht: In der dominanten *Dornröschen-ID* (*drn-ID*) Mutation stellt das Sprossapikalmeristem seine Aktivität nach Bildung von 6-8 Rosettenblättern ein, vergrößert sich und produziert gelegentlich radialisierte und zu Filamenten reduzierte Blattorgane. Das von der Mutation betroffene *DORNRÖSCHEN* (*DRN*) Gen kodiert für einen putativen Transkriptionsfaktor der AP2/ERF Klasse und wird im Wildtyp innerhalb des Sprossapikalmeristems sowohl in Zellen der zentralen Zone als auch in Organanlagen exprimiert. Die Analyse der *DRN* Expression in *DrnD* ergab, dass die Insertion des Enhancers nicht zur ubiquitären Überexpression von *DRN* führt, sondern sich die Expression in das Zentrum des mutierten Meristems ausdehnt. Durch Verwendung von Markergenlinien wurde gezeigt, dass Gene, die im Wildtyp die Meristemaktivität kontrollieren in der *drn-ID* Mutation fehlreguliert werden. Das Homöobox Gen *SHOOTMERISTEMLESS* wird in *drn-ID* Pflanzen zunächst herunterreguliert, in älteren Pflanzen jedoch in einer veränderten Domäne exprimiert. Die Gene *CLAVATA3* und *WUSCHEL*, die im Wildtyp durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Stammzellpopulation des Meristems kontrollieren, werden in *drn-ID* parallel zur *DRN* Expression in einer vergrößerten Domäne exprimiert.

Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *DRN* an der Organbildung beteiligt ist und die Differenzierung fördert. Möglicherweise beeinflusst *DRN* den Übertritt von Zellen aus der zentralen Zone in die periphere Zone. Da ein isoliertes Funktionsverlustallel keinen sichtbaren Phänotyp zeigt, wäre *DORNRÖSCHEN* in klassischen Mutagenesesystemen unentdeckt geblieben.

## VII KURZZUSAMMENFASSUNG

### In deutscher Sprache:

Zur Identifikation bislang unbekannter Gene, die eine Funktion in der Kontrolle des Sprossapikalmeristems besitzen wurde ein Transposon-vermitteltes Aktivierungsmutagenesesystem (TAMARA) in *Arabidopsis thaliana* etabliert, in dem durch die Insertion eines 35S Enhancertetramers dominante Mutationen erzeugt werden.

Unter mehreren dominanten Mutationen wurde die Funktionsgewinnmutante *Dornröschen-ID* (*drn-ID*) isoliert, in der das Sprossapikalmeristem vorzeitig arretiert und gelegentlich radialisierte Organe produziert. Das *DORNRÖSCHEN* (*DRN*) Gen kodiert für einen putativen Transkriptionsfaktor der AP2/ERF Klasse und wird im Wildtyp innerhalb des Sprossapikalmeristems in Zellen der zentralen Zone und in lateralen Organanlagen exprimiert. Die Fehlexpression von *DRN* bewirkt drastische Veränderungen der Meristemorganisation und führt zum Verlust der Meristemaktivität.

Die phänotypische Analyse der *drn-ID* Mutante und die veränderte Expression von Genen, die Meristemidentität kontrollieren wie *SHOOTMERISTEMLESS*, *WUSCHEL* und *CLAVATA3* weisen darauf hin, dass *DRN* an der Organbildung beteiligt ist und die Differenzierung fördert.

### In englischer Sprache:

To identify previously unknown genes which affect the function of the shoot apical meristem a transposon-mediated activation tagging system creating dominant gain-of-function alleles by insertion of a 35S enhancer, was established in *Arabidopsis thaliana*.

Among several other dominant mutations, the gain-of-function mutant *Dornröschen-ID* (*drn-ID*) was isolated. In *drn-ID* the shoot apical meristem arrests prematurely and radialized organs are produced occasionally. The *DORNRÖSCHEN* (*DRN*) gene encodes a putative transcription factor of the AP2/ERF class and is expressed within the stem cell population and lateral organ anlagen of the shoot apical meristem. *DRN* misexpression causes dramatic changes in meristem organisation, resulting in a failure to maintain an active meristem.

Phenotypic analysis of *drn-ID* and altered expression of genes controlling meristem identity like *SHOOTMERISTEMLESS*, *WUSCHEL* and *CLAVATA3* provide evidence that *DRN* is involved in organ formation and may promote differentiation.

## VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Aarts, M. G., Corzaan, P., Stiekema, W. J. Pereira, A.** (1995). A two-element Enhancer-Inhibitor transposon system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **247**, 555-64.
- Aarts, M. G., Dirkse, W. G., Stiekema, W. J. Pereira, A.** (1993). Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* **363**, 715-7.
- Abuodeh, R. O., Orbach, M. J., Mandel, M. A., Das, A. Galgiani, J. N.** (2000). Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Infect Dis* **181**, 2106-10.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. Tasaka, M.** (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841-57.
- Alabadi, D., Aguero, M. S., Perez-Amador, M. A. Carbonell, J.** (1996). Arginase, Arginine Decarboxylase, Ornithine Decarboxylase, and Polyamines in Tomato Ovaries (Changes in Unpollinated Ovaries and Parthenocarpic Fruits Induced by Auxin or Gibberellin). *Plant Physiol* **112**, 1237-1244.
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Mas, P. Kay, S. A.** (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**, 880-3.
- Allen, M. D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M. Masashi Suzuki, M.** (1998). A novel mode of DNA recognition by a  $\beta$ -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *Embo J* **17**, 5484-5496.
- Altmann, T., Felix, G., Jessop, A., Kauschmann, A., Uwer, U., Pena-Cortes, H. Willmitzer, L.** (1995). *Ac/Ds* transposon mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of *Ds* insertion mutants. *Mol Gen Genet* **247**, 646-652.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Aoyama, T. und Chau, N. H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**, 605-12.
- Ausubel, F.** (Hrsg. 1996). Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons, New York*.
- Azpiroz-Leehan, R. und Feldmann, K. A.** (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet* **13**, 152-6.
- Baker, B., Schell, J., Lorz, H. Fedoroff, N. V.** (1986). Transposition of the maize controlling element Activator in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4844-4848.
- Banks, J. A. und Fedoroff, N.** (1989). Patterns of developmental and heritable change in methylation of the suppressor-mutator transposable element. *Dev Genet* **10**, 425-437.
- Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q. W. Chua, N. H.** (2001). Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* **13**, 2609-18.
- Barak, S., Tobin, E. M., Andronis, C., Sugano, S. Green, R. M.** (2000). All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci* **5**, 517-22.

- Barakat, A., Gallois, P., Raynal, M., Mestre-Ortega, D., Sallaud, C., Guiderdoni, E., Delseny, M. Bernardi, G.** (2000). The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic Arabidopsis and rice. *FEBS Lett* **471**, 161-4.
- Baranowskij, N., Froberg, C., Prat, S. Willmitzer, L.** (1994). A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *Embo J* **13**, 5383-5392.
- Barton, M. K. und Poethig, R. S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Bechtold, N., Ellis, J. Pelletier, G.** (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *Mol Biol Genet* **316**, 1194-1199.
- Bechtold, N. und Pelletier, G.** (1998). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**, 259-66.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. Masterson, R.** (1992). New plant binary vector with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mo. Biol* **20**, 1195-1197.
- Beh, C. T., Cool, L., Phillips, J. Rine, J.** (2001). Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologs. *Genetics* **157**, 1117-1140.
- Benfey, P. N., Ren, L. Chua, N. H.** (1990). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *Embo J* **9**, 1677-84.
- Bernier, G.** (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**, 175-219.
- Blackwood, E. M. und Eisenman, R. N.** (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211-1217.
- Blanc, G., Barakat, A., Guyot, R., Cooke, R. Delseny, M.** (2000). Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome. *Plant Cell* **12**, 1093-101.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. Benning, C.** (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *Embo J* **17**, 170-80.
- Bouche, N. und Bouchez, D.** (2001). Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 111-7.
- Bowman, J.** (1997). ARABIDOPSIS An Atlas of Morphology and Development. *Springer Verlag, Berlin*.
- Bowman, J. L.** (2000). The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 17-22.
- Bowman, J. L., Eshed, Y. Baum, S. F.** (2002). Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. *Trends Genet* **18**, 134-41.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. Meyerowitz, E. M.** (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**, 37-52.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. Meyerowitz, E. M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development* **112**, 1-20.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-9.

- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M. Simon, R.** (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 565-75.
- Brutnell, T. P.** (2002). Transposon tagging in maize. *Funct Integr Genomics* **2**, 4-12.
- Brutnell, T. P. und Dellaporta, S. L.** (1994). Somatic inactivation and reactivation of Ac associated with changes in cytosine methylation and transposase expression. *Genetics* **138**, 213-25.
- Budziszewski, G. J., Lewis, S. P., Glover, L. W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L. S., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q. et al.** (2001). Arabidopsis Genes Essential for Seedling Viability. Isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**, 1765-78.
- Buttner, M. und Singh, K. B.** (1997). Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5961-6.
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A. Martienssen, R. A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* **408**, 967-71.
- Byrne, M. E., Simorowski, J. Martienssen, R. A.** (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* **129**, 1957-65.
- C. elegans Sequencing Consortium.** (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.
- Cardon, G. H., Frey, M., Saedler, H. Gierl, A.** (1993a). Definition and characterization of an artificial En/Spm-based transposon tagging system in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **23**, 157-78.
- Cardon, G. H., Frey, M., Saedler, H. Gierl, A.** (1993b). Mobility of the maize transposable element En/Spm in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **3**, 773-84.
- Chan, R. L., Gago, G. M., Palena, C. M. Gonzalez, D. H.** (1998). Homeoboxes in plant development. *Biochim Biophys Acta* **1442**, 1-19.
- Chuck, G., Lincoln, C. Hake, S.** (1996). KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 1277-89.
- Chuck, G., Meeley, R. B. Hake, S.** (1998). The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes Dev* **12**, 1145-54.
- Chung, J. H., Whiteley, M. Felsenfeld, G.** (1993). A 5' element of the chicken  $\beta$ -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila. *Cell* **74**, 505-514.
- Chuzhanova, N. A., Krawczak, M., Nemytikova, L. A., Gusev, V. D. Cooper, D. N.** (2000). Promoter shuffling has occurred during the evolution of the vertebrate growth hormone gene. *Gene* **254**, 9-18.
- Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. Meyerowitz, E. M.** (1996). The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* **122**, 1567-75.
- Clark, S. E., Running, M. P. Meyerowitz, E. M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* **119**, 397-418.
- Clark, S. E., Running, M. P. Meyerowitz, E. M.** (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development* **121**, 2057-2067.
- Clark, S. E., Williams, R. W. Meyerowitz, E. M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**, 575-85.
- Coen, E. S. und Meyerowitz, E. M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-7.

- Coen, E. S., Romero, J. M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. Carpenter, R.** (1990). *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell* **63**, 1311-22.
- Conway, L. J. und Poethig, R. S.** (1997). Mutations of *Arabidopsis thaliana* that transform leaves into cotyledons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10209-14.
- Corpet, F., Servant, F., Gouzy, J. Kahn, D.** (2000). ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. *Nucleic Acids Res* **28**, 267-9.
- De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. Depicker, A.** (1999). The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* **20**, 295-304.
- Dermen, H.** (1953). Periclinal chimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach. *Am J Bot* **40**, 154-168.
- Doebley, J. und Lukens, L.** (1998). Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* **10**, 1075-82.
- Dooner, H. K. und Belachew, A.** (1989). Transposition pattern of the maize element Ac from the bz-m2(Ac) allele. *Genetics* **122**, 447-457.
- Dorfler, P. und Busslinger, M.** (1996). C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8. *Embo J* **15**, 1971-82.
- Drews, G. N., Lee, D. Christensen, C. A.** (1998). Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell* **10**, 5-17.
- Dubois, P., Cutler, S. Belzile, F. J.** (1998). Regional insertional mutagenesis on chromosome III of *Arabidopsis thaliana* using the maize Ac element. *Plant J* **13**, 141-51.
- Eckardt, N. A., Araki, T., Benning, C., Cubas, P., Goodrich, J., Jacobsen, S. E., Masson, P., Nambara, E., Simon, R., Somerville, S. et al.** (2001). *Arabidopsis* research 2001. *Plant Cell* **13**, 1973-82.
- Ecker, J. R.** (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**, 667-675.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. Laux, T.** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**, 967-79.
- Epps, J. L. und Tanda, S.** (1998). The *Drosophila* *semushi* mutation blocks nuclear import of bicoid during embryogenesis. *Curr Biol* **8**, 1277-80.
- Errede, B., Company, M. Hutchison, C. A., 3rd.** (1987). Ty1 sequence with enhancer and mating-type-dependent regulatory activities. *Mol Cell Biol* **7**, 258-65.
- Eshed, Y., Baum, S. F. Bowman, J. L.** (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**, 199-209.
- Fang, R. X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S. Chua, N. H.** (1989). Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* **1**, 141-50.
- Felsenstein, J.** (1986). Distance methods: a reply to Farris. *Cladistics* **2**, 130-144.
- Fields, S. und Song, O.** (1989). Novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fink, W. L.** (1986). Microcomputers and phylogenetic analysis. *Science* **234**, 1135-1139.
- Firek, S., Martin, D. J., Roberts, M. R., Sturgess, F., Scott, R. Draper, J.** (1996). Gametophyte-specific transposition of the maize *DS* element in transgenic tobacco. *Plant J* **10**, 569-578.

- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-4.
- Frey, M., Reinecke, J., Grant, S., Saedler, H. Gierl, A.** (1990). Excision of the En/Spm transposable element of Zea mays requires two element-encoded proteins. *Embo J* **9**, 4037-44.
- Frey, M., Tavantzis, S. M. Saedler, H.** (1989). The maize En-1/Spm element transposes in potato. *Mol Gen Genet* **217**, 172-7.
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. Ohme-Takagi, M.** (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.
- Gale, M. D. und Devos, K. M.** (1998). Plant comparative genetics after 10 years. *Science* **282**, 656-9.
- Gallois, J. L., Woodward, C., Reddy, G. V. Sablowski, R.** (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development* **129**, 3207-17.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. Palme, K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**, 2226–2230.
- Garfinkel, D. J., Mastrangelo, M. F., Sanders, N. J., Shafer, B. K. Strathern, J. N.** (1988). Transposon tagging using Ty elements in yeast. *Genetics* **120**, 95-108.
- Gerber, H. P., Seipel, K., Georgiev, O., Hofferer, M., Hug, M., Rusconi, S. Schaffner, W.** (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**, 808-11.
- Geyer, P. K.** (1997). The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 242–248.
- Gilliland, L. U., McKinney, E. C., Asmussen, M. A. Meagher, R. B.** (1998). Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual Arabidopsis actin genes. *Genetics* **149**, 717-725.
- Gisel, A., Barella, S., Hempel, F. D. Zambryski, P. C.** (1999). Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in Arabidopsis thaliana apices. *Development* **126**, 1879-89.
- Goto, K. und Meyerowitz, E. M.** (1994). Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev* **8**, 1548-60.
- Graber, J. H., Cantor, C. R., Mohr, S. C. Smith, T. F.** (1999). In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14055-60.
- Greco, R., Ouwerkerk, P. B., Sallaud, C., Kohli, A., Colombo, L., Puigdomenech, P., Guiderdoni, E., Christou, P., Hoge, J. H. Pereira, A.** (2001). Transposon insertional mutagenesis in rice. *Plant Physiol* **125**, 1175-7.
- Green, P. B., Steele, C. S. Rennich, S. C.** (1996). Phyllotactic patterns: A biophysical mechanism for their origin. *Ann Bot (Lond)* **77**, 515–527.
- Hake, S. und Jackson, D.** (1995). Genetic and molecular analysis of patterning in plant development. *ASGSB Bull* **8**, 29-37.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M. Sarai, A.** (1998). Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem* **273**, 26857-61.
- Hayashi, H., Czaja, I., Lubenow, H., Schell, J. Walden, R.** (1992). Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro. *Science* **258**, 1350-3.

- Helliwell, C. A., Chin-Atkins, A. N., Wilson, I. W., Chapple, R., Dennis, E. S. Chaudhury, A.** (2001). The Arabidopsis AMP1 gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* **13**, 2115-25.
- Hicks, G. R., Smith, H. M. S., Shieh, M. Raikhel, N. V.** (1995). Three classes of nuclear import signals bind to plant nuclei. *Plant Physiol* **107**, 1055-1058.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. Sussman, M. R.** (1998). A role for AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
- Holmes, D. S. und Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-7.
- Honma, T. und Goto, K.** (2000). The Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA is regulated by discrete cis-elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* **127**, 2021-30.
- Hoshino, A., Johzuka-Hisatomi, Y. Iida, S.** (2001). Gene duplication and mobile genetic elements in the morning glories. *Gene* **265**, 1-10.
- Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y. Ma, H.** (1996). DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell* **8**, 81-94.
- Ito, H., Hamabata, T. Hori, S. H.** (1993). Transcriptional activation of the Drosophila melanogaster glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by insertion of defective P elements. *Mol Gen Genet* **241**, 637-46.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C. et al.** (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* **43**, 467-78.
- Jack, T., Brockman, L. L. Meyerowitz, E. M.** (1992). The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**, 683-97.
- Jackson, D., Culianez-Macia, F., Prescott, A. G., Roberts, K. Martin, C.** (1991). Expression patterns of myb genes from Antirrhinum flowers. *Plant Cell* **3**, 115-25.
- Jackson, D. und Hake, S.** (1999). Control of phyllotaxy in maize by the abphyll1 gene. *Development* **126**, 315-23.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**, 3901-3907.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E. Clark, S. E.** (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-34.
- Jofuku, K. D., den Boer, B. G., Van Montagu, M. Okamoto, J. K.** (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* **6**, 1211-25.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. McPherson, J.** (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequence creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302.
- Kayes, J. M. und Clark, S. E.** (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* **125**, 3843-51.
- Kerstetter, R. A. und Hake, S.** (1997). Shoot Meristem Formation in Vegetative Development. *Plant Cell* **9**, 1001-1010.
- Kim, J. Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-Jagani, Z. Jackson, D.** (2002). Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4103-8.

- Kim, M., Canio, W., Kessler, S. Sinha, N.** (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* **293**, 287-9.
- Klinakis, A. G., Zagoraiou, L., Vassilatis, D. K. Savakis, C.** (2000). Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the Drosophila mobile element Minos. *EMBO Rep* **1**, 416-21.
- Kloeckener-Gruissem, B. und Freeling, M.** (1995). Transposon-induced promoter scrambling: a mechanism for the evolution of new alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1836-40.
- Klucher, K. M., Chow, H., Reiser, L. Fischer, R. L.** (1996). The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* **8**, 137-53.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J. van der Veen, J. H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* **229**, 57-66.
- Krizek, B. A. und Meyerowitz, E. M.** (1996). The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**, 11-22.
- Krysan, P. J., Young, J. C., Tax, F. Sussman, M. R.** (1996). Identification of transferred DNA insertions within Arabidopsis genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8145-50.
- Ku, H. M., Vision, T., Liu, J. Tanksley, S. D.** (2000). Comparing sequenced segments of the tomato and Arabidopsis genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9121-6.
- Kumaran, M. K., Bowman, J. L. Sundaresan, V.** (2002). YABBY Polarity Genes Mediate the Repression of KNOX Homeobox Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2761-70.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. Citovsky, V.** (2001). Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1871-6.
- Kyndt, F., Probst, V., Potet, F., Demolombe, S., Chevallier, J. C., Baro, I., Moisan, J. P., Boisseau, P., Schott, J. J., Escande, D. et al.** (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* **104**, 3081-6.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K. Traas, J.** (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1375-90.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.
- Lee, H. S. und Chen, Z. J.** (2001). Protein-coding genes are epigenetically regulated in Arabidopsis polyploids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6753-8.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**, 805-14.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. Hake, S.** (1994). A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**, 1859-76.
- Liu, L., White, M. J. MacRae, T. H.** (1999). Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem* **262**, 247-57.
- Lloyd, A. M., Schena, M., Walbot, V. Davis, R. W.** (1994). Epidermal cell fate determination in Arabidopsis: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**, 436-9.

- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Percy, F., Simon, R., Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J. und Barton, M. K.** (2000). Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. *Dev Biol* **218**, 341-53.
- Long, J. A. und Barton, M. K.** (1998). The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development* **125**, 3027-35.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I., Barton, M. K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-9.
- Long, M.** (2001). Evolution of novel genes. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 673-680.
- Lyndon, R. F. und Cunninghame, M. E.** (1986). Control of shoot apical development via cell division. *Symp Soc Exp Biol* **40**, 233-55.
- Machida, C., Onouchi, H., Koizumi, J., Hamada, S., Semiarti, E., Torikai, S., Machida, Y.** (1997). Characterization of the transposition pattern of the Ac element in Arabidopsis thaliana using endonuclease I-SceI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8675-8680.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L., Pereira, A.** (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 1544-56.
- Martin, A., Prescott, A., Lister, C., MacKay, S.** (1989). Activity of the Tam3 in Antirrhinum and tobacco: A possible role of DNA methylation. *Embo J* **8**, 997-1004.
- Martin, C. und Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* **13**, 67-73.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-15.
- McConnell, J. R. und Barton, M. K.** (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**, 2935-42.
- McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., Barton, M. K.** (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**, 709-13.
- Meissner, R. C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H. D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A. et al.** (1999). Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* **11**, 1827-40.
- Mezitt, L. A. und Lucas, W. J.** (1996). Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol Biol* **32**, 251-73.
- Miklos, G. L. und Rubin, G. M.** (1996). The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* **86**, 521-529.
- Mitchell, P. J. und Tjian, R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-8.
- Mordhorst, A. P., Voerman, K. J., Hartog, M. V., Meijer, E. A., van Went, J., Koornneef, M., de Vries, S. C.** (1998). Somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* **149**, 549-63.
- Moreno, M., Chen, J., Grennblatt, I., Dellaporta, S. L.** (1993). Reconstitutive mutagenesis of the maize P gene by short range Ac transpositions. *Genetics* **131**, 93- 956.
- Müller, J.** (2000). Transcriptional control: The benefits of selective insulation. *Curr Biol* **10**, R241-R244.

- Nacry, P., Camilleri, C., Courtial, B., Caboche, M. Bouchez, D.** (1998). Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in Arabidopsis. *Genetics* **149**, 641-50.
- Nole-Wilson, S. und Krizek, B. A.** (2000). DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res* **28**, 4076-82.
- Nowak, M. A., Boerlijst, M. C., Cooke, J. Smith, J. M.** (1997). Evolution of genetic redundancy. *Nature* **388**, 167-71.
- Odell, J. T., Nagy, F. Chua, N. H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-2.
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O. Bowles, D. J.** (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**, 1914-1917.
- Ohme-Takagi, M. und Shinshi, H.** (1990). Structure and expression of a tobacco  $\beta$ -1,3-glucanase gene. *Plant Mol Biol* **15**, 941-946.
- Ohme-Takagi, M. und Shinshi, H.** (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- O'Keefe, D. P., Tepperman, J. M., Dean, C., Leto, K. J., Erbes, D. L. Odell, J. T.** (1994). Plant expression of a bacterial cytochrome P450 that catalyses activation of a sulfonylurea pro-herbicide. *Plant Physiol* **105**, 473-482.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L. Hake, S.** (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* **127**, 5523-32.
- Osborne, B. I., Corr, C. A., Prince, J. P., Hehl, R., Tanksley, S. D., McCormick, S. Baker, B.** (1991). Ac transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics* **129**, 833-44.
- Pandya, K. und Townes, T. M.** (2002). Basic residues within the Kruppel zinc finger DNA binding domains are the critical nuclear localization determinants of EKLF/KLF-1. *J Biol Chem* **277**, 16304-12.
- Parinov, S. und Sundaresan, V.** (2000). Functional genomics in Arabidopsis: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 157-61.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E. Yanofsky, M. F.** (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-3.
- Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F. et al.** (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**, 256-61.
- Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Metraux, J. P. Broekaert, W. F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Perbal, M. C., Haughn, G., Seadler, H. Schwarz-Sommer, Z.** (1996). Non-cell-autonomous function of the Antirrhinum floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* **122**, 3433-3441.
- Petrov, D. A.** (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet* **17**, 23-28.
- Poethig, R. S.** (1987). Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. *Am J Bot* **74**, 581-594.
- Ponting, C. P. und Aravind, L.** (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 130-132.

- Rao, S., Matsumura, A., Yoon, J. Simon, M. C.** (1999). SPI-B activates transcription via a unique proline, serine, and threonine domain and exhibits DNA binding affinity differences from PU.1. *J Biol Chem* **274**, 11115-24.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-71.
- Reeves, P. H., Murtas, G., Dash, S. Coupland, G.** (2002). early in short days 4, a mutation in Arabidopsis that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor FLC. *Development* **129**, 5349-61.
- Reinert, J., und Bajaj, Y. P. S.** (1977). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. *New York* (Springer Verlag).
- Reinhardt, D., Mandel, T. Kuhlemeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-18.
- Remacle, J. E., Albrecht, G., Brys, R., Braus, G. H. Huylebroeck, D.** (1997). Three classes of mammalian transcription activation domain stimulate transcription in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **16**, 5722-9.
- Richards, F. J.** (1951). Phyllotaxis: Its quantitative expression and relation to growth in the apex. *Philos Trans R Soc Lond Series B*:**235**, 509-564.
- Riechmann, J. L., Krizek, B. A. Meyerowitz, E. M.** (1996). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4793-8.
- Riechmann, J. L. und Meyerowitz, E. M.** (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* **379**, 633-46.
- Rinne, P. L. und van der Schoot, C.** (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* **125**, 1477-85.
- Roelants, F., Potier, S., Souciet, J. L. de Montigny, J.** (1997). Delta sequence of Ty1 transposon can initiate transcription of the distal part of the URA2 gene complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **148**, 69-74.
- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V. Fletcher, J. C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969-77.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. et al.** (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-57.
- Rupp, H. M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. Schmulling, T.** (1999). Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* **18**, 557-63.
- Satina, S., Blakeslee, A. F. Avery, A. G.** (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am J Bot* **27**, 895-905.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I. A. Coupland, G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-29.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., Weisbeek, P. (). . .** (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* **120**, 2475-2487.
- Schneitz, K., Hülskamp, M. Pruitt, R. E.** (1995). Wild-type ovule development in Arabidopsis thaliana: A light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* **7**, 731-749.

- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G. Laux, T.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**, 635-44.
- Schwarz-Sommer, Z. S., Gierl, A., Berntgen, R. Saedler, H.** (1985). Sequence comparison of states of al-ml. *Embo J* **4**, 2439-2443.
- Searles, L. L., Jokerst, R. S., Bingham, P. M., Voelker, R. A. Greenleaf, A. L.** (1982). Molecular cloning of sequences from a Drosophila RNA polymerase II locus by P element transposon tagging. *Cell* **31**, 585-92.
- Seki, M., Ito, T., Shibata, D. Shinozaki, K.** (1999). Regional insertional mutagenesis of specific genes on the CIC5F11/CIC2B9 locus of Arabidopsis thaliana chromosome 5 using the Ac/Ds transposon in combination with the cDNA scanning method. *Plant Cell Physiol* **40**, 624-39.
- Selker, J. M., Steucek, G. L. Green, P. B.** (1992). Biophysical mechanisms for morphogenetic progressions at the shoot apex. *Dev Biol* **153**, 29-43.
- 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**, 1771-83.
- Serikawa, K. A., Martinez-Laborda, A. Zambryski, P.** (1996). Three knotted1-like homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **32**, 673-83.
- Sessa, G., Morelli, G. Ruberti, I.** (1993). The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *Embo J* **12**, 3507-17.
- Sessions, A.** (1999). Piecing together the Arabidopsis gynoeceum. *Trends Plant Sci* **4**, 296-297.
- Sessions, A., Yanofsky, M. F. Weigel, D.** (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* **289**, 779-82.
- Shuai, B., Reynaga-Pena, C. G. Springer, P. S.** (2002). The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol* **129**, 747-61.
- Sieburth, L. E. und Meyerowitz, E. M.** (1997). Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-65.
- Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N. Bowman, J. L.** (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development* **126**, 4117-28.
- Sinnett, D., Richer, C. Baccichet, A.** (1998). Isolation of stable bacterial artificial chromosome DNA using a modified alkaline lysis method. *Biotechniques* **24**, 752-4.
- Smith, D., Yanai, Y., Liu, Y. G., Ishiguro, S., Okada, K., Shibata, D., Whittier, R. F. Fedoroff, N. V.** (1996). Characterization and mapping of Ds-GUS-T-DNA lines for targeted insertional mutagenesis. *Plant J* **10**, 721-32.
- Snow, M. und Snow, R.** (1931). Experiments on Phyllotaxis. *Philos Trans R Soc Lond Series B* **221**, 1-43.
- Snow, M. und Snow, R.** (1933). Experiments on phyllotaxis. II. The effect of displacing a primordium. *Philos Trans R Soc Lond Series B* **222**, 354-400.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. Ecker, J. R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* **12**, 3703-14.
- Starich, T., Cordes, P. Zissler, J.** (1985). Transposon tagging to detect a latent virus in Myxococcus xanthus. *Science* **230**, 541-3.

- Stark, M. R. und Johnson, A. D.** (1994). Interaction between two homeodomain proteins is specified by a short C-terminal tail. *Nature* **371**, 429-32.
- Steeves, T. A. und Sussex, I. M.** (1989). Patterns in Plant Development. *Cambridge University Press*.
- Sudbeck, P. und Scherer, G.** (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* **272**, 27848-52.
- Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S. et al.** (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of Mesorhizobium loti strain R7A. *J Bacteriol* **184**, 3086-95.
- Sussex, I. M.** (1989). Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**, 225-9.
- Suzuki, Y., Uemura, S., Saito, Y., Murofushi, N., Schmitz, G., Theres, K. Yamaguchi, I.** (2001). A novel transposon tagging element for obtaining gain-of-function mutants based on a self-stabilizing Ac derivative. *Plant Mol Biol* **45**, 123-31.
- Talbert, P. B., Adler, H. T., Parks, D. W. Comai, L.** (1995). The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of Arabidopsis thaliana. *Development* **121**, 2723-35.
- Telfer, A., Bollman, K. M. Poethig, R. S.** (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in Arabidopsis thaliana. *Development* **124**, 645-54.
- Thatcher, J. W., Shaw, J. M. Dickinson, W. J.** (1998). Marginal fitness contributions of nonessential genes in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 253-257.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**, 796-815.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80.
- Tilney-Bassett, R. A. E.** (1986). Plant Chimeras. *London: E Arnold*.
- Tissier, A. F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M. A., Murphy, G. Jones, J. D.** (1999). Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**, 1841-52.
- Toba, G., Ohsako, T., Miyata, N., Ohtsuka, T., Seong, K. H. Aigaki, T.** (1999). The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in Drosophila melanogaster. *Genetics* **151**, 725-37.
- Trieu, A. T., Burleigh, S. H., Kardailsky, I. V., Maldonado-Mendoza, I. E., Versaw, W. K., Blaylock, L. A., Shin, H., Chiou, T. J., Katagi, H., Dewbre, G. R. et al.** (2000). Transformation of Medicago truncatula via infiltration of seedlings or flowering plants with Agrobacterium. *Plant J* **22**, 531-41.
- Trotochaud, A. E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. Clark, S. E.** (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-406.
- Trotochaud, A. E., Jeong, S. Clark, S. E.** (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* **289**, 613-7.
- Überlacker, B. und Werr, W.** (1996). Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Mol Breeding* **2**, 293-295.

- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A. D., Hooykaas, P. J. Keller, B.** (2000). Activation tagging of the LEAFY PETIOLE gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 4971-80.
- Varagona, M. J. und Raikhel, N. V.** (1994). The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J* **5**, 207-14.
- Wagner, A.** (2001). Birth and death of duplicated genes in completely sequenced eukaryotes. *Trends Genet* **17**, 237-9.
- Waites, R. und Hudson, A.** (1995). PHANTASTICA: A gene required for dorsoventrality in leaves of *Antirrhinum majus*. *Development* **121**, 2143-2154.
- Waites, R., Selvadurai, H. R., Oliver, I. R. Hudson, A.** (1998). The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**, 779-89.
- Wang, Z. Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M. S. Tobin, E. M.** (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* Lhcb gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Wang, Z. Y. und Tobin, E. M.** (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-17.
- Weigel, D.** (1995). The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *Plant Cell* **7**, 388-9.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M. et al.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**, 1003-13.
- Weigel, D. und Meyerowitz, E. M.** (1993). Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Science* **261**, 1723-1726.
- Weigel, D. und Meyerowitz, E. M.** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**, 203-209.
- White, J., Chang, S. Y. Bibb, M. J.** (1990). A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **18**, 1062.
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J. Coupland, G.** (1996). A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2. *Plant Cell* **8**, 659-71.
- Winkler, R. G., Frank, M. R., Galbraith, D. W., Feyereisen, R. Feldmann, K. A.** (1998). Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of *Arabidopsis*. Isolation of mutations in the cytochrome P450 gene superfamily. *Plant Physiol* **118**, 743-750.
- Zhou, J., Tang, X. Martin, G. B.** (1997). The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *Embo J* **16**, 3207-3218.



3' terminale Sequenz des *dTAM* Elements unter Angabe der Positionen benutzter Restriktionsschnittstellen und Primer für iPCR Experimente (vgl. Abb.1):

5' *dTAM/ Enhancertetramer/ BaR* ← CTGCAGCGGCAGATGGATCACAGGTACAATCCTCTACT  
 AAACATCATTTGTCTGATAATCATTGGTTGCTTGCTCTCTGTCTTTCTACATGTTTGCTTGTA  
 CATGATCTATTTTAAACTTTTGTCAATTCGCATGATCTATAGTTACTTTTATTGTTGATCACCG  
 TAACTTCTTAATCATAAACAAGAGTGTGTCTTCTGTTTCAGGGTTCTGCAACTTCTGTCCAAG  
 ACCAATTGATGCCATTGGGTGTGATAGGAGGGCAAATGATGCCGTGGGCACCTCGCCAGCCAG  
 GCATTTGGCCACCGATGCAAACACAGATGCCACCGCCGATGCCGTGGGGATTTCTCTCCTCGTG  
*EcoR V*  
 GGCAGTCACAATCACCAGGATTGCCCTCACACTCACCAGGATCAGTACGTTAAGTTGATATCC  
 TTTGCATCTCTATTTGCTTCGTTGTTAAGCAGTACTAGAAAACATGCATGTATATGTTGCA  
 GTCTATGTATATGTTAATTAGTTACTCGGTAAACTAACAAATGTTTGTTCCTTTTAAAGGGT  
*Sau3A I*  
 TCAGGCTCACATCATGCTAGTCCGCCTCCGGATCAGAGCACGTTTATGGACTTATTGATGAAC  
← TK\_EN8 *Asn I*  
 ACAAGTGGCGGCGGCTCCAATGACCCACCAACAGAATGAATTAATATGGAGGCTTGTGTGGAA  
← TK\_EN9  
 CTTACTATGATTGCGTTTTGTATGGACTTTAACTTGTTTTAGATGGATTTGAACTTCTTTTCGT  
 ATGGACTTGAAC TTGTATGAATATTGAATATGGTGCTTGTGTTATGTTATGTTGAATATGGTG  
 CTTGTGTTGTGATATATTGAATGTTGTGCTTATATTGTGCTGTTATGGAGGCTTCCCATCCGG  
 GGAGGGAGAAAAATAAAATTGGATATTAATAAAAAAATTATTCACTAAGAGTGTGCGCCCCACA  
*Rsa I*  
 CTCTTATATGCGCCCAGGTAGCTTACTGATGTGCGCGCAGTAAGAGTGACGGCCACGGTACTG  
← RS\_EN5  
 GCCGACACTTTTAAACATAAGAGTGTCGGTTGCTTGTTGAACCGACACTTTTAAACATAAGAGCG  
 TCGGTCCCCACACTTCTATACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGACGGCTAAGAGTGTGCGG  
TK\_EN4 → RS\_EN4 → TK\_EN5 →  
 TCAACCGACACTCTTATACTTAGAGTGTCGGCTTATTTAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGGCCG  
 ACACTCCTTACCTTTTTTCTTGTAGTGTATTATCGAT

---

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN:

Name, Vorname	Kirch, Thomas
Geburtsdatum	14.03.1968
Geburtsort	Simmerath
Eltern	Leonhard und Anna Kirch geb. Buchholz

## SCHULAU SBILDUNG:

1974 - 1978	katholische Grundschule Dreiborn
1978 - 1984	städtisches Gymnasium Schleiden
1984 - 1987	bischöfliches Clara-Fey Gymnasium Schleiden Abschluss Abitur

## GRUNDWEHRDIENST:

01.10.1987 - 31.12.1988

## HOCHSCHULSTUDIUM:

01.04.1989 - 17.04.1997	Biologie, Diplom Johannes-Gutenberg Universität Mainz Abschlussarbeit: Untersuchung zur Struktur und Funktion der <i>ZmHox</i> ( <i>Zea mays Homöobox</i> ) Gene angefertigt am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln, Abteilung Prof. Werr
-------------------------	--

seit 17.04.1997	Biologie, Promotion Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln, Abteilung Prof. Werr
-----------------	---

## **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 noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der gültigen Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Wolfgang Werr betreut worden.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Dr. W. Werr angefertigt.

Prof. Dr. W. Werr danke ich für seine Betreuung, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, Prof. Dr. R. Simon für all seine Anregungen und Ratschläge, und die Erstellung des Zweit-Gutachtens.

Desweiteren möchte ich folgenden Personen danken:

Dr. A. Schneider für ihre Mitarbeit an der TAMARA Population.

Den Kollegiaten des Graduiertenkollegs 'Molekulare Analysen von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen'.

Den Gärtnern und Gärtnerinnen für ihre liebevolle Pflege der Pflanzen.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Entwicklungsbiologie für die von ihnen geschaffene einzigartige Atmosphäre.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Simon und Werr - besonders Melanie Cole, Petra Comelli und Heike Markel - danke ich für die schöne Zeit.

Für ihre unendliche Geduld gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, Geschwistern und Silke.