

**Isolation und Analyse der Mutation *thick tassel dwarf1* aus *Zea mays***

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

vorgelegt von  
**Peter Bommert**  
aus Leverkusen

Köln 2003

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Werr  
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 2004

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Werr durchgeführt. Ihm möchte ich besonders für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken.

Martin Hobe sei gedankt für seine ständige Diskussionsbereitschaft, Kollegialität und ganz besonders für seine in den letzten Wochen großartige Hilfsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Richard Waites, der mir zu Beginn des Projektes mit viel fachlicher Kompetenz zur Seite stand.

Heike Markel sei gedankt für die vielen nützlichen Tipps rund ums Schreiben.

Melanie Cole, Margit Grünewald, Petra Comelli und Iris Riedl danke ich herzlich für ihre uneigennützig Unterstützung bei vielfältigen größeren und kleineren Arbeiten.

Oliver Clarenz, meinem Mann im MPI, sei gedankt für die vielen *paper* und Kost und Logis bei meinen Besuchen am MPI.

Danken möchte ich auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Martin Hülskamp danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u><a href="#">EINLEITUNG</a></u></b>	<b>1</b>
1.1	<u><a href="#">Über den Aufbau und die Funktion des sprossapikalen Meristems</a></u>	1
1.2	<u><a href="#">Meristemspezifische Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i></a></u>	2
1.3	<u><a href="#">Ein negativer Rückkopplungsmechanismus kontrolliert die Größe der Stammzellpopulation</a></u>	4
1.4	<u><a href="#">Meristemspezifische Gene in <i>Zea mays</i></a></u>	7
1.5	<u><a href="#">Die Blütenentwicklung von <i>Zea mays</i></a></u>	9
1.6	<u><a href="#">Zielsetzung dieser Arbeit</a></u>	11
<b>2</b>	<b><u><a href="#">MATERIAL UND METHODEN</a></u></b>	<b>12</b>
2.1	<u><a href="#">Materialien</a></u>	12
2.1.1	<u><a href="#">Chemikalien</a></u>	12
2.1.2	<u><a href="#">Puffer, Lösungen und Medien</a></u>	12
2.1.3	<u><a href="#">Bakterienstämme</a></u>	12
2.1.4	<u><a href="#">Vektoren</a></u>	13
2.1.5	<u><a href="#">Oligonukleotide</a></u>	13
2.2	<u><a href="#">Methoden</a></u>	15
2.2.1	<u><a href="#">Molekularbiologische Standardmethoden</a></u>	15
2.2.2	<u><a href="#">Transformation kompetenter Bakterien (<i>E. coli</i>)</a></u>	15
2.2.3	<u><a href="#">Präparation von Plasmid-DNA</a></u>	16
2.2.4	<u><a href="#">Sichtung von genomischer Phagenbanken</a></u>	16
2.2.5	<u><a href="#">Isolierung von genomischer DNA aus Mais</a></u>	16
2.2.6	<u><a href="#">Restriktion, Elektrophorese und Membrantransfer von genomischer DNA</a></u>	16
2.2.7	<u><a href="#">Radioaktive Markierung von DNA-Sonden</a></u>	17
2.2.8	<u><a href="#">Hybridisierung von Membran-gebundener DNA</a></u>	17
2.2.9	<u><a href="#">Polymerase Ketten Reaktion (PCR)</a></u>	18
2.2.10	<u><a href="#">Real time RT-PCR</a></u>	18
2.2.11	<u><a href="#">Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais</a></u>	19
2.2.12	<u><a href="#">Northern-Analyse</a></u>	19
2.2.13	<u><a href="#">RFLP Kartierung mittels rekombinanter Inzuchtlinien</a></u>	19
2.2.14	<u><a href="#">Nicht-radioaktive RNA <i>in situ</i> Hybridisierung</a></u>	20
2.3	<u><a href="#">Mikroskopische Techniken</a></u>	26
2.3.1	<u><a href="#">Nomarsky-Mikroskopie</a></u>	27

2.3.2	<a href="#">Rasterelektronen Mikroskopie</a>	27
2.4	<a href="#">Computeranalysen</a>	27
<b>3</b>	<b><a href="#">ERGEBNISSE</a></b>	<b>28</b>
3.1	<a href="#">Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>CLAVATA1</i>-ähnlichen Genen</a>	28
3.2	<a href="#">Isolierung von <i>CLAVATA1</i>-ähnlichen Sequenzen</a>	30
3.3	<a href="#">Phylogenetische Analyse der isolierten Kinase Sequenzen</a>	32
3.4	<a href="#">Die Isolierung der vollständigen <i>Kin5</i> DNA-Sequenz</a>	34
3.4.1	<a href="#">Sichtung einer cDNA Bank mittels PCR</a>	34
3.4.2	<a href="#">Sichtung einer genomischen Phagenbank</a>	35
3.5	<a href="#">Expressionsanalysen von <i>Kin5</i></a>	42
3.5.1	<a href="#">Northern-Analyse</a>	42
3.5.2	<a href="#">Real time RT-PCR</a>	43
3.5.3	<a href="#">Kin5 zeigt ein spezifisches Expressionsmuster innerhalb der Blütenstände</a>	45
3.6	<a href="#">Kin5 kartiert auf Chromosom 5s in unmittelbarer Nähe zur Mutation <i>td1</i></a>	49
3.7	<a href="#">Die <i>td1</i>-„stock-center“ Allele tragen identische Mutationen</a>	51
3.8	<a href="#">Identifizierung von <i>Mutator</i> induzierten <i>Kin5</i> Mutationen</a>	54
3.9	<a href="#">Expressionsanalysen im <i>td1-glf</i> Hintergrund</a>	57
3.10	<a href="#">Der <i>td1</i> Phänotyp zeichnet sich durch die Bildung vergrößerter Meristeme aus</a>	58
<b>4</b>	<b><a href="#">DISKUSSION</a></b>	<b>62</b>
4.1	<a href="#">Die Analyse der isolierten unterschiedlichen <i>td1</i> Allele zeigt, dass <i>td1</i> und <i>Kin5</i> einen identischen Locus repräsentieren</a>	62
4.2	<a href="#">Der <i>td1</i> Phänotyp ist dem <i>clv</i> Phänotyp ähnlich</a>	64
4.3	<a href="#">Die molekulare Charakterisierung von <i>td1</i> unterstützt die Annahme, dass der CLAVATA-Signaltransduktionsweg konserviert ist</a>	67
4.4	<a href="#">Die Analyse der <i>td1</i> Expression</a>	69
4.5	<a href="#">Abschließende Bemerkungen</a>	74
<b>5</b>	<b><a href="#">ZUSAMMENFASSUNG</a></b>	<b>75</b>

**6**    **LITERATUR** ..... **76**

## Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E.coli	Escherichia coli
h	Stunde
kb	Kilobasenpaar
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
üN	über Nacht
UV	ultraviolette Strahlung

## 1 Einleitung

In der heutigen Biologie stellt die Kontrolle von Stammzellschicksal eine zentrale Fragestellung dar. Pflanzen repräsentieren ein hervorragendes Modellsystem um sich dieser Fragestellung zu nähern, da sie – anders als tierische Modellsysteme – ein Reservoir an Stammzellen über ihren gesamten Lebenszeitraum hinweg aufrechterhalten. Pflanzliche Stammzellen sind wie tierische Stammzellen selbsterhaltend. Sie liegen innerhalb der embryonal angelegten apikalen Meristeme. Die Stammzellen des sprossapikalen Meristems sind Vorläufer der Zellen, die letztendlich Stamm, Blätter, Seitentriebe und Blüten bilden. Die Stammzellen des apikalen Wurzelmeristems sind die Quelle aller der Zellen, die die Primärwurzel und das laterale Wurzelsystem bilden. Einblicke in die Mechanismen, die der Etablierung und Aufrechterhaltung von Stammzellen innerhalb der apikalen Meristeme zugrunde liegen, können somit als grundlegend für den Erwerb weiteren Verständnisses unterschiedlicher Aspekte der Pflanzenentwicklung angesehen werden.

### 1.1 Über den Aufbau und die Funktion des sprossapikalen Meristems

Das sprossapikale Meristem kann in Bezug auf seine anatomischen und funktionalen Eigenschaften in Schichten und Zonen unterteilt werden. Es wird zwischen den drei Schichten L1, L2 und L3 unterschieden (Schmidt, 1924). Die Unterteilung der Schichten spiegelt sich auch in der Tunica Corpus Organisation wieder (Kerstetter und Hake, 1997). Die L1 und L2 Schicht bilden die Tunica und können durch fast ausschließlich antikline Zellteilungsebenen charakterisiert werden. Der Korpus, der von der Tunika ummantelt wird, ist der L3 Schicht gleichzusetzen. In der L3 Schicht können sowohl antikline als auch perikline Zellteilungsebenen beobachtet werden. In dikotylen Spezies konnte gezeigt werden, dass sowohl L1 als auch L2 Schicht aus einer einzelnen Lage von Zellen bestehen. Diese strikte Korrelation konnte in monokotylen Spezies jedoch noch nicht bewiesen werden. So ist es bisher unklar, ob die L2 Schicht beispielsweise in Mais tatsächlich nur aus einer einzelnen Lage von Zellen besteht.

Durch klonale Analysen mit Hilfe von Chimären ist gezeigt worden, dass aus Zellen der L1 die spätere Epidermis gebildet wird und dass aus Zellen der L2 das subepidermale Mesophyll und die Gameten gebildet werden. Die Zellen der L3 bilden das Grundgewebe und das vaskuläre System (Satina, 1940; Satina und Blakeslee, 1941; Stewart und Burk, 1970; Dermen und Stewart, 1973). Meristeme werden auch in Zonen unterteilt, man unterscheidet zwischen der zentralen Zone und der peripheren Zone, die die zentrale Zone umgibt. Diese Unterteilung reflektiert die beobachteten unterschiedlichen Zellteilungsraten innerhalb des Meristems. In der zentralen Zone des Sproßmeristems finden Zellteilungen seltener statt als in der peripheren Zone (Vaughn, 1952; Steeves und Sussex, 1989).

Die Stammzellen des sprossapikalen Meristems liegen innerhalb der zentralen Zone. Durch die kontinuierliche - aber seltene - Teilung dieser Stammzellen werden Tochterzellen in die periphere Zone verdrängt, in welcher diese Differenzierungsprozesse durchlaufen.

Das Resultat der Zellteilungsaktivitäten und Differenzierungsprozesse innerhalb der peripheren Zone ist letztendlich die Anlage von Organprimordien an den Flanken des Meristems sowie die Abgabe von spross-spezifischen Zellen an unterliegende Schichten. Diese sich kontinuierlich wiederholende Aktivität führt zu dem aus einzelnen Phytomeren bestehenden modularen Aufbau von Pflanzen.

Dabei stellt die Fähigkeit der sprossapikalen Meristeme, das Gleichgewicht zwischen Zellteilung in der zentralen Zone und Zelldifferenzierung in der peripheren Zone aufrecht zu erhalten, eines ihrer charakteristischen Merkmale dar (Weigel & Jürgens, 2002).

## 1.2 Meristemspezifische Gene in *Arabidopsis thaliana*

Die morphologische und genetische Analyse unterschiedlicher meristemspezifischer Mutanten erlaubte erste Einblicke in die Mechanismen, die die Aufrechterhaltung des Stammzellschicksal kontrollieren.

In *shootmeristemless (stm)* Mutanten ist die Etablierung und Aufrechterhaltung des embryonalen sprossapikalen Meristems stark beeinträchtigt (Barton und Poethig, 1993; Long et al., 1996). Die embryonalen apikalen Zellen differenzieren sich und werden in die Bildung fusionierter Kotyledonen integriert, so dass im Keimling kein funktionales sprossapikales Meristem mehr vorhanden ist. In schwachen *stm* Allelen werden im Verlauf der weiteren Entwicklung der Pflanze neue Meristeme gebildet, die jedoch nach der Produktion weniger Organe ihre Aktivität einstellen (Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). Des Weiteren ist gezeigt worden, dass *STM* im Wildtyp die Expression von *ASYMMETRIC LEAVES1 (ASI)*, einem spezifisch in lateralen Organprimordien und Organen exprimierten Gen, reprimiert. In *stm* Mutanten konnte ektopische Expression von *ASI* im Meristem nachgewiesen werden, die ihrerseits in einer verfrühten Termination des Meristems resultiert (Byrne et al., 2000). *STM* codiert für einen *kn1*-verwandten Homöobox-Transkriptionsfaktor, der im gesamten Meristem exprimiert ist (Long et al., 1996). Die Funktion von *STM* liegt in der Etablierung des sprossapikalen Meristems und in der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustandes meristematischer Zellen.

Auch *wuschel (wus)* Mutanten zeigen bereits während der Embryogenese einen Defekt in der Bildung des Sprossmeristems (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). In *wus*-mutanten Keimlingen können zwischen den Kotyledonen anstelle von cytoplasmareichen, meristematischen Zellen stark vakuolisierte Zellen nachgewiesen werden, was auf einen fortgeschrittenen Differenzierungsstatus hinweist. In ihrer weiteren Entwicklung zeigen *wus* Mutanten die fortlaufende Bildung stark reduzierter sekundärer Meristeme, die jeweils nach Bildung eines Blattes ihre Aktivität einstellen. Der Blütenphänotyp *wus*-mutanter Pflanzen zeichnet sich dadurch aus, dass nach der Bildung von jeweils vier Sepalen und Petalen ein einzelnes, zentrales Staubblatt angelegt wird. Demzufolge

scheint *WUS* im Wildtyp die Aktivität von Spross- und Blütenmeristemen zu fördern, indem es möglicherweise die Stammzellpopulation aufrechterhält.

Auch *WUS* kodiert für einen putativen Homöobox-Transkriptionsfaktor, der in den tieferen Schichten der Spross- und Blütenmeristeme exprimiert wird (Mayer et al., 1998).

Mutationen in den *CLAVATA (CLV)* Genen zeigten einen zu *wus* bzw. *stm* Mutanten entgegengesetzten Phänotyp.

In *Arabidopsis* sind drei *CLV* Loci identifiziert worden, *CLV1* (Leyser und Furner, 1992; Clark et al., 1993), *CLV2* (Kayes et al., 1998) und *CLV3* (Clark et al., 1995). Pflanzen, die Mutationen in einem der drei *CLAVATA* Gene tragen, zeichnen sich durch die Bildung vergrößerter Meristeme aus. Daraus konnte geschlossen werden, dass diese Gene im Wildtyp die Akkumulation undifferenzierter Zellen innerhalb des Meristems negativ regulieren.

Schon während der Embryogenese wird die Funktion dieser Gene benötigt, da in *clv1*- und *clv3*-mutanten Embryonen signifikant vergrößerte sprossapikale Meristeme nachgewiesen werden konnten, die sich ihrerseits durch eine vergrößerte Anzahl von Stammzellen auszeichneten (Clark et al., 1993 und 1995). Die Akkumulation von Stammzellen in *clv* Mutanten ist progressiv, so dass nach dem Übergang in die reproduktive Phase ein stark vergrößertes Infloreszenzmeristem entsteht, das mehr Blütenmeristeme anlegt. Auch in Blütenmeristemen zeigt sich die Akkumulation von Stammzellen, was letztendlich in der Produktion von überzähligen Blütenorganen resultiert. In *Arabidopsis* kann im Wildtyp die zahlenmäßig relativ konstante Anlage von vier Sepalen, vier Petalen, sechs Staubblättern und zwei fusionierten Karpellen beobachtet werden (Smyth et al., 1990). Blütenmeristeme starker *clv1* bzw. *clv3* Allele produzieren bis zu acht fusionierte Karpelle, was zur Bildung einer stark vergrößerten, keulenförmigen Frucht führt. Auf dieses phänotypische Charakteristikum ist die Namensgebung der *CLV* Loci zurückzuführen, das Wort „clava“ entstammt dem Lateinischen und bedeutet Keule.

Neben der Bildung zusätzlicher Blütenorgane ist in starken *clv1*- und *clv3* Allelen die massive Überproliferation von Stammzellen innerhalb des Gynöceums beobachtet worden, die förmlich aus dem Gynöceums herauszubrechen schienen.

Genetische Analysen zeigten, dass die drei *CLV* Gene mit *WUS* interagieren, um das Stammzellschicksal während der Meristementwicklung zu kontrollieren.

Die Phänotypen starker *clv1* und *clv3* Allele sind voneinander nahezu nicht zu unterscheiden (Clark et al., 1995). Zudem unterscheiden sich die Phänotypen von *clv1/clv3* Doppelmutanten nicht von starken *clv1* bzw. *clv3* Allelen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Pflanzen, die heterozygot für *clv3* und *clv1* sind, einen starken mutanten Phänotyp aufwiesen, obwohl beide Mutationen für sich genommen nur schwach semidominant bzw. rezessiv sind.

Starke *clv2* Allele hingegen zeigen Phänotypen, die vergleichbar zu schwächeren *clv1* und *clv3* Allelen sind. Die Analyse von Doppelmutanten zeigte, dass sowohl *clv1* als auch *clv3* Allele sich epistatisch zu *clv2* Allelen verhielten (Kayes und Clark, 1998). Darüber hinaus zeigen *clv2* Mutanten weitere phänotypische Ausprägungen in nichtmeristematischen Geweben, so dass spekuliert wurde, dass *CLV2* in weiteren Prozessen involviert ist (Kayes und Clark, 1998).

Doppelmutanten von starken *wus* Allelen in Kombination mit *clv1*, *clv2* oder *clv3* Allelen zeigten konsistent den *wus* Phänotyp, was zeigte, dass *WUS* sich epistatisch zu allen drei CLV Loci verhält (Laux et al., 1996). Darüber hinaus konnte daraus die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese vier Loci in einem gemeinsamen Regulationsmechanismus eingebunden sind, der die Meristemgröße über die Anzahl von Stammzellen kontrolliert.

Durch die Klonierung dieser Gene, sowie durch weiterführende genetische und molekulare Analysen konnte letztendlich dieser Regulationsmechanismus zu großen Teilen aufgeklärt werden.

### 1.3 Ein negativer Rückkopplungsmechanismus kontrolliert die Größe der Stammzellpopulation

Alle drei *CLV* Gene sind mittlerweile kloniert. *CLV1* kodiert für eine Rezeptorkinase mit einer extrazellulären *leucine-rich repeat* (LRR) Domäne und einer intrazellulären Serin-/Threonin-Kinasedomäne (Clark et al., 1997). Außerdem ist gezeigt worden, dass die *CLV1* Kinasedomäne sowohl auto- als auch transphosphorylierend auf Serinreste wirkt (Williams et al., 1997; Stone et al., 1998).

*CLV2* kodiert für ein LRR Rezeptor Protein, welches in seiner extrazellulären Domäne strukturell dem *CLV1* Protein sehr ähnlich ist, neben einer Transmembrandomäne aber nur eine kurze cytoplasmatische Domäne besitzt (Jeong et al., 1999). Die Klonierung des *CLV3* Gens zeigte, dass es für ein 96 Aminosäuren kurzes sekretiertes Polypeptid kodiert (Fletcher et al., 1999; Rojo et al., 2003).

*CLV1* und *CLV3* werden in teilweise überlappenden Domänen des sprossapikalen Meristems exprimiert, wobei das *CLV1* Transkript in einer zentralen Region in tiefer liegenden Schichten der L3 nachzuweisen ist (Clark et al., 1997), während sich die Expression von *CLV3* auf einen engen, die putativen Stammzellen umfassenden Bereich in den äußeren Zelllagen der zentralen Zone beschränkt (Fletcher et al., 1999). Die Expressionsmuster beider Gene sind auch in Blüten- und Achselmeristemen nachgewiesen worden. Der Befund, dass beide Gene in benachbarten Domänen exprimiert werden, führte zur Annahme, dass die über die beiden Expressionsdomänen definierten Meristembereiche über einen *CLV1/CLV3*-Signaltransduktionsweg miteinander kommunizieren.

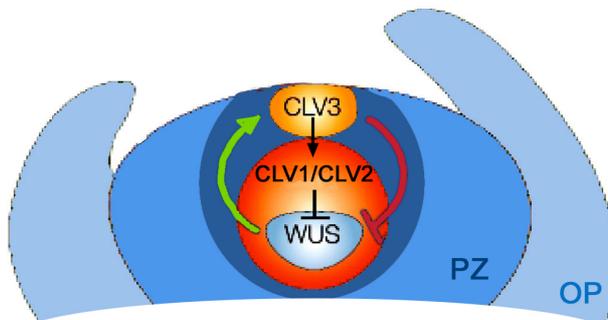
Die zelluläre Expression von *CLV2* konnte durch *in situ* Hybridisierungen nicht aufgelöst werden, doch zeigten *Northern*-Analysen eine Expression innerhalb des Sprosses. Es wird daher angenommen, dass *CLV2* ubiquitär exprimiert wird.

Weitere genetische und molekulare Experimente führten zur Schlussfolgerung, dass der *CLAVATA*-Signaltransduktionsweg einen Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt, der die Akkumulation von Stammzellen innerhalb der zentralen Zone kontrolliert. So zeigte sich eine verstärkte *CLV3* Expression in *clv1*-mutanten Pflanzen in einer insgesamt stark vergrößerten Domäne im Zentrum des Meristems (Fletcher et al., 2000). Das wies darauf hin, dass im Wildtypmeristem zwei Mechanismen mit entgegengesetzter Funktion existieren. Während der eine Mechanismus einen positiven Einfluss auf die Bildung von Stammzellen ausübt, wird durch den anderen Mechanismus die Bildung von Stammzellen reprimiert. Durch die konstitutive Expression von *CLV3* konnten diese

Mechanismen genetisch entkoppelt werden. Transgene Pflanzen die *CLV3* konstitutiv exprimierten, zeigten einen Phänotyp der dem *wus*-mutanter Pflanzen ähnelt (Brand et al., 2000). Dass das *WUS* Gen das Hauptziel des CLAVATA-Signaltransduktionsweg darstellt, ist durch die Analyse der *WUS* Transkription in *CLV3* überexprimierenden Pflanzen gezeigt worden, da in diesen transgenen Pflanzen kein *WUS* Transkript nachgewiesen werden konnte. Ebenso ist gezeigt worden, dass in *clv3*-mutanten Pflanzen *WUS* in einer vergrößerten Domäne exprimiert wird (Brand et al., 2000). Demzufolge scheint *WUS* direkt - aber in negativer Abhängigkeit - auf die Aktivität von *CLV3* zu reagieren.

Die positive Regulation der Stammzellpopulation ist abhängig von der Aktivität des *WUS* Gens. So wurde durch die ektopische Expression von *WUS* ein Phänotyp induziert, der dem *clv*-mutanter Pflanzen ähnelt. Darüber hinaus wird in diesen transgenen Pflanzen *CLV3* ektopisch exprimiert. (Schoof et al., 2000). Demzufolge ist *WUS* in der Lage, Stammzellschicksal zu fördern und somit *CLV3* Expression zu induzieren. Die *WUS* Aktivität ist eine Hauptkomponente in dem Regulationsmechanismus, der einen positiven Einfluss auf die Bildung von Stammzellen ausübt.

Zusammenfassend kann in Bezug auf den negativen Rückkopplungsmechanismus festgehalten werden (Abb. 1), dass das in den tieferen Schichten exprimierte *WUS* Gen in der zentralen Zone Stammzellidentität induziert und damit die Expression von *CLV3* bedingt. *CLV3* wird in den äußeren Zellschichten sekretiert und aktiviert den heterodimeren *CLV1/CLV2* Rezeptorkomplex in tiefer liegenden Schichten des Meristems innerhalb der zentralen Zone, dessen Aktivität in einer Repression von *WUS* resultiert. Somit aktiviert *WUS* seinen eigenen Repressor, was die Aufrechterhaltung eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Stammzellidentität und Differenzierung erlaubt.



**Abb. 1.: Schematische Darstellung des negativen Rückkopplungsmechanismus zur Kontrolle von Stammzellidentitäten.** *WUS* induziert in der zentralen Zone (tiefblau) Stammzellidentität und damit die Expression von *CLV3*. *CLV3* wird in den äußeren Zellschichten sekretiert und aktiviert den heterodimeren *CLV1/CLV2* Rezeptorkomplex in tiefer liegenden Schichten des Meristems in der zentralen Zone. Die Aktivierung des Rezeptorkomplexes führt zu einer transkriptionellen Repression von *WUS*. **PZ**: periphere Zone; **OP**: Organprimordium (modifiziert nach Tsiantis und Hay, 2003)

Auch biochemische Analysen untermauerten den postulierten negativen Rückkopplungsmechanismus (Abb. 2). So ist gezeigt worden, dass CLV1 Bestandteil eines 185- und eines 450-kD-Komplex ist. CLV3 ist als weiterer Bestandteil des 450-kD-Komplexes detektiert worden. Auch konnte sowohl in *clv3* Mutanten als auch in *clv1* Mutanten, denen die intrazelluläre Kinasedomäne fehlt, die Bildung des 450-kD-Komplex nicht nachgewiesen werden. Deshalb wird angenommen, dass zum einen der 450-kD-Komplex den aktiven Komplex darstellt und zum anderen die Existenz der CLV1 Kinasedomäne bzw. des CLV3 Polypeptids eine essentielle Voraussetzung für die Bildung dieses Komplexes ist (Trotochaud et al., 1999).

Auch in *clv2* Mutanten konnte die Bildung des aktiven 450-kD-Komplexes nicht nachgewiesen werden (Jeong et al., 1999). Außerdem ist gezeigt worden, dass der 185-kD-Komplex ein über Disulfid-Brücken verbundenes Heterodimer aus CLV1 und CLV2 darstellt. Es wird angenommen, dass CLV2 als Dimerisierungspartner von CLV1 eine stabilisierende Funktion ausübt (Jeong et al., 1999).

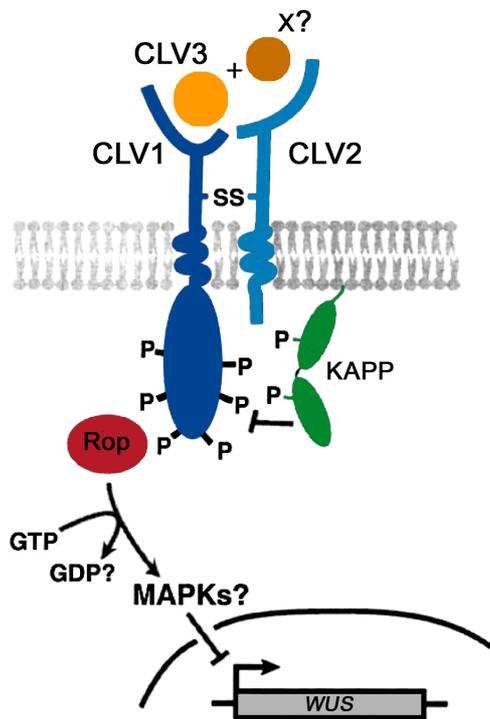
Als Bestandteile des aktiven 450-kD-Komplexes konnten neben CLV1, CLV2 und CLV3 bisher zwei cytosolische Komponenten nachgewiesen werden. Die eine ist eine Kinase-assoziierte-Protein-Phosphatase (KAPP) die andere ein Rho-GTPase verwandtes Protein (Rop) (Trotochaud et al., 1999). Dass KAPP die CLV1-Kinase-Aktivität negativ regulieren könnte, ist durch die Analyse transgener Pflanzen, die KAPP überexprimieren, abgeleitet worden, da diese den *clv1*-mutanten Phänotyp kopierten (Williams et al., 1997). Es wird angenommen, dass diese negative Regulation durch Dephosphorylierung von CLV1 vermittelt wird (Stone et al., 1998).

Das Rop Protein könnte im weiteren Verlauf der Signaltransduktion wirken, indem es die Signalweiterleitung, möglicherweise über die Interaktion mit einer Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Kaskade, vermittelt (Hirt et al., 1997; Williams et al., 1997; Stone et al., 1998; Trotochaud et al., 1999).

Aufgrund dieser biochemischer Daten, wird derzeit angenommen, dass das CLV3 Protein an den 185-kD CLV1/CLV2-Komplex bindet, dieser dann durch Autophosphorylierung aktiviert wird und zusammen mit KAPP und Rop den aktiven 450-kD-Komplex bildet.

Ein weiterer Faktor, der im CLAVATA Signaltransduktionsweg eine Rolle zu spielen scheint, ist das von Ishiguro et al. 2002 klonierte *SHEPERD (SHD)* Gen. *SHP* kodiert für ein HSP90-ähnliches Protein und ist im ER lokalisiert. Der pleiotrope Phänotyp von *shp* Mutanten zeigt unter anderem die Vergrößerung von Spross- und die Blütenmeristemen. Weitere genetische Analysen zeigten, dass Spross- und Blütenmeristeme von *shp/clv* Doppelmutanten von *clv* Einzelmутanten nicht zu unterscheiden waren. Da die Überexpression von *CLV3* in *shp* Mutanten keine Auswirkungen hat, ist zu vermuten, dass die Funktion von *CLV* von *SHP* abhängig ist.

Eine Zusammenfassung des CLAVATA-Signaltransduktionswegs ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des CLV-Signaltransduktionskomplexes.** Die LRR-Rezeptorkinase CLV1 bildet über Disulfid-Brücken einen heterodimeren Rezeptorkomplex mit dem LRR Rezeptorprotein CLV2 in der Plasmamembran von Zellen, die in tieferliegenden Schichten des Meristems lokalisiert sind. Die Bindung des Ligandenpeptids CLV3 und eventuell die eines weiteren bisher noch nicht identifizierten Liganden induziert die Assoziation des aktiven Rezeptorkomplexes, der auch die Proteine KAPP und Rop enthält. Das Signal wird womöglich über eine MAPK-Kaskade vom Cytosol in den Nukleus weitergeleitet, wo es die Transkription von *WUS* negativ reguliert. (Modifiziert nach Sharma et al., 2003)

#### 1.4 Meristemspezifische Gene in *Zea mays*

Auch in *Zea mays* konnten Mutationen charakterisiert werden, die die Aufrechterhaltung des sprossapikalen Meristems beeinflussen. So konnte in *knotted1* (*kn1*) Funktionsverlust Mutanten in bestimmten genetischen Hintergründen beobachtet werden, dass 50% der Embryonen nach dem Erreichen des Koleoptilarstadiums ihre Entwicklung einstellten, die verbleibenden 50% zeigten nach der Keimung die Ausbildung einer Koleoptile, aber anstelle des meristematischen Domes war in den aberrant entwickelten sprossapikalen Meristemen ein abgeflachtes Gewebe zu beobachten, das keinerlei meristematische Funktion mehr ausübten (Vollbrecht et al., 2000). In schwächeren *kn1* Funktionsverlustallelen wurden zwar Blütenstände gebildet, doch zeichneten diese sich durch die Anlage einer reduzierten Anzahl von *spikelet pair*-, *spikelet*- und Blütenmeristeme aus (Kerstetter et al., 1997).

Somit scheint auch *kn1* eine Funktion in der Aufrechterhaltung des sprossapikalen Meristems auszuüben. *Kn1* ist ähnlich zu *STM* innerhalb des sprossapikalen Meristems sowie innerhalb der unterschiedlichen Meristemen der Blütenstände exprimiert (siehe auch Kapitel 3.5.3.); darüber hinaus kodiert *kn1* wie *STM* für einen Homöobox-Transkriptionsfaktor. Aufgrund der vergleichbaren

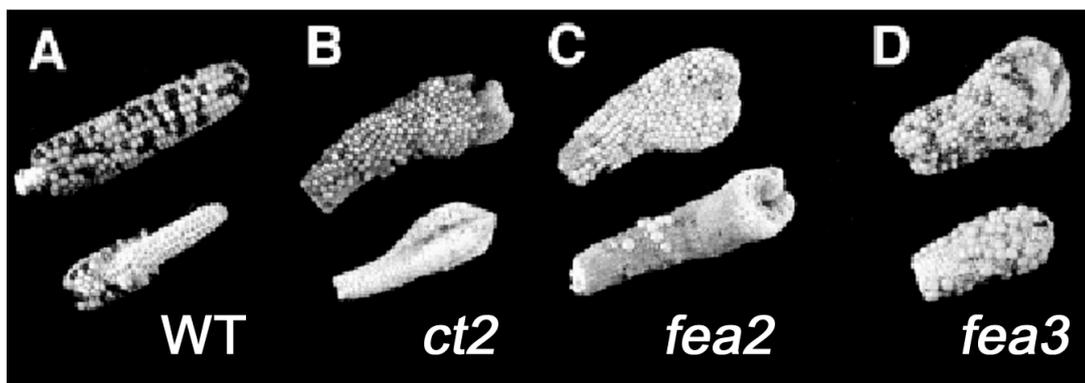
Phänotypen in Funktionsverlustallelen und der ähnlichen Expressionsmuster wird angenommen, dass *kn1* das funktional orthologe Gen zu *STM* repräsentiert.

Wie in *Arabidopsis* sind auch in *Zea mays* eine Reihe von Mutationen identifiziert worden, deren Infloreszenzmeristeme abnormal vergrößert sind. Zu diesen Mutationen zählen unter anderem die dominante Mutation *Fasciated ear1 (Fas1)* und die rezessiven Mutationen *fasciated ear2 (fea2)*, *fasciated ear3 (fea3)*, *compact plant2 (ct2)* und *thick tassel dwarf1 (td1)* (Orr et al., 1997; Jackson und Hake, 1998).

Wie in Abbildung 3 stellvertretend für einige der oben genannten Mutationen gezeigt, zeichnen sich die genannten Mutationen durch eine abnormale Vergrößerung des Infloreszenzmeristems aus. Interessanterweise sind die Vergrößerungen in weiblichen Infloreszenzen wesentlich stärker ausgeprägt als in den männlichen.

Der in *Arabidopsis* gezeigte CLAVATA-Signaltransduktionsweg sowie die Phänotypen der *clv* Mutanten ließ vermuten, dass für einige der oben genannten Phänotypen womöglich Defekte in *CLV*-ähnlichen Genen ursächlich sind (McSteen et al., 2000).

Tatsächlich kodiert *fea2*, das vor zwei Jahren in der Arbeitsgruppe von David Jackson kloniert worden ist, für ein *CLV2*-ähnliches LRR-Rezeptorprotein (Taguchi-Shiobara et al., 2001). Die Klonierung von *fea2* lieferte somit erstmalig Evidenz für die Annahme, dass der CLAVATA-Signaltransduktionsweg auch in anderen Spezies konserviert ist.



**Abb.3: Unterschiedliche rezessive Mutationen in *Zea mays*, die sich durch faszierte Kolben auszeichnen im Vergleich zum Wildtyp.** In Analogie zu den *clv* Phänotypen ist spekuliert worden, dass diese Mutationen eventuell Defekte in den *CLV* Loci repräsentieren (Jackson und Hake, 1998).

## 1.5 Die Blütenentwicklung von *Zea mays*

*Zea mays* produziert als eine einhäusige (monözische) Pflanze zwei Arten von getrenngeschlechtlichen Blütenständen, die Fahne und den Kolben. Die Fahne, der männliche Blütenstand, entwickelt sich aus dem sprossapikalen Meristem, nachdem eine vom genetischen Hintergrund abhängige Anzahl von Blättern angelegt worden ist. Der Kolben, der den weiblichen Blütenstand darstellt, entwickelt sich aus den apikalen Meristemen der Seitentriebe, die sich ihrerseits, durch stark verkürzte Internodien kaum sichtbar, in den Blattachsen des siebten bis zehnten Blattes entwickeln.

Obwohl sich reife Fahne und Kolben in ihrer äußeren Erscheinung stark voneinander unterscheiden, sind sie sich in ihrer Organisation und Entwicklung ähnlich. Das Infloreszenzmeristem des männlichen Blütenstandes produziert vier Arten von axiliären Meristemen: *branch* Meristeme, *spikelet pair* Meristeme, *spikelet* Meristeme und Blütenmeristeme. Die von den männlichen Infloreszenzmeristemen zuerst produzierten *branch* Meristeme bilden die Seitentriebe des männlichen Blütenstandes, welche auswachsen und erneut an ihren Flanken die genannten Meristemtypen initiieren. Das Infloreszenzmeristem des weiblichen Blütenstandes produziert mit Ausnahme des *branch* Meristems dieselben Meristeme.

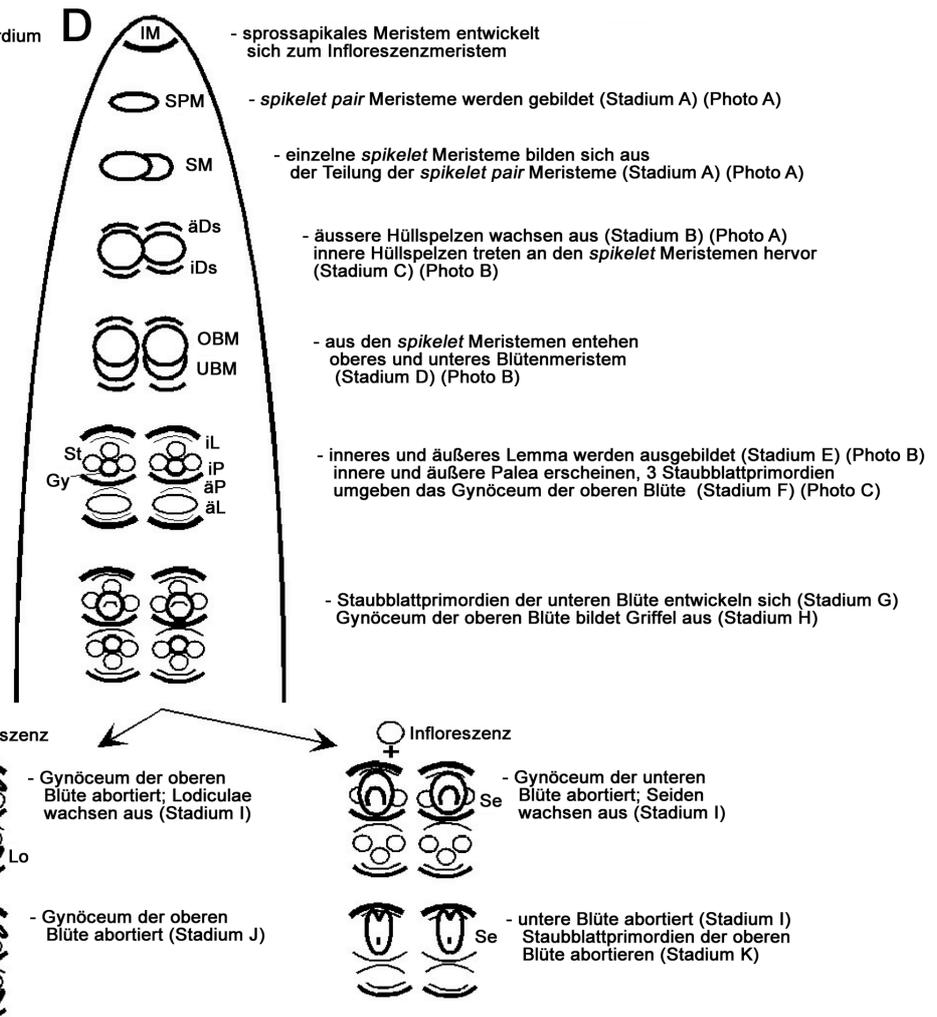
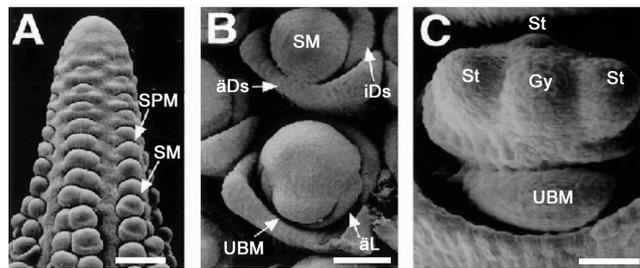
Die von beiden Infloreszenzmeristemen produzierten *spikelet pair* Meristeme, bilden zwei *spikelet* Meristeme. Die *spikelet* Meristeme produzieren jeweils zwei Deckspelzen gefolgt von zwei Lemma, bevor in den Achseln der Lemma die Blütenmeristeme entstehen, die in unteres und oberes Blütenmeristem unterschieden werden.

Die Blütenmeristeme bilden die eigentlichen Blütenorgane. Dabei werden von jedem Blütenmeristem eine Palea, zwei Lodiculae, drei Staubgefäße und ein Pistill gebildet. Dabei stellt die Palea das zu den Sepalen homologe Blütenorgan dar und die Lodiculae repräsentieren die zu den Petalen homologen Blütenorgane. Diese Zuordnung beruht auf der molekularen Analyse des B-Funktion Gens *silky1* in *Zea mays* (Ambrose et al., 2000).

Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung werden in männlichen Blüten die weiblichen Organe abortiert und in weiblichen Blüten die männlichen, so dass eingeschlechtliche Blüten verbleiben. Darüber hinaus verlieren die unteren Blütenmeristeme des weiblichen Blütenstandes nachdem sie Staubblattprimordien und Gynöceum initiiert haben ihre Aktivität und werden ebenfalls abortiert. Eine schematische Darstellung der einzelnen Entwicklungsstadien ist in Abbildung 4 dargestellt.

Abkürzungen:

- IM= Infloreszenzmeristem
- SPM= *spikelet pair* Meristem
- SM= *spikelet* Meristem
- äDs= äussere Deckspelze
- iDs= innere Deckspelze
- OBM= oberes Blütenmeristem
- UBM= unteres Blütenmeristem
- äl= äusseres Lemma
- iL= inneres Lemma
- äP= äussere Palea
- iP= innere Palea
- St= Staubblattprimordium
- Gy= Gynoceum
- Lo= Lodiculae
- Si= Seide



**Abb. 4: Einteilung der Entwicklungsstadien der *Zea mays* Infloreszenz basierend auf rasterelektronenmikroskopischen Analysen.** **A:** Die Entstehung von *spikelet pair*- und *spikelet* Meristemen entlang der Spitze einer weiblichen Infloreszenz. Maßstab= 300µm **B:** Entwicklung von *spikelet* Meristemen (oben) und Entstehung des oberen und unteren Blütenmeristems (unten) einer weiblichen Infloreszenz. Maßstab= 100µm **C:** Entwicklung der Blütenorganprimordien des oberen Blütenmeristems einer weiblichen Infloreszenz. Maßstab= 80µm **D:** Schematische Darstellung der einzelnen Entwicklungsstadien nach Cheng et al., 1983. (Darstellung modifiziert nach Deleu, 2002)

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von *CLV1*-ähnlichen Genen aus *Zea mays* durch einen auf Sequenzhomologie basierenden PCR Ansatz.

Der hohe Konservierungsgrad der intrazellulären Kinasedomänen von pflanzlichen und tierischen Serin/Threonin Rezeptor Kinasen erlaubte das Design degenerierter Oligonukleotide. Anschließend sollten die isolierten Sequenzen molekular anhand von Expressionsanalysen charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten Kollektionen von Transposon-induzierten Mutanten auf eventuelle Insertionen innerhalb der zuvor charakterisierten Sequenzen hin untersucht werden.

Parallel sollte durch Bestimmung der chromosomalen Lokalisation der identifizierten Sequenzen eine mögliche Korrelation mit bereits kartierten und charakterisierten Mutationen erfolgen. Durch eine phänotypische Charakterisierung in Kombination mit den erstellten Expressionsdaten sollte die Frage geklärt werden, ob auch in *Zea mays* die Kontrolle von Stammzellidentität durch einen CLAVATA-ähnlichen Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro analysis (p.A.) verwendet und wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Biozym (Hameln), Fluka (Neu-Ulm), Life Technologies (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhof).

Enzyme sowie die entsprechenden Puffer stammen von den Firmen Gencraft (Münster), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Promega GmbH (Mannheim), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg).

Verbrauchsmaterial wurde von Roth (Karlsruhe) und Sarstedt (Rommelsdorf) bezogen, Röntgenfilme von Kodak (Rochester, USA) und Filtermaterial von den Firmen Schleicher & Schüll (Dassel), Macherey & Nagel (Düren) und Amersham (Freiburg).

Radioisotope ( $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  mit der spezifischen Aktivität 6000 Ci/mmol und 400 Ci/mmol) wurden von Amersham (Freiburg) bestellt.

#### 2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Alle verwendeten Standardlösungen und -puffer sowie die Medien zur Kultivierung von *E.coli* wurden nach den Angaben von Ausubel et al. (1996) hergestellt. Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit doppelt deionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  (dd $\text{H}_2\text{O}$ , Milli-Q, Wasserreinigungssystem, Millipore Eschborn) angesetzt. Lösungen für molekularbiologische Arbeiten sowie Medien wurden autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2  $\mu\text{m}$  Filter, Roth), Medien anschließend falls erforderlich mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

#### 2.1.3 Bakterienstämme

DH10B	F <sup>-</sup> , endA1, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\Delta$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139, $\Delta$ (ara, leu)7697, galU, galK $\Delta$ , rpsL, nupG (Invitrogen)
TOP 10	F <sup>-</sup> , mrcA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\Delta$ 80lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, recA1, deoR, araD139, $\Delta$ (ara, leu)7697, galU, galK, rpsL (Str <sup>R</sup> ), endA1, nupG (Invitrogen)
LE392	hsdR514 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), glnV(supE44), tryT(supF58), lacY1 or $\Delta$ (lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55 (Promega)

### 2.1.4 Vektoren

pCR <sup>II</sup> -TOPO <sup>II</sup>	(Invitrogen)
pCR <sup>2.1</sup> -TOPO <sup>II</sup>	(Invitrogen)
pBluescript II KS (+/-)	(Stratagene)
pBluescript SK (+/-)	(Stratagene)

### 2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) und Sigma (Deisenhof) bezogen.

degenerierte Primer für Amplifikationen *CLAVATA1*-ähnlicher Sequenzen :

RWMC1F	GG5 AAR GG5 GG5 GC5 GG5 ATH GT5 TA
RWMC1R	TT5 GC5 AR5 CCR AAR TC5 GC5 AC
CLV1MCF	GG5 AAR GGM GGM GC5 GGR ATY GTS TA
CLV1MCR	TTR GCR AGS CCR AAR TCR GCR AC

**Wobbles:** H: A+T+C M: A+C R: A+G S: C+G Y: C+T

**Modifikationen:** 5: Desoxyinosin

#### Kin5-3' Extension

Kin5-3BIO	GAA GGC GGA GTC GAG AAG GAT GT	<b>Modifikation:</b> 5'- biotinyliert
Kin5-112	TTC GGC ACC GCA AAC ATC G	

#### Kin5-5' Extension

MID160	GTT GGA GAC GAA GCC GAG CAG	<b>Modifikation:</b> 5'- biotinyliert
MID70	GCC GCA CCC TCT CCC CAC CAG	

#### Kin5 In situ/ Northern :

PB-CRF2ba	GCT CTA GAC GTC AAG TCC AAC AAC ATC C
PB-URR2ho	CCG CTC GAG CGA GTG ACG CCA AAA GG

Grau unterlegt sind eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die die Klonierung in die verwendeten Vektoren ermöglicht haben.

Kin5 Real time RT-PCR:

5SEQ-2923 GCT GCT GGC GGA CCT CTA CA  
PBgen-3end GAC GAG TGA CGC CAA AAA G

Ubiquitin Primer:

UBI-Fo TAA GCT GCC GAT GTG CCT GCG  
UBI-Re CTG AAA GAC AGA ACA TAA TGA GCA CAG

Knotted1 Primer:

KN1-Fo ACC GAG CTC CCT GAA GTT GAT GC  
KN1-Re CTA GGC CGT GGG GTG TGA AAT GC

Plasmidprimer:

pBscF GTA AAA CGA CGG CCA GT  
pBscR GGA AAC AGC TAT GAC CAT G

Kin5 Sequenzierungsprimer:

Kin5-56-12 CAT GCC ACC TGC CTT TGA C  
5SEQ-3 GCC TCC TCC CAC CTT CCT CC  
5SEQ-322 AGC CTC ACC GTC GCC AAC TG  
5SEQ-535 CGC TCC CTC CGC TAC CTC CA  
5SEQ-829 CGC CTC GAC ACG CTC TTC CT  
5SEQ-927 CTT CGC CGC TCT CAC CAA CC  
5SEQ-1206 GCT CAT GGA CAA CGG CTT CT  
5SEQ-1410 CAT GCT CAT GCT GGG GAA CA  
5SEQ-1530 GAT CGG CAG GCT CAG GAA CC  
5SEQ-1750 GCC AAC ATG ACG AGC CTG AC  
5SEQ-1959 TGG CTG GTC GTC CTC CTC AC  
5SEQ-2109 CAA GGA GGA CAA CAT CAT CG  
5SEQ-2289 GCT CGG CTT CGT CTC CAA CC  
5SEQ-2484 CGT CAA GTC CAA CAA CAT CC  
5SEQ-2601 CGG CTC ATA CGG CTA CAT CG  
5SEQ-2757 TCG GCG TGG TGC TGC TGG AG  
5SEQ-2923 GCT GCT GGC GGA CCT CTA CA  
5SEQ-3144 CCT T TT TGG CGT CAC TCG TC  
5SEQ-3291 ATT CCC TTT CCC TGG CGT AG  
3SEQ-3305 ATC CGA TTA CAC CCC TAC GC  
3SEQ-3221 ACC GGC AAC TTT CAT TCA CG  
3SEQ-2936 GCC ATG GCC ACC CTG TAG AG  
3SEQ-2776 GGC GCC GCC CCG TGA TGA GC  
3SEQ-2551 CCG CCG CCA CCG AGG AAC TT

3SEQ-2199	GGT GGG GAG AGG GTG CGG CG
3SEQ-1975	CCC AGG ACC GCC AGG ACC AG
3SEQ-1503	GCA GCG GGC CAG AGA AGT TG
3SEQ-1350	TGA GCA TGT TGT CGG TGA GC
3SEQ-1140	TGC CGG TGA GGT GGT TAC TG
3SEQ-945	CGG CGA AGC TGG CGG GTA TC
3SEQ-666	GGC GTG AGA GGC GGG AGA GC
3SEQ-336	GGC CGC GGA GAT AGC AGT TG
3SEQ-140	CGG TGC CGA GGT GGA GTT TG
PB-gen-3end	GAC GAG TGA CGC CAA AAA G
M13F20	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Ausubel *et al.* (1996) oder Anleitung des jeweiligen Herstellers der verwendeten Materialien (Enzyme, Chemikalien, Kits) ausgeführt.

### 2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien (*E.coli*)

Für Transformationen wurden elektrokompetente *E.coli* (Mühlhardt, 2000) hergestellt. Die Transformation fand in 0,1 cm Elektroporationsküvetten in einem *GenePulser*<sup>TM</sup> (Geräteeinstellung: Kapazität 25 µF, Spannung 1,8 kV, Widerstand 200Ω) der Firma BIORAD statt. Die Transformation von pCR<sup>II</sup>-TOPO<sup>+</sup> und pCR<sup>2.1</sup>-TOPO<sup>-</sup> Vektoren in TOP10 Zellen erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

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

### 2.2.4 Sichtung von genomischer Phagenbanken

Zum Durchsuchen der Phagenbank wurden ca. 50.000 Plaques pro Petrischale (15 cm) in Topagar eingegossen, auf Porablot Membranen (Macherei-Nagel, Düren) transferiert und mit der entsprechenden [ $^{32}$ P] dCTP Sonde hybridisiert. Positive Plaques wurden ausgestochen und in nachfolgenden Screens vereinzelt. Nach anschließender Amplifikation wurden die DNA mit Hilfe des Lambda Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller isoliert.

### 2.2.5 Isolierung von genomischer DNA aus Mais

Genomische DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Dellaporta (1994) aus *Zea mays* Pflanzen isoliert. 1-2 g Blattmaterial werden in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und in 15 ml Extraktionspuffer für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 5,4 ml 5M KAcO für weitere 15 min auf Eis inkubieren, anschließend bei 4000 rpm für 15 min zentrifugieren. Überstand durch *Miraclon*<sup>TM</sup> Filter in frisches *Falcon* überführen und mit 1 Volumen Isopropanol mischen. Erneute Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min. Pellet nacheinander mit 10 ml 70% EtOH und 5 ml 100% EtOH waschen, jeweils für 5 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugieren, *Falcon* dann invertiert auf saugfähigen Papier lufttrocknen lassen. Pellet in 1ml TE/RNase (20µl/ml) resuspendieren und für 15 min bei 37°C inkubieren. Resuspendierte DNA mit 800µl Phenol extrahieren. Wässrige Phase mit einem Volumen Chloroform/IAA (24:1) reextrahieren und schließlich mit 1 V Isopropanol und 1/10 V 3 M NaAcO fällen und für 10 min auf Eis inkubieren, danach 10 min bei RT und 14.000 rpm zentrifugieren. Abschließend Pellet mit 600 µl 70% EtOH waschen, trocknen und in 200 - 400 µl TE resuspendieren.

Extraktionspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH8, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS , 14mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 2.2.6 Restriktion, Elektrophorese und Membrantransfer von genomischer DNA

Es werden 10µg genomische DNA mit 0,25µl 1M Spermidin (Endkonzentration 2,5 mM) und 80 U Enzym in einem Endvolumen von 100µl bei geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen (laut Herstellerangaben) für 8 Stunden inkubiert. Erneute Zugabe von 40 U Enzym und weitere Inkubation

für 8h. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel werden die Proben mit 1/10V 3M NaAcO und 3V EtOH gefällt und in einem angemessenen Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt über Nacht in einem 0,7% Agarose Gel in 1xAGB. Die DNA wird für 10 min in 0,25 M HCL depuriniert, für 30 min in Denaturierungslösung (1,5M NaCl + 0,5M NaOH) denaturiert und anschließend für 30 min in Neutralisierungslösung (1,5M NaCl + 1MTris-Cl, pH 7,5 neutralisiert. Nach kurzem Waschen in 20xSSC erfolgt der Kapillartransfer der DNA auf *Nylon N<sup>+</sup> Membran* (Amersham) gemäß dem in Sambrooke et al., 1989 beschriebenen *standard capillary transfer procedure*. Abschließend wird die DNA auf dem noch feuchten Filter mit einem *UV-Crosslinker* (Stratagene) auf der Membran fixiert.

### 2.2.7 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden durch radioaktives [<sup>32</sup>P] dCTP erfolgt mit Hilfe des *Ladderman<sup>TM</sup> Labeling Kits* (TaKaRa). Die markierten DNA-Fragmente werden über *Micro Spin Columns S-200 HR* (Amersham) von den ungebundenen radioaktiven Nukleotiden getrennt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

### 2.2.8 Hybridisierung von Membran-gebundener DNA

Die Prähybridisierung erfolgt in Prähybridisierungspuffer in einem geeigneten Gefäß liegend im Wasserbad für mindestens 4 h bei 68°C. Die Hybridisierung erfolgt in Hybridisierungspuffer in einem *Hybritube* (Invitrogen) für mindestens 12 h. Anschließend werden die Filter nach folgenden Schema gewaschen:

1. einmalig für 20 min in 2xSSC/0,1% SDS bei RT
2. zweimalig für 20 min in 0,5xSSC/0,1% SDS bei 68°C
3. einmalig für 20 min in 0,2xSSC/0,1% SDS bei 68°C

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

Prähybridisierungspuffer: 6x SSPE, 4x Denhardt's, 0,4% SDS, 4% Dextransulfat, 100 µg/ml CT-DNA

Hybridisierungspuffer: 6x SSPE, 1x Denhardt's, 4% SDS, 4% Dextransulfat, 100 µg/ml CT-DNA.

### 2.2.9 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

In die Standardreaktion werden 100 pg bis 10 ng DNA als Matrize eingesetzt, die Amplifikation erfolgt in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit 1-2 U *Taq*-Polymerase (Invitrogen) unter den vom Hersteller des Enzyms angegebenen Bedingungen. Für die Amplifikation wurde ein MJ Research Thermoblock (Biozym, Hameln) unter Verwendung des folgenden Standard PCR Profils verwendet:

0	initiale Denaturierung:	2 Minuten bei 95°C
1	Denaturierung:	45 Sekunden bei 95°C
2	Annealing:	45 Sekunden bei der errechneten Temperatur (Mülhardt, 2000)
3	Elongation:	1 Minute / kb Länge PCR-Fragment bei 72°C
4	Wiederholung der Schritte 1-3 29mal	
5	finale Elongation	10 Minuten bei 72°C
6	Pause	4°C

Der Einsatz degenerierter Primer bedingte die Verwendung des folgenden PCR Profils:

0	initiale Denaturierung:	2 Minuten bei 95°C
1	Denaturierung:	45 Sekunden bei 95°C
2	Annealing:	45 Sekunden bei 48°C (Mülhardt, 2000)
3	Elongation:	1 Minute / kb Länge PCR-Fragment bei 72°C
4	Wiederholung der Schritte 1-3 29mal	
5	finale Elongation	10 Minuten bei 72°C
6	Pause	4°C

### 2.2.10 Real time RT-PCR

Für die cDNA Synthesen werden jeweils 500ng poly(A)<sup>+</sup>RNA zu analysierenden Gewebe als Substrat für die reverse Transkriptase eingesetzt. Die Synthese erfolgte unter Verwendung eines Oligo(dT<sub>22</sub>)-Primers. Die cDNA Synthese wurden unter Verwendung der SuperScriptIII™ reversen Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Nach RNaseH Verdau können die jeweiligen einzelsträngigen cDNAs als Matrize in RT-PCR Reaktionen eingesetzt werden. Die Amplifikationen werden

Die *on-line* Erfassung der Amplifikationsraten sind durch Verwendung des SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems) in einem GeneAmp® 5700 *Light Cyclers* nach Angaben des Herstellers durchgeführt worden. Auf Basis der Ubiquitin Amplifikationsprofile wurden die unterschiedlichen cDNA Synthesen normiert. Die Auswertung der Amplifikationsprofile erfolgt mit der GeneAmp 5700 SDS Software.

### 2.2.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mais

Gesamt RNA aus unterschiedlichen Geweben wurden mit Hilfe des *TRIZOL*<sup>®</sup> *Reagent* von Invitrogen nach Herstellerangaben isoliert. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser pro 100 mg Gewebe resuspendiert, so dass die RNA Konzentration der Präparation in etwa 1 µg/µl beträgt.

### 2.2.12 Northern-Analyse

Für ein *Northern*-Gel werden 10 µg poly(A)<sup>+</sup>RNA gefällt, in 7 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mit 15 µl deionisiertem Formamid, 5,25 µl 37% Formaldehyd und 3 µl 10x MEN versetzt. Vor dem Auftragen werden die Proben für 3 min bei 62°C denaturiert und mit 2 µl EtBr (2µg/µl) versetzt

Das denaturierende Agarosegel wird zunächst kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die aufgetrennte RNA wird dann über Nacht in 20x SSC auf Hybond N<sup>+</sup> Membran (Amersham) transferiert. Die RNA wird auf dem noch feuchten Filter mit einem *UV-Crosslinker* (Stratagene) auf der Membran fixiert.

Die Prähybridisierung erfolgt für 3 h in Hybridisierungspuffer in einem entsprechenden Gefäß liegend bei 65°C (Gesamt-RNA) bzw. 45°C (mRNA). Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in frischem Hybridisierungspuffer. Anschließend werden die Filter einmal für 15 min in 2xSSC/1% SDS und für weitere 15 min in 0,5xSSC/1% SDS bei 65°C gewaschen, in Folie verpackt und nach dem Auflegen des X-Omat AR Röntgen-Films (Kodak) bei -70°C für die Autoradiographie exponiert.

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 6x SSPE, 4x Denhardt's-Lösung, 0,4% SDS, 4% Dextransulfat, 100 µg/µl CT-DNA, 100 µg/µl t-RNA

### 2.2.13 RFLP Kartierung mittels rekombinanter Inzuchtlinien

Die Kartierung basiert auf existierenden RFLPs zwischen parentalen Allelen einer rekombinanten Inzuchtlinie (Burr & Burr, 1991).

Für die RFLP-Analysen wurden *Southern*-Filter genomischer DNA der CM37 X T232 Maislinie mit einer *Kin5*-spezifischen Sonde hybridisiert. Nach Auswertung der Autoradiographie wurden in Zusammenarbeit mit Prof. B. Burr die Segregationsdaten mit denen der Datenbank des Brookhaven National Laboratory (<http://burr.bio.bnl.gov/acemaz.html>) verglichen, um die Kartierungsdaten relativ zu bereits kartierten Loci zu bestimmen.

## 2.2.14 Nicht-radioaktive RNA *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung wurde leicht modifiziert nach Jackson (1991) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet die Fixierung des frischen Gewebes, dessen Einbettung in Paraffin, die Herstellung der Schnitte, die Herstellung der Sonde, sowie die Detektion der Transkripte von Interesse mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde und einem Anti-Digoxigenin AP-gekoppelten Antikörper

### 2.2.14.1 Gewebefixierung und Einbettung

#### Herstellung des Fixativs

- 100 ml PBS-Puffer werden mit NaOH auf pH 11 eingestellt und in der Mikrowelle auf etwa 70°C erhitzt
- 4 g Paraformaldehyd zugeben und kräftig schütteln bis das Paraformaldehyd vollständig gelöst ist
- Auf Eis stellen
- pH 7 mit konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> einstellen
- 30 µl Tween20 zugeben

#### Fixierung des Gewebes

Für die Präparation von Infloreszenzen werden diese von den umgebenden Hüllblättern freigelegt. Bis zu 20 Infloreszenzen werden in ein 20 ml Glasgefäß mit Fixativ eingelegt und für 3 x 10 min in einem Vakuum-Exsikkator infiltriert. Danach werden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben werden nun dehydriert, gefärbt und schließlich in Paraffin (Paraplast Plus<sup>□</sup>, Sigma, Deisenhofen) überführt.

- Austauschen des Fixativs durch eiskalten 50% EtOH, 90 min auf Eis
- Überführen in eiskalten 70% EtOH, 90 min auf Eis
- In 85% EtOH für 90 min bei 4°C
- In 95% EtOH mit 0,1% Eosin Y für 90 min bei 4°C
- In 100% EtOH mit 0,1% Eosin Y über Nacht bei 4°C
- In frischem 100% EtOH mit 0,1% Eosin Y für 90 min bei 4°C
- In 100% EtOH für 60 min bei RT
- In 50% EtOH/50% Rotihistol für 60 min bei RT
- In 100% Rotihistol für 60 min bei RT
- Rotihistol Schritt noch zweimal wiederholen
- Entnehmen des Rotihistols und Auffüllen des Glasgefäßes mit 50% (v/v) frischem Rotihistol und 50% (v/v) Paraplast Plus<sup>□</sup>, Inkubation bei 50°C über Nacht
- Austauschen des Rotihistol/Paraffingemisches durch frisch geschmolzenes Paraplast Plus<sup>□</sup>, Inkubation bei 60°C für 8 h

- Austauschen gegen frisches Paraplast Plus<sup>□</sup>, Inkubation über Nacht bei 60°C
- In den nächsten 2 Tagen jeweils morgens und abends durch frisches Paraplast Plus<sup>□</sup> ersetzen

### 2.2.14.2 Herstellung der Gewebeblöcke

Die Gewebeblöcke werden in Wägschalen gegossen. Hierzu wird diese auf einen 60°C warmen Heizblock gestellt und mit etwas geschmolzenem Paraplast Plus<sup>□</sup> gefüllt. Darauf wird das Glasgefäß mit den Proben entleert und die Gewebeproben mit einer zuvor erhitzten Pinzette orientiert. Zur Aushärtung wird die Wägschale in ein kühles Wasserbad gelegt. Die eingebetteten Proben können bei 4°C gelagert werden.

### 2.2.14.3 Herstellung der Mikrotomschnitte

Die in den Wägschalen eingebetteten Gewebeproben werden zunächst zu kleinen Blöcken von ca. 1,5 cm Seitenlänge zurechtgeschnitten, das Paraffin auf der Rückseite der Gewebeblöcke mit einem in einer Bunsenbrennerflamme erhitzten Spatel geschmolzen und die Blöcke jeweils auf einem Holzblöckchen fixiert. Nach 20 min werden die einzelnen Gewebeblöcke auf ein rechteckiges Format geschnitten, wobei seitlich des eigentlichen Gewebes eine 1 –2 mm breite Paraffinschicht erhalten bleibt. Die Gewebeblöcke werden mit der längeren Seite parallel zum Messer im Mikrotom eingespannt. Es werden Schnittbänder mit einer Schnittbreite von 7 µm hergestellt, die mit Hilfe eines feinen Pinsels auf beschichtete Objektträger (Superfrost-Plus<sup>□</sup>, Roth) überführt werden. Die Schnittbänder werden mit sterilem H<sub>2</sub>O überschichtet und auf eine 42°C warme Heizplatte gelegt, bis sich die Schnittbänder vollends gestreckt haben; verbleibendes H<sub>2</sub>O kann mit einer Pasteur-Pipette abgezogen werden. Die Schnitte bleiben über Nacht auf der 42°C warmen Heizplatte liegen und können dann bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert werden.

### 2.2.14.4 Präparation der *antisense* RNA Sonde

Die DNA-Fragmente wurden in den Transkriptionsvektor pBluescript kloniert, das Plasmid durch geeignete Restriktionsendonukleasen linearisiert und über Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung gereinigt. Das linearisierte Plasmid wird in ddH<sub>2</sub>O ad 0,5 µg/µl resuspendiert.

#### In-vitro Transkription:

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

#### Reaktionsansatz:

8,5 µl H<sub>2</sub>O

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

- Die Reaktion wird durch Zugabe von 75 µl TMS Puffer, 2 µl tRNA (100mg/ml) sowie 1 µl DNase (RNase-frei) und Inkubation für 10 min bei 37°C abgestoppt.
- Zur Fällung der RNA werden 100 µl 3,8 M NH<sub>4</sub>Ac und 600 µl EtOH zugegeben und die Reaktion für 1 h bei -20°C inkubiert.
- Zentrifugation für 10 min bei 14 000 rpm
- Waschen des Pellets mit eiskaltem 70% EtOH/0,15 M NaCl
- Zentrifugation für 5 min bei 14 000 rpm
- Resuspension des Pellets in 50 µl H<sub>2</sub>O

#### Hydrolyse:

Die optimale Länge von RNA-Sonde für die *in situ* Hybridisierung auf Pflanzengewebe beträgt 150 bp. Die *in vitro* synthetisierten RNA-Sonden können unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert werden, um ein Gemisch von RNA-Sonden zu erzielen, deren durchschnittliche Länge in etwa 150 bp beträgt. Die Hydrolysedauer wird mit folgender Formel berechnet:

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

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

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

- Resuspension des Pellets in 50 µl H<sub>2</sub>O
- Lagerung bei -20°C

#### Kontrolle der Sonde mit dem Anti-DIG-Antikörper:

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

### **2.2.14.5 Hybridisierungsreaktion**

#### Reinigung der Deckgläser

Die Deckgläser (24 x 50 mm) werden für 15 min in Aceton gewaschen, anschließend getrocknet, in Aluminiumfolie eingeschlagen und bei 180°C für 2h gebacken.

#### Vorbehandlung der Gewebeschnitte

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

10 min .....	100% Rotihistol
10 min .....	100% Rotihistol
1 min .....	100% EtOH
1 min .....	100% EtOH
1 min .....	95% EtOH
1 min .....	85% EtOH
1 min .....	50% EtOH
1 min .....	30% EtOH
1 min .....	ddH <sub>2</sub> O

10 min .....	0,2 M HCl
5 min .....	ddH <sub>2</sub> O
2 min .....	PBS
10 min .....	Pronase (0,125 mg/ml Pronase-Puffer)
2 min .....	Glycin (0,2% in PBS)
2 min .....	PBS
10 min .....	Formaldehyd (4% in PBS)
2 min .....	PBS
2 min .....	PBS
10 min .....	Essigsäureanhydrid (1 ml in 100 ml 0,1 M Triethanolamin pH 8)
2 min .....	PBS

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

#### Hybridisierung

In der Regel werden 2 µl der hydrolysierten DIG markierten RNA-Sonde pro Objektträger eingesetzt. Die Menge kann jedoch je nach der zu erwartenden Intensität des Signals variiert werden. Es werden 40 µl Hybridisierungsgemisch pro Objektträger eingesetzt.

#### Probengemisch:

- 2 µl hydrolysierte RNA-Sonde
- ad 4 µl H<sub>2</sub>O
- + 4 µl deionisiertes Formamid
- mischen,
- Inkubation im Wasserbad bei 80°C für 2 min,
- sofort auf Eis stellen

#### Hybridisierungspuffer:

für 24 Objektträger

- 100 µl 10x Salzlösung
- + 400 µl deionisiertes Formamid
- + 200 µl 50% Dextransulfat
- + 10 µl 100 mg/ml tRNA
- + 20 µl 50x Denhardt's
- + 70 µl H<sub>2</sub>O

8 µl Probengemisch mit 32 µl Hybridisierungspuffer versetzen und auf den Gewebeschnitt auftragen und mit einem Deckglas versiegeln. Die Hybridisierungsreaktion findet in einer mit in 2x SSC/50% Formamidlösung getränkten Papiertüchern ausgelegten Box über Nacht bei 50°C statt.

### 2.2.14.5.1 Waschen der Schnitte

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

### 2.2.14.6 Detektion

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

5 min .....	Puffer 1
60 min .....	Puffer 2
60 min .....	Puffer 3
60 min .....	Puffer 4
4mal 20 min .....	Puffer 1 mit 0,3% Triton X 100
5 min .....	Puffer1
5 min .....	Puffer 5
bis 3 Tage .....	Puffer 6 im Dunkeln

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

### 2.2.14.7 Abstoppen der Reaktion und Schlussbehandlung der Gewebeschnitte

- Kurz in H<sub>2</sub>O waschen
- Waschen in H<sub>2</sub>O für 5 min
- Waschen in 70% EtOH für 5 min
- Waschen in 95% EtOH für 5 min

Anschließend können die Gewebeschnitte mit 2-3 Tropfen Entellan (Merck Eurolab) beschichtet und mit einem Deckglas versiegelt werden.

### 2.2.14.8 Puffer und Stammlösungen

<u>10x PBS:</u>	1,3 M NaCl, 0,07 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,03 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<u>2x Carbonat-Puffer:</u>	80 mM NaHCO <sub>3</sub> , 120 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 10,2
<u>TMS Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCl
<u>10x Pronase-Puffer:</u>	0,5 M Tris-Cl, pH 7,5, 0,05 M EDTA
<u>Pronase:</u>	Herstellung einer Stammlösung mit 40 mg/ml in H <sub>2</sub> O. Vorverdau des Enzyms zur Aktivierung durch Inkubation für 4 h bei 37°C
<u>Triethanolamin:</u>	Herstellung einer 2 M Lösung in ddH <sub>2</sub> O, mit HCl auf pH 8 einstellen
<u>10x Salz:</u>	3 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 M NaPO <sub>4</sub> -Puffer, 50 mM EDTA
<u>Formamid:</u>	Deionisierung durch Verwendung eines Kationen-Anionenaustauschers
<u>Waschpuffer:</u>	2x SSC, 50% Formamid
<u>10x NTE:</u>	5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA
<u>RNase A:</u>	Stammlösung mit 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<u>10x Puffer 1:</u>	1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl
<u>Puffer 2:</u>	1x Puffer 1, 0,5% Blocking reagent (Roche)
<u>Puffer 3:</u>	1x Puffer 1, 1% BSA, 0,3% Triton X-100
<u>Puffer 4:</u>	Puffer 3 mit Anti-DIG Antikörper-AP (Roche, 1:3000)
<u>Puffer 5:</u>	100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
<u>Puffer 6:</u>	Puffer 5 mit 7,5% Polyvinylalkohol; Lösen des Polyvinylalkohols durch Aufkochen auf einem Heizrührer. Nach Abkühlen 1,5 µl NBT und 1,5 µl BCIP pro ml zugeben.
<u>NBT:</u>	100 mg/ml Nitrobluetetrazolium Salz in 70% Dimethylformamid, Roche
<u>BCIP:</u>	50 mg/ml 5-Bromo-4chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid, Roche

## 2.3 Mikroskopische Techniken

### 2.3.1 Nomarsky-Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem *Axioskop* Mikroskop mit Nomarsky-Optik der Firma *Zeiss* und einer angeschlossenen *Axiocam* der Firma *Zeiss* angefertigt. Die Digitalisierung geschah mit Hilfe der zugehörigen Software *Axio Vision*. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop* Version 5.5.

### 2.3.2 Rasterelektronen Mikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit Unterstützung von Rolf-Dieter Hirtz an einem DSM 940 Elektronenmikroskop der Firma *Zeiss* durchgeführt. Die zu untersuchenden weiblichen Infloreszenzen wurden zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und im Vakuum mit einer Goldschicht bedampft. Die Bearbeitung der digitalisierten Bilder erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop* Version 5.5.

## 2.4 Computeranalysen

Die Analysen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden hauptsächlich unter Benutzung des GCG-Programmpakets Version 7.0 (University of Wisconsin Genetics Computer Group) durchgeführt. Weiterhin wurden zur Verarbeitung und Analyse von DNA- bzw. Proteinsequenzen wurden die Programmpakete *Lasergene* und *DNASTAR* verwendet, sowie die im WWW zur Verfügung stehende Analyseprogramme *SMART* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), *CLUSTALW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), *TargetP V1.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

Die *Real time* RT-PCR Analysen wurden mit Hilfe der GeneAmp 5700 SDS Software ausgewertet.

Datenbankabgleiche sind innerhalb Datenbanken NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) und MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>) durchgeführt worden.

Die phylogenetischen Rekonstruktionen wurden mit dem Programm MEGA2.1 erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *CLAVATA1*-ähnlichen Genen

Ziel dieser Arbeit war, *CLAVATA1*-verwandte Gene aus *Zea mays* mit Hilfe eines auf Sequenzhomologie basierenden PCR Ansatzes zu isolieren.

Im *Arabidopsis* Genom können 610 unterschiedliche Rezeptorkinasen nachgewiesen werden, was ~2,5% aller Protein kodierenden Gene im *Arabidopsis* Genom entspricht. Diese 610 Rezeptorkinasen sind anhand der strukturellen Organisation ihrer extrazellulären Domänen in 21 Klassen unterteilt worden. Die Klasse der *leucine rich repeat*-Rezeptorkinasen (LRR-Rezeptorkinasen) ist mit 235 Mitgliedern die weitaus größte (Shiu and Bleeker, 2001). Zu Beginn der Arbeit erfolgte zunächst eine vergleichende Sequenzanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *CLAVATA1*-ähnlichen LRR-Rezeptorkinasen.

Mit Hilfe des Programms *blastp* wurde innerhalb der NCBI-Datenbank ein Abgleich mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *CLVI* erstellt. Dabei wurden eine weitere LRR-Rezeptorkinase aus *Arabidopsis* sowie eine LRR-Rezeptorkinase aus *O. sativa* identifiziert, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Übereinstimmungen von 60% bzw. 58% und Ähnlichkeiten von 63% bzw. 65% zu der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *CLVI* aufweisen. Diese beiden LRR-Rezeptorkinasen zeigen die höchste Ähnlichkeit zu *CLVI*.

Zu diesem Zeitpunkt konnten der Datenbank keine Maissequenzen entnommen werden, die ausreichend hohe Werte hinsichtlich der Aminosäuresequenzidentität bzw. -ähnlichkeiten zu *CLVI* aufwiesen. Auch innerhalb der EST-Datenbank der Maize Genome Database konnten keine Teilsequenzen identifiziert werden, die ausreichend hohe Werte hinsichtlich der Aminosäuresequenzidentität bzw. -ähnlichkeit zeigten. Durch die Berücksichtigung der *O. sativa* Sequenz sollte gewährleistet werden, konservierte Bereiche in den jeweiligen Domänen zu detektieren, die repräsentativ für LRR-Rezeptorkinasen monokotyle Spezies stehen.

Ein mit dem Computerprogramm *CLUSTALW* erstellter Sequenzvergleich zeigte, welche Aminosäurefolgen innerhalb der unterschiedlichen Domänen einen hohen Konservierungsgrad aufweisen, um somit als Matrize für das Design von degenerierten Primern nützlich zu sein (Abb.5). Unter Berücksichtigung des degenerierten genetischen Codes sind dabei solche Aminosäurefolgen von Interesse, in denen die einzelnen Aminosäuren durch wenig Codon-Triplets kodiert werden.



L R R D O M A N E

K I N A S E D.

Abb. 5: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *CLV1*, *RLK1 A.t.* und *RLK1 O.s.* Gelb gekennzeichnet sind die Aminosäurefolgen, die dem Design von degenerierten Primern zugrunde lagen. Grau unterlegt sind die *leucine rich repeat* Domäne und die Kinasedomäne; schwarz eingerahmt ist die Transmembrandomäne. Die NCBI-Datenbank Annotationen der verglichenen Sequenzen können dem Anhang entnommen werden.

Der Abbildung 5 kann entnommen werden, welche Bereiche innerhalb der Kinasedomäne als Matrize für das Primerdesign ausgewählt wurden. Demzufolge sind zu Beginn der Arbeit für die

Amplifikation von *CLVI*-ähnlichen Sequenzen aus *Zea mays* folgende degenerierte Primer synthetisiert worden:

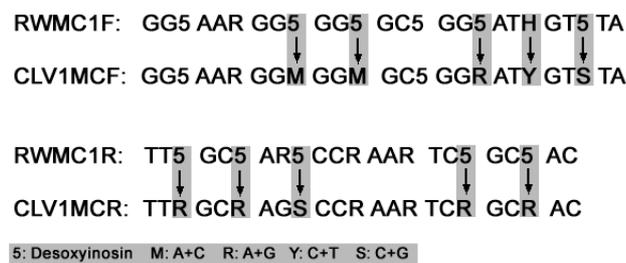
1. **RWMC1F** GG5 AAR GG5 GG5 GC5 GG5 ATH GT5 TA
2. **RWMC1R** TT5 GC5 AR5 CCR AAR TC5 GC5 AC

### 3.2 Isolierung von *CLAVATA1*-ähnlichen Sequenzen

Durch Verwendung des Primerpaares RWMC1F/RWMC1R wurden Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe von ungefähr 450 bp im Agarosegel aufgetrennt. Diese Fragmente wurden in den Vektor pCR<sup>2.1</sup>-TOPO<sup>+</sup> kloniert und anschließend sequenziert. Durch die Analyse von 80 Klonen, konnten vier unterschiedliche Sequenzen identifiziert werden, die nach Ableitung der Aminosäuresequenz signifikante Sequenzhomologien zu Kinasedomänen bereits bekannter und in der NCBI-Datenbank veröffentlichter pflanzlicher LRR- Rezeptorkinasen aufzeigten. Ein mit dem Programm *PileUp* des GCG-Programmpakets erstellter Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen, der als *Kin1-4* bezeichneten Amplifikationsprodukte, im Vergleich zu der von *CLVI* ist in Abbildung 6 dargestellt. Tabelle 1 zeigt die Werte für Aminosäureidentität bzw. Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der vier isolierten Kinasedomänen im Vergleich zu der von *CLVI*.

Erste phylogenetische Analysen, durchgeführt mit dem Computerprogramm *MegAlign*, zeigten, dass diese vier isolierten Kinasesequenzen weder der abgeleiteten *CLVI* Aminosäuresequenz noch anderen putativen *CLVI* Orthologen anderer Spezies zugeordnet werden konnten. Eine genauere phylogenetische Analyse erfolgt in Kapitel 3.3.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde ein weiterer Sequenzvergleich basierend auf den jeweiligen DNA Sequenzen von *CLVI* und der im initialen Sequenzvergleich eingesetzten Reissequenz, erstellt. Hierbei konnte innerhalb der Reissequenz eine signifikante Tendenz zum Einbau von Guanin- bzw. Cytosin-Basen auf der dritten Position einzelner Triplets nachgewiesen werden. Aufgrund der in monokotylen Spezies veränderten Codon-Verwendung wurde der Degenerierungsgrad des Primerpaares RWMC1F/RWMC1R gemäß folgendem Schema reduziert, um eine höhere Spezifität zu erzielen:



Durch Verwendung des modifizierten Primerpaares CLV1MCF/CLV1MCR wurde eine fünfte Kinasesequenz amplifiziert. Nach Klonierung und anschließender Sequenzierung von 20 Plasmiden

konnten zum einem die zuvor isolierten Kinasesequenzen *Kin1-3* identifiziert werden, darüber hinaus eine neue, fünfte Kinasesequenz *Kin5*.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der neu isolierten Kinasesequenz *Kin5* mir der von *CLV1* (Abb. 6) ergab eine Übereinstimmung von 75% und eine Ähnlichkeit von 81,5% (Tab. 1). Im Vergleich zu der im Sequenzvergleich eingesetzten Reissequenz bestehen eine Übereinstimmung von 95 % und eine Ähnlichkeit von 96 %.

Die zunächst mit dem Computerprogramm *MegAlign* erstellte Phylogenie zeigte die Einordnung der *Kin5* Sequenz innerhalb einer Subfamilie putativ *CLV1* orthologer Gene.



**Abb. 6:** Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der fünf isolierten Maissequenzen, *Kin1-5*, mit einem Teilbereich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *CLV1*: Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, grau unterlegt sind sich ähnliche Aminosäuren. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *PileUp* des GCG-Programmpakets erstellt.

	KIN1		KIN2		KIN3		KIN4		KIN5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
CLV1	84,0%	76,0%	85,6%	78,4%	84,8%	77,6%	54,5%	42,3%	81,5%	75,0%

**Tab. 1:** Vergleich der fünf isolierten Kinasesequenzen mit *CLV1*. Berechnete Aminosäureähnlichkeiten (Spalte a) und Aminosäureidentitäten (Spalte b) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der fünf isolierten Maissequenzen jeweils im Vergleich zu *CLV1*. Die Berechnungen wurden mit dem Programm *BestFit* des GCG-Programmpakets erstellt.

Abschließend kann festgehalten werden, dass fünf Maissequenzen mit hoher Sequenzverwandtschaft zu *CLV1* durch die Verwendung unterschiedlicher, degenerierter Oligonukleotide isoliert werden konnten. Der in Abbildung 6 gezeigte Sequenzvergleich lässt vermuten, dass die Sequenzen *Kin2* und

*Kin3* duplizierte Gene repräsentieren, da sie zueinander die höchste Sequenzübereinstimmung zeigen. Weiterhin zeigen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Kin1* und *Kin5* mehrere charakteristische Aminosäureübereinstimmungen mit *CLV1*. Diese befinden sich unterschiedlichen Positionen, so dass aufgrund des erstellten Sequenzvergleiches nicht genau definiert werden kann, welche der beiden Maissequenzen den näheren Verwandtschaftsgrad zu *CLV1* repräsentiert.

### 3.3 Phylogenetische Analyse der isolierten Kinase Sequenzen

Eine phylogenetische Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse der in dieser Arbeit isolierten Kinase Sequenzen, im Vergleich zu denen der NCBI- und DDBJ-Datenbanken entnommenen LRR-Rezeptorkinase Sequenzen, wurden mit Hilfe des Programms MEGA 2.1 erstellt (Kumar et al., 2001). Die Auswahl der eingesetzten Sequenzen erfolgte aufgrund der Übereinstimmungswerte ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenzen innerhalb der Kinasedomäne. Der der phylogenetischen Rekonstruktion zugrunde liegende Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *CLUSTALW* unter Verwendung der Standardparameter erstellt.

Die phylogenetische Rekonstruktion erfolgte nach dem *Minimum Evolution* Algorithmus des MEGA 2.1 Programms. Die *bootstrap* Werte, welche die Wahrscheinlichkeit der phylogenetischen Aufspaltung anzeigen, sind mit 1000 Wiederholungen bestimmt worden.

Die phylogenetische Rekonstruktion zeigt die Existenz zweier Unterfamilien *CLV1*-ähnlicher Kinasen (Abb. 7). Die Maissequenzen *KIN1-3* sind innerhalb der Unterfamilie A zugeordnet worden, wohingegen die Maissequenz *KIN5* der Unterfamilie B zugeordnet worden ist.

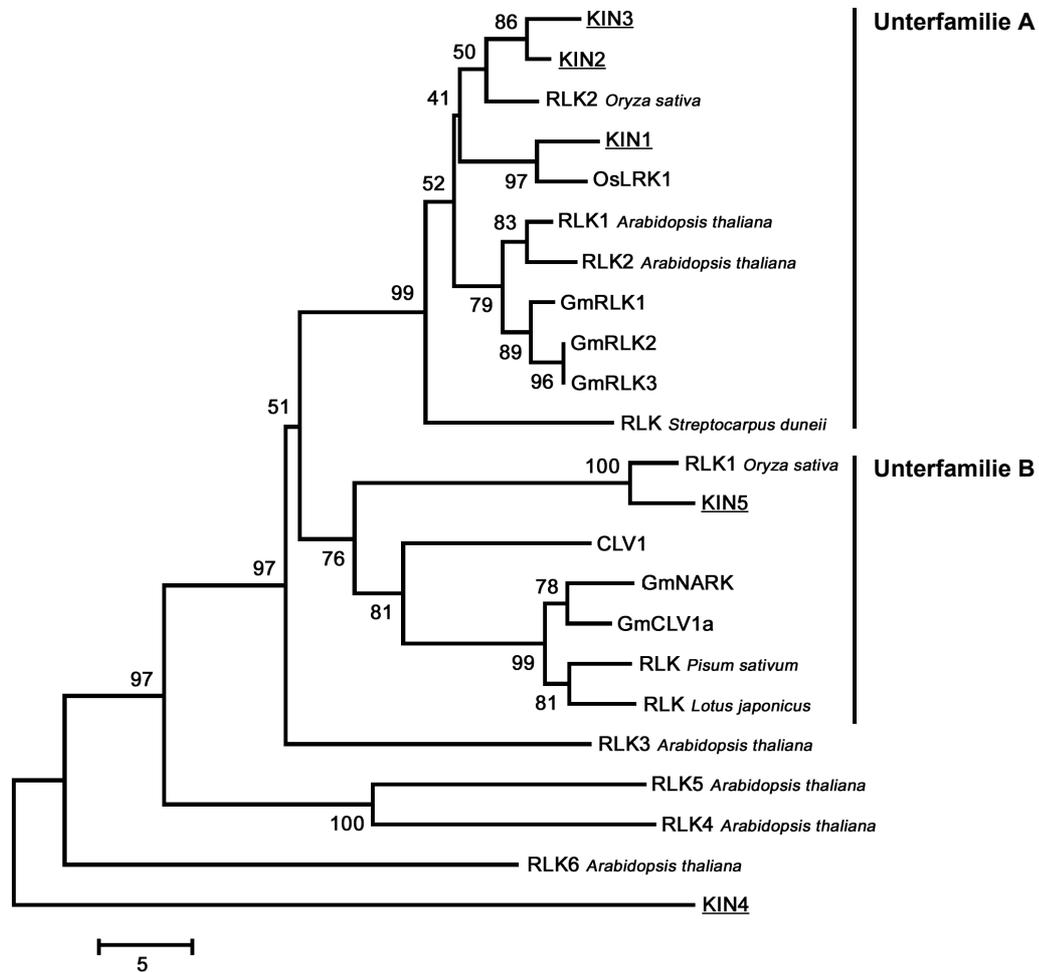
In beiden Unterfamilien erfolgt eine Aufspaltung in mono- bzw. dikotyle Spezies. So gruppiert *CLV1* innerhalb der Unterfamilie B mit vier weiteren Kinasesequenzen dikotyler Spezies. Neben zwei vermutlich paralogen *CLV1*-ähnlichen Sequenzen aus der Leguminose Soja (*GmNARK* und *GmCLV1a*) gruppieren noch je eine Kinasesequenz der Leguminose Erbse (RLK *Pisum sativum*) und des Hornklees (RLK *Lotus japonicus*) innerhalb dieses Astes. *KIN5* wird in der Unterfamilie B in einem Ast mit der Sequenz *RLK1 Oryza sativa* eingeordnet. Die Bestimmung des *bootstrap* Wertes zwischen beiden Ästen mit 76 zeigt eine ausreichend hohe statistische Unterstützung der phylogenetischen Rekonstruktion.

Interessanterweise kann auch in Unterfamilie A eine strikte Aufspaltung der Kinasesequenzen in einen mono- bzw. dikotylen Ast beobachtet werden. Die Kinasesequenzen *KIN1*, *KIN2* und *KIN3* werden zusammen mit den zwei Reissequenzen *RLK2 Oryza sativa* und *OsLRK1* eingeordnet. Wie bereits zuvor angenommen, repräsentieren *Kin2* und *Kin3* innerhalb dieser Unterfamilie duplizierte Gene, welche auf die Allotetraploidisierung des Maisgenoms (Gaut und Doebley, 2000) zurückgeführt werden könnte.

Mit Ausnahme von *OsLRK1* sind in der Unterfamilie A keine Daten bezüglich der biologischen Funktion der jeweiligen Kinasen vorhanden. *OsLRK1* scheint jedoch in ähnlichen Regulationsprozessen involviert zu sein wie *CLV1*, da in *OsLRK1* antisense RNA Experimenten die Bildung zusätzlicher Blütenorgane beobachtet werden konnte (Kim et al., 2001).

Auch innerhalb der Unterfamilie B sind die meisten Gene funktional bisher noch nicht charakterisiert worden. So konnte neben *CLV1* einzig die biologische Funktion von *GmNARK* bestimmt werden. *GmNARK* repräsentiert wahrscheinlich zusammen mit *GmCLV1a* ein dupliziertes Genpaar, wobei

*GmNARK* in der Regulation der Entwicklung von symbiotischen Wurzelknöllchen involviert ist (Searle et al., 2003). Die biologische Funktion von *GmCLV1a* ist noch nicht identifiziert worden.



**Abb. 7: Phylogenetische Rekonstruktion *CLV1*-ähnlicher Kinasesequenzen.** Der dargestellte Stammbaum zeigt den nahen Verwandtschaftsgrad zwischen *KIN5* und *CLV1*, die gemeinsam innerhalb der Unterfamilie B eingeordnet worden sind. Die Erstellung der phylogenetischen Rekonstruktion basiert auf dem *Minimum Evolution* Algorithmus des MEGA2.1 Programms. Die fünf isolierten Maissequenzen sind unterstrichen dargestellt. Die *bootstrap* Werte sind an den jeweiligen Verzweigungspunkten angegeben. Die NCBI- bzw. DDBJ-Datenbank Annotationen der verwendeten Sequenzen können dem Anhang entnommen werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass aufgrund der erstellten phylogenetischen Rekonstruktion die *Kin5* Kinasesequenz als Teilsequenz des zu *CLV1* orthologen Gens in *Zea mays* in Betracht gezogen werden muss. Die Bestimmung der hohen *bootstrap* Werte und die strikte Aufspaltung in mono- bzw. dikotyle Äste innerhalb beider Unterfamilien belegen die Aussagekraft der Rekonstruktion. Die Tatsache, dass durch die Verwendung des *Neighbor-Joining* Algorithmus ein ähnlicher Stammbaum

erstellt werden konnte, kann als ein weiterer Beleg für die Signifikanz der Rekonstruktion gesehen werden.

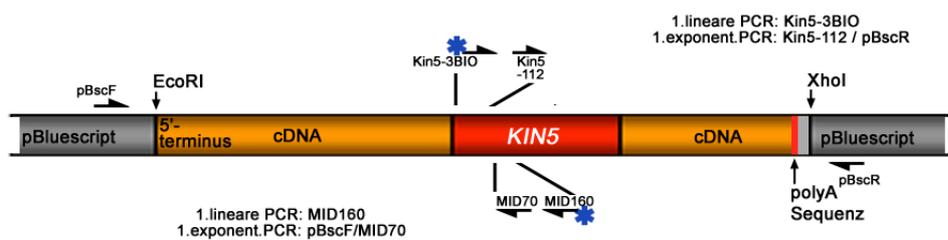
Des Weiteren zeigt die phylogenetische Rekonstruktion die Existenz eines duplizierten *CLVI*-ähnlichen Ursprungsgens. Das Duplikationsereignis, das vor der Separation der einzelnen Spezies stattgefunden haben muss, kann als Voraussetzung für die Entstehung der *CLVI*-ähnlichen Unterfamilien A und B angenommen werden.

### 3.4 Die Isolierung der vollständigen *Kin5* DNA-Sequenz

#### 3.4.1 Sichtung einer cDNA Bank mittels PCR

Aufgrund der Ergebnisse der phylogenetischen Analyse erfolgte die Isolation flankierender Sequenzen des 450bp *Kin5* Fragmentes. Hierzu wurde in einem ersten Ansatz versucht, die flankierenden Sequenzen mit PCR aus einer embryonalen cDNA Bank zu amplifizieren.

Die direktional klonierte embryonale cDNA Bank erlaubte den Einsatz von gen- und bankspezifischen Primerkombinationen.



**Abb. 8: Schematische Darstellung des in der cDNA Bank repräsentierten *Kin5* spezifischen Klon.** Dem Schema können die verwendeten Primerkombinationen zur Amplifikation der *Kin5* flankierenden und in der cDNA Bank repräsentierten Sequenzen entnommen werden. Der vorhandene *Kin5* Sequenzbereich ist in rot dargestellt, die durch PCR neu isolierten flankierenden Bereiche in orange. Die dargestellten Sequenzbereiche reflektieren nicht die tatsächlichen Größen. Die Sternchen zeigen die Biotinylierung der Primer.

Die flankierenden Sequenzen wurden in linearen PCRs durch Verwendung von 5'-biotinylierten genspezifischen Primern isoliert. Dadurch sollten unspezifische Amplifikationen aufgrund von überrepräsentierten Vektorsequenzen unterbunden werden. In einer initial durchgeführten linearen PCR wurden jeweils nur der 5' bzw. 3' gelegene *Kin5* genspezifische, biotinylierte Primer eingesetzt. Nach 40 linearen PCR-Zyklen erlaubte die 5'-Biotinylierung der eingesetzten Primer eine effiziente Aufreinigung und damit eine Anreicherung der *Kin5* spezifischen Amplifikationsprodukte.

In einer zweiten, jetzt exponentiellen PCR mit den in Abbildung 8 dargestellten inneren *Kin5*-spezifischen Primern bzw. pBluescript Primern, sowie dem linearen PCR Produkt als Matrize konnte sowohl das 5'- als auch 3'-Ende des in der Bank repräsentierten *Kin5* cDNA Klon amplifiziert werden.

Die neu isolierten 5'- bzw. 3'-gelegenen Sequenzen wurden mit der vorhandenen *Kin5* Sequenz *in silico* zusammengefügt. Der in der cDNA Bank repräsentierte *Kin5* Klon beinhaltet 5'-terminal zwei fast vollständige LRR-Motive, eine Transmembrandomäne sowie eine vollständige intrazelluläre Kinasedomäne. Weiterhin wurde die Sequenz des 3'-gelegenen nicht translatierten Bereiches (3'UTR) identifiziert, der eine Länge von 221 bp aufweist.

Das nun isolierte 3'-Ende der kodierenden Sequenz inklusive des 3'UTRs konnte als wertvolle Sequenzinformation für die genspezifische Synthese von *Northern*- und *In situ*-Hybridisierungssonden verwendet werden (siehe.3.5).

Da der in der cDNA-Bank repräsentierte *Kin5* Klon nicht die komplette *Kin5* Sequenz darstellt, wurde in nachfolgenden Experimente eine genomische Phagenbank durchmustert.

### 3.4.2 Sichtung einer genomischen Phagenbank

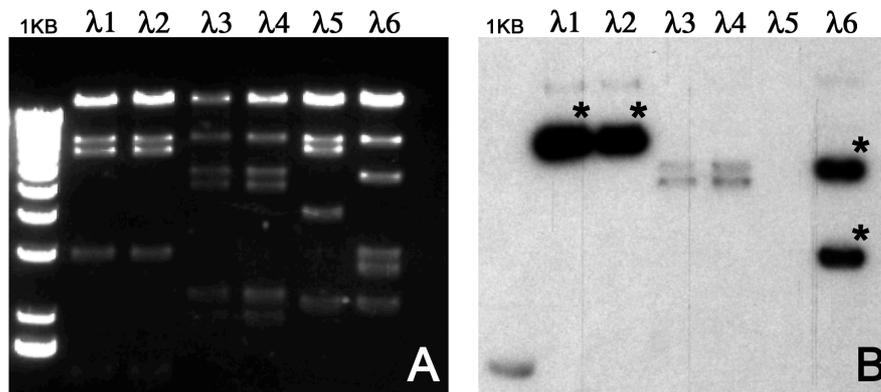
Zur Isolierung 5' gelegener *Kin5* Sequenzen wurde eine EMBL3 SP6/T7 Phagenbank gesichtet. Die Bank wurde durch einen genomischen Sau3A Partialverdau des Mais Hybrids HD5 x HD7, der in die BamHI Schnittstelle des EMBL3 Vektors kloniert wurde, erstellt. Sie wurde freundlicherweise von Dr. Peter Rogowsky zur Verfügung gestellt.

Nach Bestimmung des Phagentiters wurde die Bank mit einer Dichte von 50.000 pfu (*plaque forming unit*) auf insgesamt zwölf 15 cm Platten ausplattiert Dies entspricht einer Gesamtzahl von 0,6 Mio. gesichteter Phagenplaques. Als Hybridisierungssonde wurde das unter 3.4.1. beschriebene isolierte 5' gelegene cDNA Fragment eingesetzt, welches den aminoterminalen Bereich der Kinasedomäne, die Transmembrandomäne sowie zwei fast vollständige LRR-Motive repräsentiert.

Nach durchgeführten Plauefilterlifts und anschließender Vereinzelung wurden 6 Phagenklone isoliert, deren DNA nach SalI Restriktion elektrophoretisch aufgetrennt wurde (Abb. 9A). Die Phagenklone □1 und □2, sowie □3 und □4 zeigten ein identisches Bandenmuster, und repräsentieren demnach wahrscheinlich doppelt isolierte, identische Phagenklone. Die DNA Fragmente der Restriktionsspaltung wurden auf eine Nylonmembran transferiert und erneut mit der 5'-cDNA Sonde hybridisiert. Nach Analyse des Autoradiogramms konnten die Phagenklone □1, □2 und □6 als positiv identifiziert werden. Die Phagenklone □3, □4 und □5 zeigten schwache Hybridisierungssignale und

stellen falsch positiv identifizierte Klone dar, wobei die schwachen Signale durch unspezifische Hybridisierung erklärt werden können (Abb. 9B).

Die genomischen DNA Fragmente der Phagenklone  $\lambda$ 1 und  $\lambda$ 6 wurden nach SalI Restriktion *shotgun* in den zuvor mit SalI geöffneten Vektor pBluescript II KS(+/-) kloniert. Mit Hilfe von Koloniefilterlifts und erneuten Hybridisierungen wurden daraufhin mehrere klonierte Fragmente detektiert.

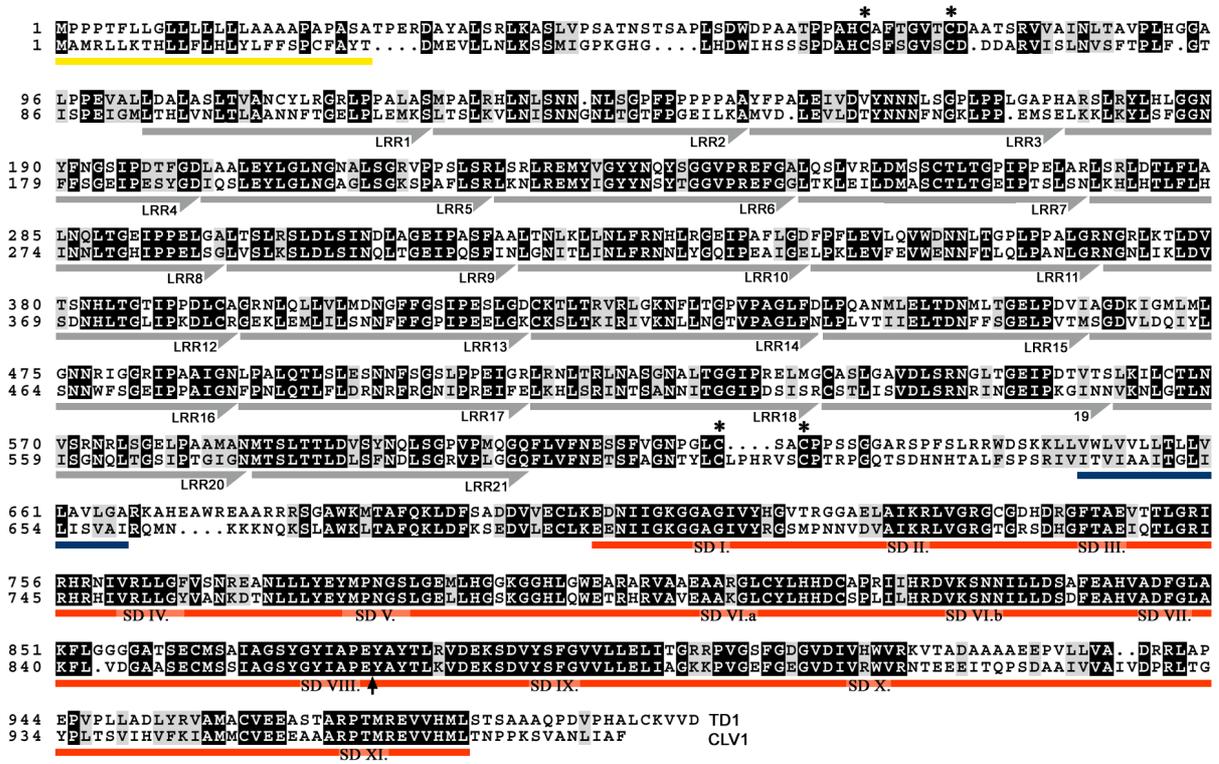


**Abb. 9: Analyse der isolierten Phagenklone.** A: Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Phagen-DNA, der zuvor isolierten sechs Phagenklone nach SalI-Restriktion. Aufgrund des SalI-Restriktionsmusters, konnten die Phagenklone  $\lambda$ 1 und  $\lambda$ 2 bzw.  $\lambda$ 3 und  $\lambda$ 4 als identisch charakterisiert werden. B: *Southern*-Analyse der isolierten Phagen-DNA. Nach Hybridisierung mit einer *Kin5*-spezifischen Sonde können die identischen Phagenklone  $\lambda$ 1 und  $\lambda$ 2 sowie Phagenklon  $\lambda$ 6 als positiv identifiziert werden. Die Phagenklone  $\lambda$ 3,  $\lambda$ 4 und  $\lambda$ 5 konnten als zuvor falsch positiv identifiziert bewertet werden. Die hybridisierenden Banden sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Anschließend konnte durch *primerwalking*, ausgehend von den bereits existierenden *Kin5* Sequenzdaten, die vollständige Sequenz des *Kin5* Gens isoliert werden. Insgesamt wurden 4,2 kb genomischer DNA sequenziert.

Durch Vergleich der zuvor isolierten *Kin5* cDNA Teilsequenz mit der nun vorhandenen genomischen *Kin5* DNA Sequenz konnte innerhalb der Kinasedomäne die Existenz eines 83bp großen Introns an Position +2624 nachgewiesen werden. Die Lage des Introns ist zu der des einzigen Introns von *CLV1* konserviert. Auch die Größe des Introns mit 82bp ist der Größe des *CLV1* Introns mit 79bp sehr ähnlich.

Mit Hilfe des Programms *Lasergene* konnte ein offenes Leseraster von insgesamt 2991bp identifiziert werden. Dies steht auch im Einklang mit der bei *Northern*-Analysen für das *Kin5* Gen detektierten Transkriptgröße.



**Abb. 10: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Kin5* und *CLV1*.** Gelb unterlegt ist die aminoternale Signalsequenz. Grau unterlegt und durchnummeriert sind die 21 vollständigen LRR Motive. Blau unterlegt ist die abgeleitete Transmembran domäne. Die Kinasedomäne ist orange unterlegt. Die paarigen Cysteinreste sind mit Stern markiert. Die identische Position der Introns ist mit einem Pfeil markiert. Die Lage der 12 Subdomänen ist unterhalb des Sequenzvergleiches angegeben (SD I.-XI.). Identische Aminosäuren sind schwarz eingerahmt, grau eingerahmt sind sich ähnliche Aminosäuren. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *PileUp* des GCG-Programmpakets erstellt.

Ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Kin5* und *CLV1* ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Werte für Aminosäureidentität bzw. -ähnlichkeit zwischen *Kin5* und *CLV1* betragen 57,5% bzw. 65,9%. Ein Datenbankabgleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Kin5* innerhalb der NCBI-Datenbank sowie der DDBJ-Datenbank zeigte, dass *Kin5* die höchsten Sequenzhomologien zu der unter 3.1 aufgeführten LRR- Rezeptorkinase *RLK1 O. sativa* und zur *CLV1* LRR-Rezeptorkinase aufweist.

Der hohe Grad an Sequenzübereinstimmung, sowie Lage und Größe des Introns können als weitere Indizien für die enge phylogenetische Verwandtschaft der Gene *Kin5* und *CLV1* gewertet werden. Eine gesonderte Betrachtung der extrazellulären bzw. intrazellulären *Kin5* Domänen im Vergleich zu *CLV1* erfolgt in den Kapiteln 3.4.3.1 und 3.4.3.2.

### 3.4.2.1 Die extrazelluläre *Kin5* Domäne

Die extrazelluläre Domäne einer LRR-Rezeptorkinase kann im Wesentlichen durch die Existenz dreier Domänen charakterisiert werden. Aminoterminal ist eine Signalsequenz lokalisiert, welche die zelluläre Zielsteuerung des Proteins gewährleistet. Es folgt die LRR-Domäne die die Ligandenbindung vermittelt und zwei die LRR-Domäne flankierende Cysteinpaare, welche mit der Dimerisierung mit putativen Interaktionspartnern in Zusammenhang gebracht werden.

Alle drei Motive sind in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Kin5* vertreten und im Vergleich zu *CLVI* hinsichtlich Lage bzw. Aminosäureübereinstimmung hoch konserviert. Die Aminosäuresequenzen der vollständigen extrazellulären Domänen von *Kin5* und *CLVI* zeigen eine Übereinstimmung von 53,9% und eine Ähnlichkeit von 62,3%.

#### Die Signalsequenz

Mit Hilfe des Programms SMART konnten Existenz und Lage einer aminoterminalen Signalsequenz innerhalb der *Kin5* Sequenz bestimmt werden. Sie umfasst die ersten 26 aminoterminalen Aminosäuren. Eine mit dem Programm *TargetP* erstellte Analyse, bestätigte die Existenz der 26 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz (Abb. 11).

Darüber hinaus konnte mit diesem Programm die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Sekretion bestimmt werden. Der Sekretionswahrscheinlichkeit beträgt 0,932, wobei der Wert 1,0 den maximalen, zu berechnenden Wert darstellt. Darauf basierend wurde die Vorhersage für die *Kin5* Signalsequenz als sekretorische Signalsequenz in die höchsten Zuverlässigkeitsklasse (RC1) eingestuft. Insgesamt kategorisiert das Programm fünf Zuverlässigkeitsklassen (RC1-5).

Die Lage der 26 aminoterminalen Aminosäuren umfassenden *CLVI* Signalsequenz konnte ebenfalls mit Hilfe des Programms *SMART* bestimmt werden und steht im Einklang mit denen von Clark et al. 1997 veröffentlichten Ergebnissen.

```

TargetP V1.0 Prediction Results

### ### ### T A R G E T P 1.0 prediction results ### ### ###

# Number of input sequences: 1
# Cleavage site predictions included.
# Using PLANT networks.

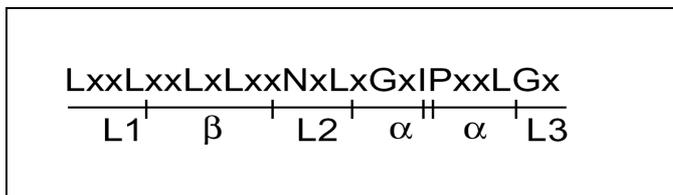
#           Name      Length      cTP   mTP   SP   other   Loc.  RC   TPlen
#-----
#           wt         73         0.039 0.032 0.932 0.008   S    1    26
#-----
    
```

**Abb. 11: Darstellung der mit dem Programm *TargetP V1.0* berechneten Eigenschaften der aminoterminalen *Kin5* Signalsequenz.** Die errechneten Wahrscheinlichkeitswerte für Chloroplastenlokalisierung (cTP), Mitochondrienlokalisierung (mTP) bzw. für die Sekretion des Proteins aufgrund der Signalpeptidcharakteristika indizieren eine Sekretion des KIN5 Proteins. Der errechnete Wahrscheinlichkeitswert für die Sekretion wurde mit 0,932 berechnet, was in einer Einstufung dieser Vorhersage in die höchste Zuverlässigkeitsklasse (RC1) resultiert.

**Das LRR-Motiv**

Pflanzliche LRR- Rezeptorkinasen können aufgrund der strukturellen Organisation ihrer für die Ligandenbindung verantwortlichen LRR-Domänen in 13 Unterfamilien (LRR I-XIII) unterteilt werden, wobei *CLV1* der LRR- Rezeptorkinasen Unterfamilie LRR XI zugeordnet wird (Diévert und Clark, 2003). Die absolute Anzahl von LRR-Motiven kann in den jeweiligen LRR- Rezeptorkinasen zwischen 1 und 32 variieren. Die einzelnen LRR-Motive aller Unterfamilien sind aus 23-25 Aminosäureresten zusammengesetzt und können gemäß der Konsensussequenz LxxLxxLxLxxNxLt/sgxIpxxLGx wiedergegeben werden. Dabei kann die Aminosäure Leucin (L) auch durch eine der Aminosäuren Valin (V), Isoleucin (I) und Phenylalanin (F) ersetzt werden (Kobe und Kajava, 2001).

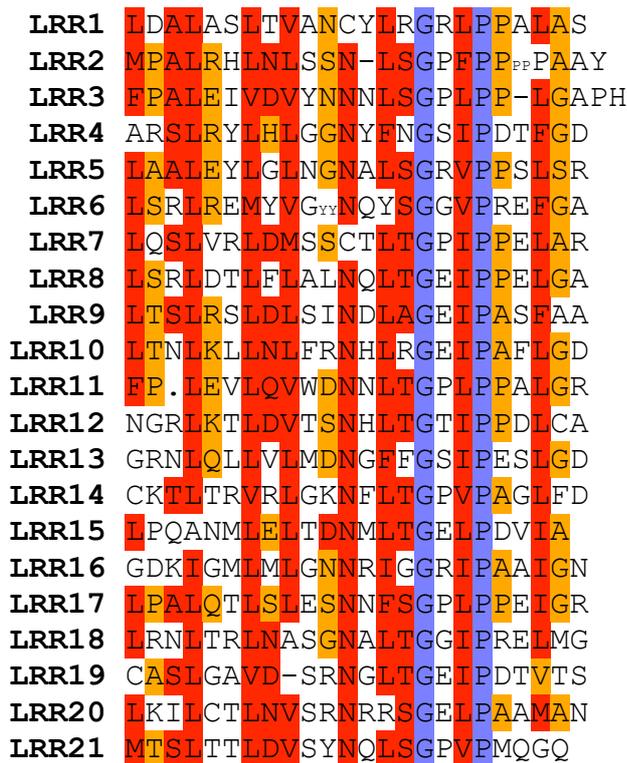
Die abgeleitete räumliche Struktur eines LRR-Motivs stellt ein  $\beta$ -Faltblatt und eine  $\alpha$ -Helix dar, die durch Schleifen (*loops*) miteinander verbunden sind (Abb.12).  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix eines einzelnen LRR-Motivs sind parallel zueinander angeordnet. Die Anordnung der einzelnen LRR-Motive, die ebenfalls durch Schleifen verbunden sind, erfolgt parallel zu einer Achse und resultiert in der Ausbildung einer hufeisenförmigen Struktur, die letztlich eine Ligandenbindung vermitteln kann (Kobe und Deisenhofer, 1995).



**Abb. 12: Schematische Darstellung eines einzelnen LRR-Motivs.** Der Darstellung kann die konservierte Aminosäurefolge innerhalb eines einzelnen LRR-Motivs, sowie die daraus resultierende Anordnung des  $\beta$ -Faltblatts und der  $\alpha$ -Helix entnommen werden (nach Diévert und Clark, 2003).

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Kin5* und *CLV1* repräsentieren 21, direkt in Reihe angeordnete, vollständige LRR Motive (Abb. 10). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller LRR Motive von *Kin5* und *CLV1* zeigen eine Übereinstimmung von 55,1% und eine Ähnlichkeit von 63,9%.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, wurde mit Hilfe des Programms *PileUp* des GCG-Programmpakets ein Sequenzvergleich der 21 vollständigen LRR Motive des *Kin5* Gens erstellt. Die Länge der einzelnen LRR Motive variiert zwischen 23 und 25 Aminosäureresten. Die abgeleitete *KIN5* Konsensussequenz der einzelnen LRR Motive  $LxxLxxLxLxxNxLt/sGxIPxxLGx$  entspricht der dargestellten Konsensussequenz pflanzlicher LRR- Rezeptorkinasen.



**Konsensus** LxxLxxLxLxxNxL<sup>s/4</sup>GxLPxxLxx

Abb. 13: Vergleich der Aminosäuresequenzen der 21 vollständigen LRR Motive des *Kin5* Gens. Der Vergleich wurde mit dem Programm *PileUp* des GCG-Programmpakets erstellt und von Hand korrigiert. Die dargestellte Konsensussequenz basiert auf mindestens 50% Identität innerhalb der jeweiligen Positionen.

### Die paarigen Cysteinreste

Ein weiteres konserviertes Motiv charakteristisch für pflanzliche LRR- Rezeptorkinasen sind die vor bzw. hinter der LRR Domäne lokalisierten, paarigen Cysteinreste. Funktional wird ihnen eine Beteiligung an der Ausbildung räumlicher Proteinstrukturen zugesprochen, aufgrund ihrer Eigenschaft intra- bzw. intermolekulare Disulfid Brücken auszubilden zu können. Diese sind essentiell für die Faltung, Stabilität und Ausbildung tertiäre Strukturen von Proteinen.

Interessanterweise zeigen die aminoterminal gelegenen paarigen Cysteinreste innerhalb der Unterfamilien LRR II, III, VI, IX, X, XI, XII und XIII einen hohen Konservierungsgrad. Die Konsensussequenz der aminoterminal flankierenden, paarigen Cysteinreste innerhalb der genannten Unterfamilien konnte gemäß  $Cx_nWxGVt/sC$  bestimmt werden (Shiu und Bleeker, 2001).

Die *Kin5* Aminosäuresequenz der aminoterminal gelegenen Cysteinreste lautet CAFTGVTC und zeigt mit Ausnahme des dritten Aminosäurerestes Phenylalanin eine strikte Übereinstimmung mit der von Shiu und Bleeker bestimmten Konsensussequenz.

Die abgeleitete *CLVI* Aminosäuresequenz der aminoterminal gelegenen Cysteinreste lautet CSFSGVSC und zeigt somit interessanterweise die gleiche Aminosäuresubstitution abweichend von der Konsensussequenz, siehe auch Abbildung 10.

Die carboxyterminal flankierenden, paarigen Cysteinreste zeigen einen wesentlich geringeren Konservierungsgrad in pflanzlichen LRR- Rezeptorkinasen und folgen keiner speziellen Konsensussequenz (Diévert und Clark, 2003). Die *Kin5* bzw. *CLVI* Aminosäuresequenzen der carboxyterminal gelegenen Cysteinreste lauten CSAC bzw. CLPHRVSC, und zeigen somit eine geringe Übereinstimmung. Die Lage beider paarigen Cysteinreste ist jedoch konserviert und liegt in beiden Fällen 22 Aminosäurereste vor der Transmembrandomäne (Abb. 10).

### 3.4.2.2 Die intrazelluläre *Kin5* Domäne

Die intrazelluläre Domäne pflanzlicher LRR- Rezeptorkinasen, kann in drei Regionen unterteilt werden, in die Kinasedomäne, eine 5'flankierende membranständige Domäne und einen 3'flankierenden cytoplasmatischen Rest. Mit Ausnahme der zwei LRR- Rezeptorkinasen *AtSERK1* und *PRK1* repräsentieren alle bisher isolierten pflanzlichen LRR- Rezeptorkinasen Serinkinase-sequenzen (Becraft, 2002).

Serin/Threonin Rezeptorkinasen zeichnen sich durch einen hohen Grad an Konservierung innerhalb ihrer Kinasedomänen aus. Diese Kinasedomänen können in 12 Subdomänen, welche die katalytische Aktivität gewährleisten, unterteilt werden (Hanks und Quinn, 1991).

Anhand der Proteinfaltung kann die Serin/Threonin-Kinasedomäne in zwei Hauptdomänen, in die kleinere aminoterminal (Subdomänen I-VIb) und die größere carboxyterminalen Domäne (Subdomänen IX-XI) unterteilt werden, die durch einen sogenannten *activation loop* (Subdomänen VII und VIII) verknüpft sind.

Die aminoterminal Domäne besteht aus fünf  $\beta$ -Faltblättern (Subdomänen I-II) sowie eine  $\alpha$ -Helix (Subdomäne III). Ein *phosphate binding loop* (*p-loop*) verknüpft das zweite und dritte  $\beta$ -Faltblatt und folgt der konservierten Konsensussequenz GxGX $\alpha$ G (Subdomäne I). Die Bindung von ATP wird durch den *p-loop* vermittelt. Die katalytische Aktivität, also die Phosphorylierung von Serin- und/oder Threoninresten wird durch die Aminosäurefolge DxKxxN des *catalytic-loops* vermittelt (Subdomäne VIb), die carboxyterminal zur  $\alpha$ -Helix lokalisiert ist. Als Substrate dienen unter anderem die Serin- und Threoninreste innerhalb des *activation-loops*.

Die Phosphorylierung des *activation loops* bedingt eine Konformationsänderung, die den aktiven Zustand der Kinase beschreibt und anschließend die Transphosphorylierung von Substraten ermöglicht (Huse und Kuriyan, 2002).

In der abgeleiteten *Kin5* Aminosäuresequenz können alle 12 Subdomänen als hochkonserviert identifiziert werden. Darüber hinaus kann aufgrund der Aminosäurefolgen HRDVKSNN innerhalb der Subdomäne VIb und GSYGYIAPEY innerhalb der Subdomäne VIII eine Serin-/Threonin spezifische Kinaseaktivität vermutet werden (Abb. 10) (Hanks und Quinn, 1991).

Die membranständige Domäne sowie der cytoplasmatische Rest zeigen einen geringen Konservierungsgrad innerhalb der pflanzlichen LRR- Rezeptorkinasen (Diévert und Clark, 2003). Der Vergleich der *Kin5* und *CLV1* Aminosäuresequenzen bestätigt den geringen Grad an Sequenzübereinstimmung innerhalb dieser Domänen. Abschließend kann festgehalten werden, dass *Kin5* alle wesentlichen Domänen und Motive einer pflanzlichen LRR- Rezeptorkinase repräsentiert. Die auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenz der zuvor isolierten Teilsequenzen bestehende Sequenzverwandtschaft zwischen *Kin5* und *CLV1* konnte durch Vergleich der Vollängensequenzen aufrechterhalten werden.

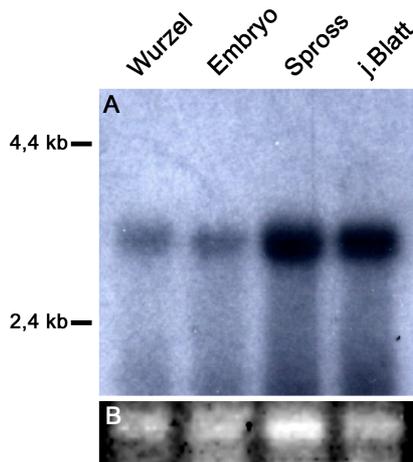
### 3.5 Expressionsanalysen von *Kin5*

Neben der phylogenetischen Analyse basierend auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen, stellt die Analyse der Expressionsmuster zweier vermutlich nahverwandter Gene ein weiteres, wesentliches Kriterium hinsichtlich der Bestimmung analoger biologischer Funktionen dar.

Das Genexpressionsprofil von *Kin5* wurde gewebespezifisch mittels *Northern*- und *Real time* RT-PCR-Analysen erstellt. Um das Expressionsmuster auf zellulärer Ebene aufzulösen, sind *in situ* Hybridisierungen durchgeführt worden. Die Verwendung des gering konservierten carboxy-terminalen Bereiches der Kinasedomäne inklusive weiterer 3'UTR Sequenzen als Sondenfragment in *Northern*-Analysen, bzw. als Matrize für die RNA-Polymerasen, sollte das Ausmaß an Kreuzhybridisierung minimieren, das bei Expressionsanalysen einzelner Mitglieder größerer Genfamilien zu unspezifischen Signalen führen kann.

#### 3.5.1 *Northern*-Analyse

Die *Northern*-Analyse wurde mit poly(A)<sup>+</sup>RNA durchgeführt. Jeweils 10 µg poly(A)<sup>+</sup>RNA, isoliert aus den Geweben Wurzel, Embryo, vegetativer Spross und jungen Blättern, wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Nylonmembran transferiert. Das als Sonde eingesetzte DNA-Fragment ist zuvor mittels PCR aus dem *Kin5* cDNA Klon amplifiziert worden. Es wurden Primer verwendet, denen am jeweiligen 5'-Ende eine Schnittstelle eingeführt wurde. Nach Restriktion des Amplifikationsproduktes konnte dieses direktional in den Vektor pBluescript II KS (+/-) kloniert werden. Die verwendete *Kin5* DNA-Sonde repräsentiert die 3' gelegenen 480 bp der codierenden Sequenz sowie weitere 170bp des 3' nicht translatierten Bereiches (3'UTR). Die Membran wurde unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen (2.2.12). Abbildung 14 zeigt das erhaltene Autoradiogramm.



**Abb. 14: *Kin5* Northern-Analyse:** A: Autoradiogramm der *Northern*-Analysen, durchgeführt mit poly(A)<sup>+</sup>RNA aus unterschiedlichen Geweben, nach Hybridisierung mit einer *Kin5* spezifischen Sonde. Die Herkunft der poly(A)<sup>+</sup>-RNA ist oberhalb der einzelnen Spuren angegeben. Links neben dem Autoradiogramm sind die Längen der kb-Leiter angegeben. B: Als Ladekontrolle dargestelltes Foto des mit Ethidiumbromid gefärbten *Northern*-Gels vor dem Transfer auf Nylonmembran.

Die Größe des *Kin5* Transkripts beträgt in etwa 3,2 KB. Die *Kin5* Expression kann in unterschiedlichen Intensitäten innerhalb der einzelnen Gewebe detektiert werden, schwache Expression zeigt sich in den Geweben Wurzel und Embryo, starke in den Gewebetypen Spross und junges Blatt.

Der Nachweis von *Kin5* Expression in den Geweben Wurzel und junges Blatt war insofern erstaunlich, als dass diese Gewebe keine meristematischen Zellen des sprossapikalen- oder Blütenmeristems tragen. Den veröffentlichten *CLV1* Expressionsdaten folgend, sollte unter der Prämisse, dass *CLV1* und *KIN5* die gleichen Funktionen ausüben, *Kin5* Expression exklusiv in solchen Geweben nachweisbar sein, die Zellen des sprossapikalen-, Infloreszenz- bzw. Blütenmeristems beinhalten.

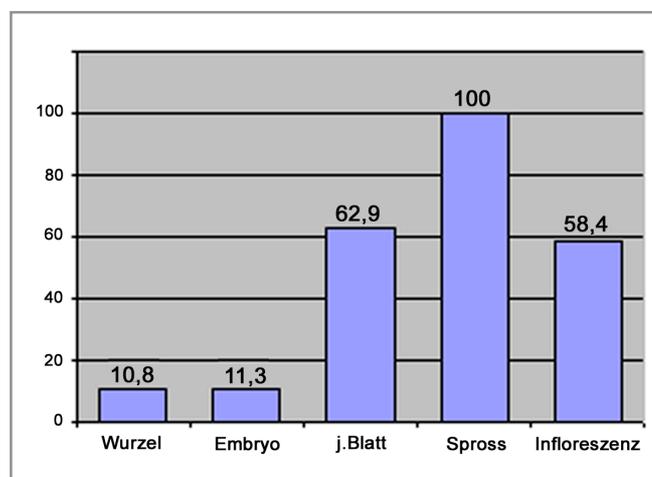
Es muss jedoch daraufhin gewiesen werden, dass keine publizierten *CLV1* *Northern*-Analysen vorliegen. Die publizierten *CLV1* Expressionsdaten basieren einzig auf <sup>35</sup>S-markierten *in situ* Hybridisierungen.

### 3.5.2 Real time RT-PCR

Um eine genauere Aussage über die jeweilige Stärke der *Kin5* Expression in den unterschiedlichen Gewebetypen treffen zu können, sind zusätzlich *Real time* RT-PCR Analysen durchgeführt worden. Diese Analysen sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Westhoff an der H. Heine Universität Düsseldorf durchgeführt worden

*Kin5* spezifische cDNA Fragmente sollten durch die Verwendung der Primer 5-SEQ-2923 und PB-gen-3end amplifiziert werden, die innerhalb des *Kin5* 3'UTRs binden. Ubiquitin spezifische cDNA Fragmente sollten durch die Verwendung der Primer UBI-Fo und UBI-Re amplifiziert werden. Die *on-line* Erfassung der Amplifikationsraten wurde durch den Einsatz des SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix in einem GeneAmp<sup>®</sup> 5700 *Light Cyclers* ermöglicht. Auf Basis der Ubiquitin Amplifikationsprofile wurden die unterschiedlichen cDNA Synthesen normiert.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, konnte in allen gewebespezifischen cDNA Synthesen *Kin5* Expression detektiert werden. Es wurden jeweils drei gewebespezifische *Real time* RT-PCR Reaktionen parallel durchgeführt. Die unterschiedlichen Quantitäten der gewebespezifischen Amplifikationsprodukte reflektieren in erster Näherung die in den *Northern*-Analysen abgeleiteten Transkriptmengen. Das *Kin5* Expressionsprofil lässt zusammenfassend wie folgt darstellen: Die stärkste Expression kann im vegetativen Spross nachgewiesen werden. In weiblichen Infloreszenzen können relativ zur Expression im vegetativen Spross 58,4%, in jungen Blättern 62,9%, im Wurzelgewebe 10,8% und in Embryonen des vierten Laubblattstadiums 12% *Kin5* Expression nachgewiesen werden.



**Abb. 15: Darstellung des *Kin5* Expressionsintensitäten in den unterschiedlichen analysierten Geweben.** Die angegebenen Werte in den unterschiedlichen Geweben zeigen relative Expressionsniveaus in Bezug auf die stärkste gemessene *Kin5* Expression im veg. Sprossgewebe (=100%) an. Es kann festgehalten werden, dass *Kin5* in allen untersuchten Gewebearten unterschiedlich stark exprimiert ist.

### 3.5.3 *Kin5* zeigt ein spezifisches Expressionsmuster innerhalb der Blütenstände

Für die genaue zelluläre Lokalisation der *Kin5* mRNA wurden verschiedene Entwicklungsstadien vom Embryo und Keimling bis zu den Blütenständen ausdifferenzierter Pflanzen mittels der *in situ* Hybridisierung untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Gewebetypen nach der Fixierung in Paraffin eingebettet und die angefertigten Schnitte mit den jeweiligen einzelsträngigen *antisense* Digoxigenin-markierten RNA Sonden inkubiert. Das Hauptaugenmerk galt dabei dem embryonal angelegten Sprossapikalmeristem (SAM), dem vegetativen SAM, den vegetativ angelegten Achselmeristemen, sowie nach Übergang in die reproduktive Phase dem Infloreszenzmeristem und seiner Derivate, der Annahme folgend, dass *CLV1*-ähnliche Gene spezifisch in den oberirdisch angelegten Meristemen exprimiert sind.

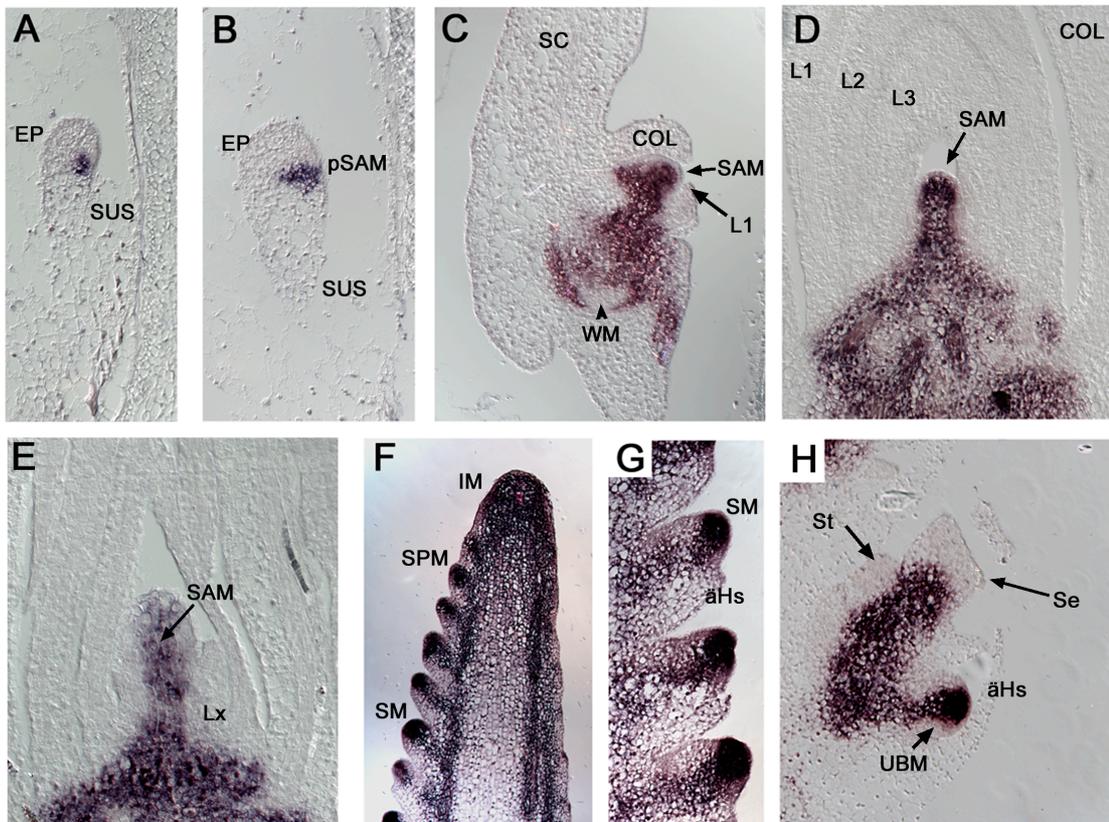
Für die embryonale Expressionsanalyse wurde auf folgende Stadien zurückgegriffen: frühes und spätes Transitionsstadium, Laubblattstadium 1, Laubblattstadium 3-5 (Einteilung der Stadien nach Abbe und Stein, 1954).

Um Expression während der vegetativen Entwicklung nachzuweisen, wurden 3cm lange Keimlinge oberhalb des Scutellarknotens abgeschnitten und eingebettet. Nach Übergang in die reproduktive Phase sind männliche und weibliche Blütenstände zu unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung von den umgebenden Hüllblättern freipräpariert und eingebettet worden.

Als positive Kontrolle wurde in den *in situ* Hybridisierungsexperimenten parallel *knotted1 (kn1)* einzelsträngige *antisense* Digoxigenin-markierte RNA Sonde eingesetzt. Als Matrize für die RNA-Polymerase wurde die gesamte 1,6 kb *kn1* cDNA eingesetzt.

*Kn1* codiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur Klasse der Homeobox-Transkriptionsfaktoren zählt (Vollbrecht et al., 1991). Die in dieser Arbeit erstellten *kn1* Expressionsmuster embryonaler, vegetativer und regenerativer Stadien, stimmten mit den bereits publizierten Mustern überein (Jackson et al., 1994), und sind zusammenfassend in Abbildung 16 dargestellt.

Es bleibt festzuhalten, dass *kn1* Expression präferentiell in Zellen sämtlicher meristematischer Gewebe detektierbar ist. Auch in Zellen des vaskulären Gewebes ist *kn1* Expression detektierbar. In embryonalen und vegetativen Blattprimordien ist jedoch keine *kn1* Expression nachweisbar. Auch die von den Blütenmeristemen angelegten, unterschiedlichen Organprimordien sind frei von *kn1* Expression. Eine genauere Beschreibung des Expressionsmusters kann der Legende von Abbildung 16 entnommen werden.



**Abb. 16: Detektion des *kn1* Transkripts in unterschiedlichen Geweben.** Das *kn1* Transkript kann hauptsächlich in meristematischen und vaskulären Geweben detektiert werden. **A:** Im frühen embryonalen Transitionsstadium kann erstmalig *kn1* Expression in einigen wenigen Zellen innerhalb des Embryo Propers detektiert werden. Diese Zellen repräsentieren das prospektive SAM. **B:** Im späten embryonalen Transitionsstadium ist eine Vergrößerung der *kn1* Expressionsdomäne innerhalb des Embryo Propers detekierbar. **C:** Im embryonalen L1-Stadium zeigt sich starke *kn1* Expression innerhalb des nun elaborierten SAMs. Darüber hinaus kann *kn1* Expression entlang der embryonalen Achse detektiert werden. Das Wurzelmeristem ist jedoch frei von *kn1* Expression. **D:** Im embryonalen L3-Stadium bleibt das *kn1* Transkript weiterhin innerhalb des SAMs nachweisbar. Die initiierten Organprimordien sind jedoch frei von *kn1* Transkript. Auch in der L1-Schicht des SAMs ist kein *kn1* Transkript nachzuweisen. **E:** Im SAM des vegetativen Keimlings ist die meristematische Expression von *kn1* weiterhin nachweisbar. Auch in der vegetativen Phase ist die L1 frei von *kn1* Expression. **F:** Spitze einer weiblichen Infloreszenz, die starke *kn1* Expression innerhalb des Infloreszenzmeristems, der spikelet pair- und *spikelet* Meristeme reflektiert. **G:** *Spikelet* Meristeme des Stadiums A zeigen starke *kn1* Expression, die abaxial initiierten äußeren Hüllspelzen zeigen keine *kn1* Expression. **H:** In weiblichen Blüten des Stadiums I kann innerhalb des unteren Blütenmeristems *kn1* Transkript nachgewiesen werden. Die von dem oberen Blütenmeristem angelegten Staubblatt- und Seidenprimordien sind frei von *kn1* Expression. (Einteilung der Blütenentwicklungsstadien nach Cheng et al., 1983)

**Abkürzungen:** EP: Embryo Proper; SUS: Suspensor; SC: Scutellum; COL: Koleoptile; WM: Wurzelmeristem; SAM: sprossapikales Meristem; pSAM: prospektives sprossapikales Meristem; L1-3: Laubblatt 1-3; Lx: jüngstes ausgewachsenes Laubblatt; IM: Infloreszenzmeristem; SPM: *spikelet pair* Meristem; SM: *spikelet* Meristem; UBM: Unteres Blütenmeristem; äHS: äußere Hüllspelze; St: Staubblattprimodium; Se: Seidenprimodium

Parallel zu den *kn1 in situ* Hybridisierungen sind *Kin5 in situ* Hybridisierungen durchgeführt worden. Als Matrize für die RNA-Polymerase wurde das *Kin5* cDNA Fragment verwendet, das die carboxyterminal gelegenen 480 bp der codierenden Sequenz sowie die 170bp des 3'UTR repräsentiert. Die *Kin5* Expressionsmuster sind zusammenfassend in Abbildung 17 dargestellt.

*Kin5* Expression konnte in den weiblichen und männlichen Blütenständen nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 17A und D dargestellt, sind die jeweiligen Infloreszenzmeristeme frei von detektierbarer *Kin5* Expression. In den lateral angelegten *spikelet pair* Meristemen kann starke Expression nachgewiesen werden, wobei sich die Expression auf die adaxiale Hälfte also die dem Infloreszenzmeristem zugewandte Seite des *spikelet pair* Meristems beschränkt. In diesem Entwicklungsstadium kann also ein meristemspezifisches *Kin5* Expressionsmuster nachgewiesen werden. In den einzelnen *spikelet pair* Meristeme kann die Expression auch in Zellen der L1-Schicht gezeigt werden (Abb. 17A).

Auch in den einzelnen *spikelet* Meristemen ist starke *Kin5* Expression detektierbar. Das in Abbildung 17 B dargestellte SM des Stadiums G (Einteilung der Entwicklungsstadien gemäß Cheng et al., 1983) einer weiblichen Blüte zeigt neben einer spezifischen Expression innerhalb des eigentlichen Meristems auch *Kin5* Expression in den sich entwickelnden inneren und äußeren Hüllspelzen, des äußeren Lemmas sowie in den Primordien der Staubblätter und im Gynöceum.

Das in Abbildung 17 E dargestellte SM einer männlichen Blüte des Stadiums F zeigt auch eine spezifische Expression innerhalb des Meristems, wobei die Expression stärker in der abaxialen Hälfte des SMs nachweisbar ist. Womöglich liegt die Schnittebene etwas außerhalb der zentralen Zone des SM. Auch in diesem Stadium lässt sich *Kin5* Expression in den sich entwickelnden Primordien nachweisen. So zeigt sich beispielsweise schwache *Kin5* Expression in den sich entwickelnden äußeren Hüllspelze.

Nach der Separation in oberes- und unteres Blütenmeristem kann starke *Kin5* Expression in den angelegten Organprimordien des oberen Blütenmeristems nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für die weibliche als auch für die männliche Blüte (Abb. 17 C und F).

Wie in Abbildung 17 C dargestellt, kann im Stadium H einer weiblichen Blüte *Kin5* Expression in den noch nicht abortierten Staubblattprimordien, den Primordien der Seide sowie innerhalb des Gynöceums nachgewiesen werden. Darüber hinaus findet sich starke *Kin5* Expression im unteren Blütenmeristem, das in der weiblichen Blüte später abortiert wird. Das *Kin5* Expressionsmuster in einer männlichen Blüte eines vergleichbaren Stadiums ist in Abbildung 17 F dargestellt. Auch in diesem Stadium wird *Kin5* in den Staubblattprimordien und im Gynöceum sowie in dem sich entwickelnden unteren Blütenmeristem exprimiert.

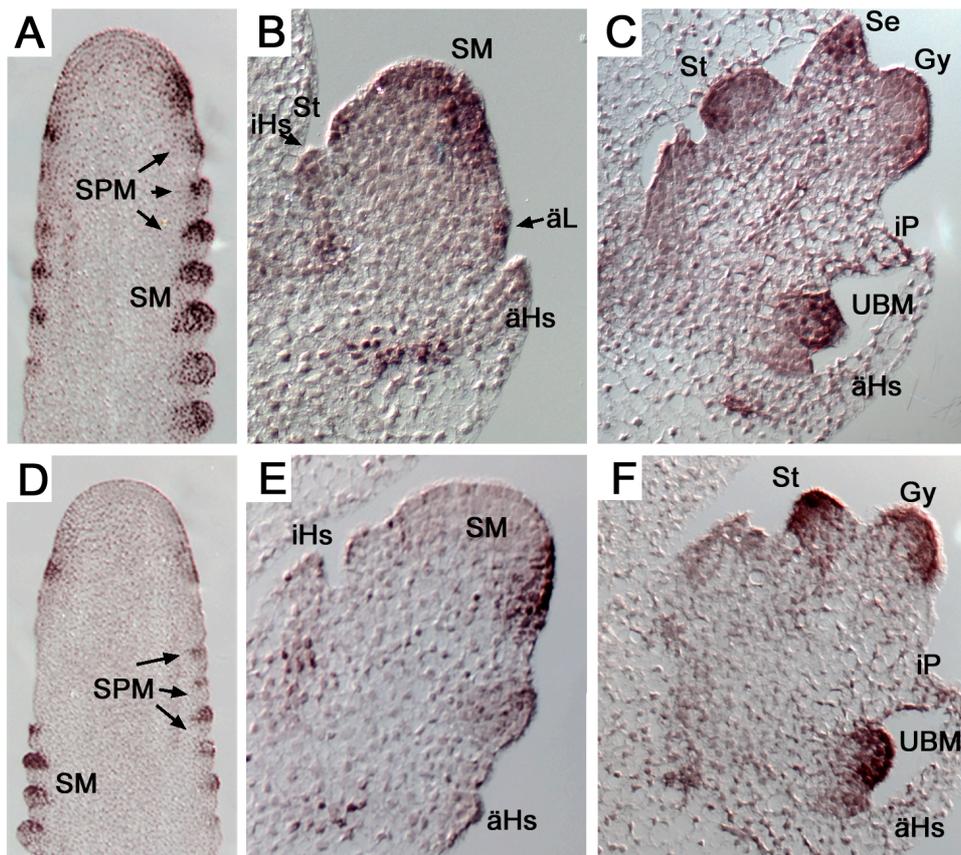
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *Kin5* in der Blütenentwicklung in *spikelet pair*- und *spikelet* Meristemen, den oberen und unteren Blütenmeristemen, sowie in den einzelnen Organprimordien exprimiert ist. Das Infloreszenzmeristem selbst ist jedoch frei von nachweisbarer *Kin5* Expression.

Die in den zuvor durchgeführten *Real time* RT-PCR- und *Northern*-Analysen gezeigte schwache *Kin5* Expression innerhalb embryonalen Gewebes, konnte anhand von *in situ* Hybridisierungen auf zellulärer Ebene nicht aufgelöst werden. Entweder liegt die Stärke der *Kin5* Expression unterhalb der Nachweisgrenze oder *Kin5* wird schwach ubiquitär exprimiert.

Gleiches gilt für die Expression innerhalb des Sprosses, wobei in diesem Falle die zuvor durchgeführten *Real time* RT-PCR- und *Northern*-Analysen eine starke *Kin5* Expression zeigten. Als

mögliche Ursache hierfür kann auch hier ein zellulär schwach ubiquitär exprimiertes Signal genannt werden.

Erneut zeigt sich, dass die erstellten, in diesem Falle zellulären *Kin5* Expressionsmuster nur partiell mit den veröffentlichten *CLVI* Expressionsmustern übereinstimmen. *Kin5* wird innerhalb der Blütenentwicklung nicht ausschließlich in meristematischen Regionen, sondern auch in den von den unterschiedlichen Blütenmeristemen angelegten Organprimordien exprimiert.



**Abb. 17: Nachweis des *Kin5* Transkripts in unterschiedlichen Geweben.** Das *Kin5* Transkript kann sowohl in den unterschiedlichen Meristemtypen als auch in den sich entwickelnden Primordien der unterschiedlichen Blütenorgane nachgewiesen werden. **A:** Spitze einer weiblichen Blüte. **B:** Weibliches *spikelet* Meristem des Stadiums F. **C:** Stadium H einer weiblichen Blüte. **D:** Spitze einer männlichen Blüte. **E:** Männliches *spikelet* Meristem des Stadiums E. **F:** Stadium H einer männliche Blüte; (Einteilung der Entwicklungsstadien gemäß Cheng et al., 1983).

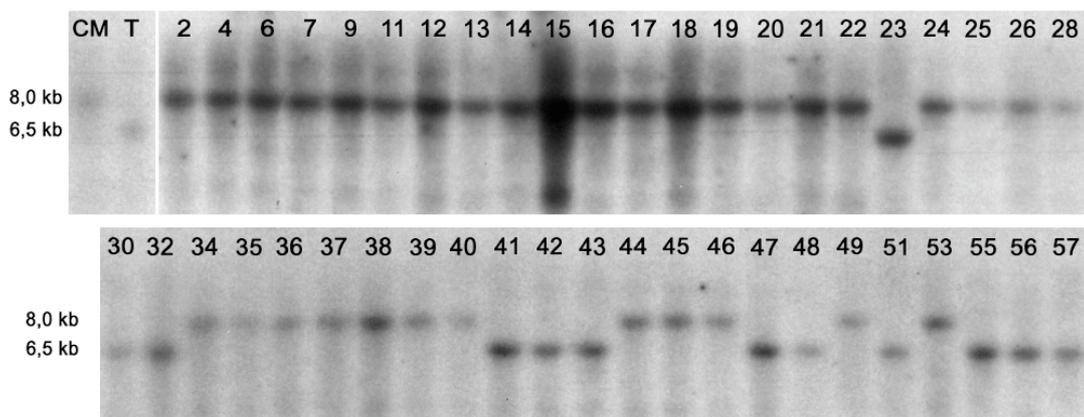
**Abkürzungen:** IM: Infloreszenzmeristem; SPM: *spikelet pair* Meristem; SM: *spikelet* Meristem; UBM: unteres Blütenmeristem; äHs: äußere Hüllspelze; iHs: innere Hüllspelze; iP: innere Palea; St: Staubblattprimodium; Si: Seidenprimodium; Gy: Gynöceum

### 3.6 *Kin5* kartiert auf Chromosom 5s in unmittelbarer Nähe zur Mutation *td1*

Die Zuordnung des *Kin5* Gens zu einem bestimmten chromosomalen Abschnitt des Maisgenoms sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Korrelation zwischen chromosomaler Lokalisation des *Kin5* Gens und einer bereits kartierten und charakterisierten Mutation erstellt werden kann. Im Falle von übereinstimmenden bzw. eng benachbarten Kartierungsdaten, sollten dann ausgehend vom Phänotyp der bereits kartierten Mutation Rückschlüsse auf die Funktion des *Kin5* Gens geschlossen werden können.

Die Kartierung der *Kin5* Sequenz wurde über Polymorphismen innerhalb von Inzuchtlinien ermöglicht. Verwendet wurde die Inzuchtlinie CM37 x T232 (Burr & Burr, 1991).

Um einen gut unterscheidbaren RLFP zu identifizieren, wurde zunächst ein *Southern*-Filter, auf dem die mit mehreren Restriktionsendonucleasen geschnittene, genomische DNA der CM37 X T232 Parentalgeneration transferiert worden war, mit einer *Kin5* spezifischen Sonde hybridisiert. Die Auswertung des Autoradiogramms ergab einen gut unterscheidbaren RFLP nach BamH1 Verdau: ein ca. 8,0 kb großes Fragment für den CM37 und ein ca. 6,5 kb großes Fragment für den T232-Elternstamm. Anschließend wurden zwei weitere *Southern*-Filter, auf denen die genomische, BamH1 geschnittene DNA der 45 F1-Individuen, der Kreuzung CM37 X T232, transferiert worden war, mit dem gleichen *Kin5* Fragment hybridisiert (Abb. 18).



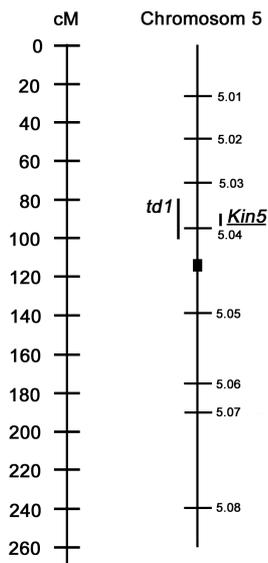
**Abb. 18:** Autoradiogramme der *Southern*-Analysen mit DNA der Inzuchtlinien CM37 x T232. Nach Hybridisierung mit *Kin5* spezifischen Sonden konnten innerhalb der Parentalgeneration ein ~8,0kb hybridisierendes Fragment für den CM- und ein ~6,5kb hybridisierendes Fragment für den T232 Elternstamm identifiziert werden, deren Segregation in 45 F1-Individuen analysiert wurde.

Die anschließende computergestützte Segregationsanalyse der Restriktionsfragmente der 45 F1-Individuen ergab eine Zuordnung auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 (5s), zwischen den Markern *uaz77* und *bnl10.06* (Abb.19). Eine exaktere Lokalisation war aufgrund der vorliegenden F1 Segregationsdaten nicht möglich, da innerhalb dieses Bereiches wahrscheinlich ein *double-crossover* Ereignis stattgefunden hat (B. Burr, persönliche Mitteilung).

Die chromosomale Lokalisation von *Kin5* auf Chromosom 5s war ein interessanter Befund, weil auf dem gleichen Abschnitt des Maisgenoms die Mutation *thick tassel dwarf1 (td1)* kartiert (Abb.19). Charakteristisch für die Mutation *td1* sind neben reduziertem Längenwachstum des männlichen Blütenstandes eine starke Fasziation der weiblichen Infloreszenz. Dieser Phänotyp konnte auch in Infloreszenzen von *clv1* Mutanten beobachten werden (Clark et al., 1993). In Kapitel 3.10 wird der *thick tassel dwarf1* Phänotyp vorgestellt.

In nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob *td1*-mutante Pflanzen tatsächlich einen Defekt im *Kin5* Gen aufweisen.

**BNL 2002 5**



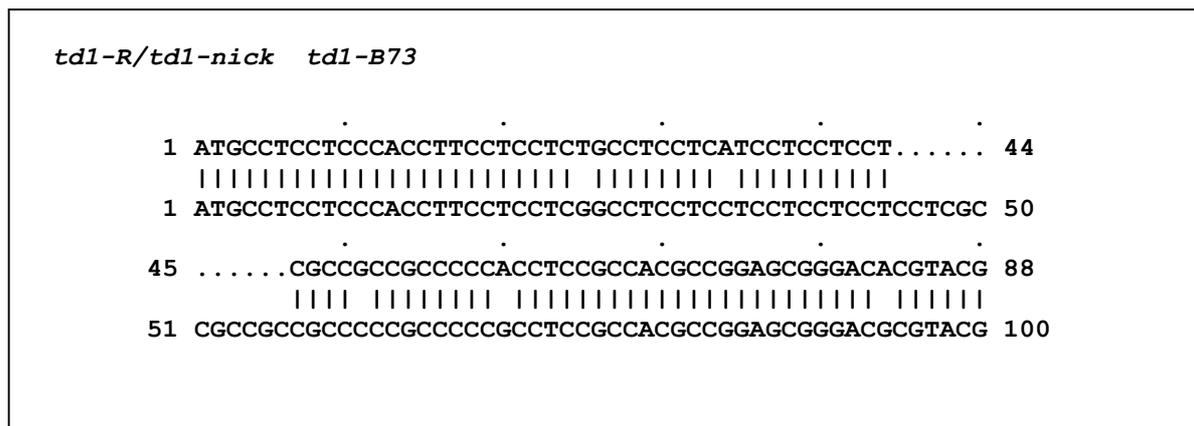
**Abb. 19: Schematische Darstellung des fünften Maischromosoms.** Die Darstellung basiert auf der BNL 2002 5 Karte des *Brookhaven National Laboratory* (<http://burr.bio.bnl.gov/acemaz.html>). Der Abbildung können die Kartierungspositionen der *td1* Mutation, sowie die des *Kin5* Gens entnommen werden. Die Kartierungsposition der *td1* Mutation wurde von Neuffer et. al. (1997) entnommen. Die schwarze Box zeigt die Lage des Centromers.

### 3.7 Die *td1*-„stock-center“ Allele tragen identische Mutationen

Um zu klären, ob *td1* Allele Mutationen im *Kin5* Gen darstellen, wurde das *Kin5* Gen in *td1*-mutanten Hintergründen isoliert. Dazu wurde Saatgut zweier *td1* Allele, *td1-reference* (*td1-R*) und *td1-nickerson* (*td1-nick*), über das *Maize stock center* (<http://www.ag.uiuc.edu/maize-coop>) bezogen. Da die Herkunft beider Allele unbekannt ist (M. Sachs, persönliche Mitteilung), können keine Aussagen bzgl. der Generation bzw. der molekularen Natur dieser Allele getroffen werden.

Beide *td1* Allele wurden im Gewächshaus propagiert. Nach Zuordnung der Phänotypen wurde genomische DNA von wildtypischen sowie *td1*-mutanten Pflanzen isoliert. Insgesamt wurde genomische DNA von zehn Pflanzen isoliert. Unter Verwendung der Primer *Kin5-56-12* und *PB-gen-3end* sind 3362 kb der genomischen *Kin5* Sequenz amplifiziert worden, die das gesamte offene Leseraster beinhalten, sowie 198 bp *upstream* des Startkodons und 90 bp der *downstream* des Stopkodons liegenden *Kin5*-Sequenzen.

Die amplifizierten DNA Fragmente wurden anschließend in den Vektor pCR<sup>2.1</sup>-TOPO<sup>2</sup> kloniert. Nach Sequenzierung der jeweiligen genomischen Fragmente konnten sowohl für das *td1-R* Allel als auch für das *td1-nick* Allel eine identische Deletion von 15 Basenpaaren sowie vier identische Basensubstitutionen innerhalb der 5' gelegenen Signalsequenz nachgewiesen werden. Ein DNA Sequenzvergleich zwischen der wildtypischen *Kin5* Sequenz im B73 Hintergrund mit der mutierten *td1-R* bzw. *td1-nick* Sequenz ist in Abbildung 20 dargestellt und zeigt die Deletion von 15 Basenpaaren an Position +44. Die Substitutionen erfolgten an den Positionen +25 (G → T), +34 (C → A), +61 (C → G) und +70 (G → A), weiterhin konnte außerhalb der vorhergesagten aminoterminalen Signalpeptidsequenz eine fünfte Basenpaarsubstitution an Position +94 (G → A) identifiziert werden. Im Folgenden wird sich nur noch auf das *td1-R* Allel bezogen.



**Abb. 20: Aminoterminaler DNA-Sequenzvergleich des *td1-R* Allels mit der wildtypischen B73 Sequenz.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *BestFit* des GCG-Programmpakets erstellt. Die untere Sequenz repräsentiert die wildtypische B73 DNA-Sequenz. Innerhalb der aminoterminalen *td1-R* Sequenz können 5 Basenpaarsubstitutionen sowie eine Deletion von 15 Basenpaaren identifiziert werden.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des B73 Allels mit der des *td1-R* Allels zeigt im Bereich der aminoterminal gelegenen Signalsequenz die Substitution von insgesamt vier Aminosäureresten, sowie eine Deletion von zwei Leucinresten und drei Alaninresten innerhalb der hydrophoben Kernsequenz (Abb. 21). Die Aminosäuresubstitutionen befinden sich an den Positionen 8 (G → C), 11 (L → I), 20 (P → A) und 23 (A → T).

```

B73      1  MPPPTFLLGLLLLLLLLAAAAPAPASATPER 30
td1-R    1  MPPPTFLLCLLILL...AAAPT SATPER 25
    
```

**Abb. 21: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der aminoterminalen *td1-R*- bzw. wildtypischen B73 DNA-Sequenzen.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *PileUp* des GCG-Programmpakets erstellt. Innerhalb der abgeleiteten *td1-R* Aminosäuresequenz kann die Deletion von zwei Leucinresten und von drei Alaninresten innerhalb der hydrophoben Kernsequenz identifiziert werden. Darüber hinaus können die im Text beschriebenen Aminosäuresubstitutionen identifiziert werden.

Die Sekretionswahrscheinlichkeit der aminoterminalen *td1-R* Signalsequenz wurde mit dem Programm *TargetP V1.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Im Gegensatz zur wildtypischen Signalsequenz (0,932) ist die Sekretionswahrscheinlichkeit der *td1-R* Signalsequenz, die mit 0,650 bestimmt worden, ist deutlich reduziert (Abb. 22).

```

TargetP V1.0 Prediction Results

### ### ###  T A R G E T P  1.0  prediction results  ### ### ###

# Number of input sequences:  2
# Cleavage site predictions excluded.
# Using PLANT networks.

# -----
#           Name      Length      cTP    mTP    SP  other  Loc.  RC
# -----
#           Wt-B73    73          0.039  0.032  0.932  0.008   S     1
# -----

#           Name      Length      cTP    mTP    SP  other  Loc.  RC
# -----
#           td1-R     68          0.253  0.085  0.650  0.016   S     4
# -----
    
```

**Abb. 22: Darstellung der mit dem Programm *TargetP V1.0* berechneten Eigenschaften der *td1-R*- bzw. wildtypischen B73-Signalsequenzen.** Die errechneten Wahrscheinlichkeitswerte für die Sekretion des Proteins zeigen einen signifikant verringerten Wert bei Verwendung der *td1-R* Signalsequenz, (0,650 zum Wildtypwert von 0,932), demzufolge wurde die Sequenz in die Wahrscheinlichkeitsklasse RC4 eingestuft.

Um zu analysieren, inwieweit die Deletion bzw. die Substitutionen der jeweiligen Aminosäuren unterschiedliche Effekte auf die Berechnung der Sekretionswahrscheinlichkeiten ausüben, wurden Signalsequenzen analysiert, die entweder die fünf Aminosäuren umfassende Deletion oder die vier Aminosäuresubstitutionen besaßen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die alleinige Existenz der Deletion innerhalb der hydrophoben Kernsequenz den gleichen verringernden Effekt ausübt, wie in der ursprünglich analysierten *td1-R* Signalsequenz. Wohingegen die Existenz der vier Aminosäuresubstitutionen allein keinen wesentlichen Einfluss auf die Sekretionswahrscheinlichkeit der aminoterminalen Signalsequenz auszuüben scheint (Abb.23).

```

TargetP V1.0 Prediction Results

### ### ### T A R G E T P 1.0 prediction results ### ### ###

# Number of input sequences: 2
# Cleavage site predictions excluded.
# Using PLANT networks.

#
#-----
#           Name      Length      cTP   mTP   SP   other   Loc.  RC
#-----
#           Deletion   68         0.391 0.226 0.231 0.055   C     5
#-----

#
#-----
#           Name      Length      cTP   mTP   SP   other   Loc.  RC
#-----
#           Substitution 73         0.014 0.020 0.979 0.008   S     1
#-----
    
```

**Abb. 23:** Darstellung der mit dem Programm *TargetP V1.0* berechneten Sekretionswahrscheinlichkeiten der Signalsequenzen, die ausschließlich die Deletion oder die Substitutionen repräsentieren. Die errechneten Sekretionswahrscheinlichkeiten zeigen einen signifikant verringerten Wert bei Verwendung der Signalsequenz, die ausschließlich die Deletion trägt (0,231 zum Wildtypwert von 0,932), demzufolge wurde die Sequenz in die Wahrscheinlichkeitsklasse RC5 eingestuft. Die Analyse der Signalsequenz, die ausschließlich die Substitutionen trägt, zeigt geringfügige Abweichungen von der wildtypischen Signalsequenz in Bezug auf die errechneten Sekretionswahrscheinlichkeiten.

### 3.8 Identifizierung von *Mutator* induzierten *Kin5* Mutationen

In Kooperation mit Mark P. Running (Danforth Plant Science Center), Erik Vollbrecht (Cold Spring Harbor Laboratory) und Sarah Hake (USDA Plant Gene Expression Center) wurden mehrere, mutmaßlich *Mutator* (*Mu*) induzierte *tdl* Allele analysiert, die zuvor in sogenannten *targeted Mu-screens* isoliert worden waren.

In diesen *targeted Mu-screens* wurden homozygote *tdl-R* Allele in aktive *Mutator* (*Mu*)-Linien eingekreuzt. Das Kreuzungsschema lässt sich demnach wie folgt darstellen:

$+/+ \text{ Mu aktiv } \times \text{ } tdl\text{-}R / tdl\text{-}R$

Anschließend wurde die F1 Generation auf eventuell auftretende *tdl* Phänotypen untersucht. Falls existent, sollten diese den Genotyp *tdl-R* / *tdl-mu\** repräsentieren, wobei *tdl-mu\** das über dem *tdl-R* Allel neu detektierte, *Mu* induzierte *tdl* Allel darstellt.

Die Kreuzungen, sowie die phänotypischen Analysen sind in den vergangenen Jahren unter Anleitung der oben genannten Wissenschaftler in den USA durchgeführt worden.

In einem revers-genetischen Ansatz sollte nun analysiert werden, ob die neu isolierten *tdl-mu\** Allele *Mu*-Element Insertionen innerhalb des *Kin5* Gens darstellen. Hierzu wurde versucht mittels PCR unter Verwendung von *Kin5*- bzw. *Mu*-spezifischen Primern putative Insertionsereignisse zu detektieren.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 3 Linien untersucht, die ursprünglich auf in *targeted Mu-screens* identifizierten Einzelpflanzen zurückzuführen sind.

Die Linien SH5511 und SH5509 entstammen Auskreuzungen in den B73 Hintergrund, die nach folgendem Schema durchgeführt worden sind: *tdl-R* / *tdl-mu\**  $\times$  B73. Es standen jeweils vier genomische DNA Präparationen (SH5511-1/-4 bzw. SH5509-1/-4) einzelner F1 Individuen zur Verfügung. In einer zuvor in der Arbeitsgruppe von S. Hake durchgeführten *Southern*-Analyse unter Verwendung einer *tdl* spezifischen Sonde konnten RFLPs innerhalb der Pflanzen SH5511-2 bzw. SH5509-3 detektiert werden.

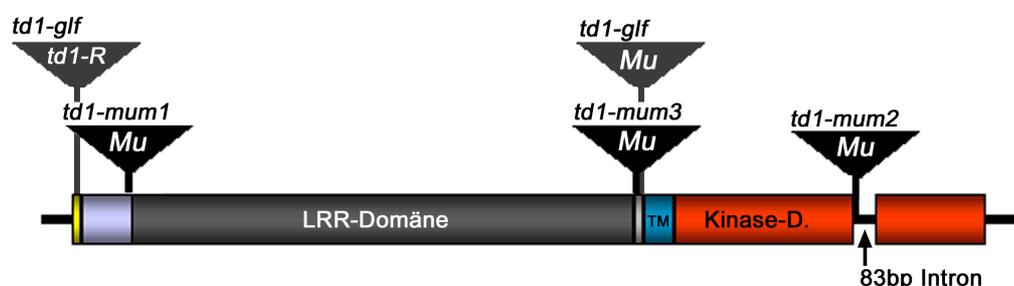
Unter Verwendung der *Kin5* spezifischen Primer 3-SEQ 3221, 3-SEQ 2551 und 3-SEQ 1503 jeweils in Kombination mit einem *Mu*-spezifischen Primer, sowie der genomischen DNA der Pflanze SH5511-2 als Matrize, konnten mittels PCR Amplifikationsprodukte korrespondierender Größen erzeugt werden. Nach anschließender Klonierung und Sequenzierung der PCR Produkte konnte eine *Mu* Insertion innerhalb des *Kin5* Gens an Position +233 detektiert werden. Dieses *tdl* Allel wurde der mittlerweile als gesichert geltenden Annahme folgend, dass *tdl* und *Kin5* identische Loci darstellen, *tdl-mum1* genannt (Abb. 24).

Die Verwendung der genomischen DNA der F1 Pflanzen SH5511-1, -3 und -4 als Matrize in parallel durchgeführten PCR Reaktionen führten zu keinen spezifischen Amplifikationen.

Unter Verwendung der *Kin5* spezifischen Primer 3-SEQ 3221 bzw. 3-SEQ 2936 jeweils in Kombination mit einem *Mu*-spezifischen Primer, sowie der genomischen DNA der Pflanze SH5509-2 konnten erneut Amplifikationsprodukte korrespondierender Größen erzeugt werden. Nach anschließender Klonierung und Sequenzierung dieser PCR Produkte konnte eine *Mu*-Element Insertion an Position +2653 detektiert werden. Dieses zweite *Mu*-Element induzierte *tdl* Allel wurde als *tdl-mum2* bezeichnet (Abb. 24).

Die PCR Analyse eines dritten putativen *td1* *Mu*-Allels, das in einem weiteren *targeted Mu-screen* im Rahmen des *Maize Gene Discovery Projects* identifiziert worden war, führte unter Verwendung der Primer 5-SEQ 533 bzw. 5-SEQ 1206 in Kombination mit einem *Mu*-spezifischen Primer zur Detektion einer weiteren *Mu*-Element Insertion innerhalb des *Kin5* Gens an Position +1856. Die analysierten DNA Proben MGD03-1600 -1, -2, -5 und -7 sind zuvor ebenfalls in der Arbeitsgruppe von S. Hake durch *Southern*-Analysen auf bestehende Polymorphismen charakterisiert worden. Diese Mutation wurde als *td1-mum3* bezeichnet (Abb. 24).

Da die Identifikation der *Mu*-Element Insertionen durch die Verwendung von *Mu*-Element spezifischen Primer erfolgte, die innerhalb der hochkonservierten *terminal inverted repeats* binden, konnte nicht bestimmt werden, welcher Typ *Mu*-Element innerhalb der jeweiligen *td1-mum*-Allele inserierte.



**Abb. 24: Schematische Darstellung der *td1-mum1-3* Allele und des *td1-glf* Allels.** Das *td1-mum1* Allel trägt eine *Mu*-Element Insertion an Position +233. Das *td1-mum2* Allel trägt eine *Mu*-Element Insertion an Position +2653. Innerhalb des *td1-mum3* Allels konnte eine *Mu*-Element Insertion an Position +1856 identifiziert werden. Das *td1-glf* Allel trägt neben der *td1-R* Mutation innerhalb der Signalsequenz eine *Mu*-Element Insertion an Position +1908. Die aminoternale Signalsequenz ist in gelb dargestellt. Die Transmembrandomäne (TM) ist in blau dargestellt. Die *Mu*-Elemente sind durch schwarze Dreiecke dargestellt. Die Defekte innerhalb der *td1-glf* Mutationen sind durch graue Dreiecke dargestellt.

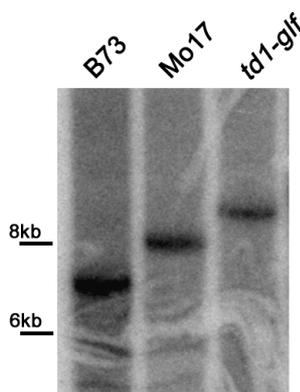
Ein weiteres *td1* Allel *td1-glf* ist ursprünglich von Steven Briggs (Pioneer Hi-Bred, Iowa) identifiziert worden und ist ebenfalls molekular noch nicht charakterisiert worden.

Der Versuch, die vollständige *Kin5* Sequenz durch Verwendung der Primer *Kin5-56-12* und *PB-gen-3* end aus DNA zu amplifizieren, die aus *td1-glf* homozygoten Pflanzen isoliert wurde, misslang. Auch nach Verwendung von Polymerasen die speziell für die Amplifikation langer genomischer Fragmente geeignet sind, konnten keine spezifischen Amplifikationen erzielt werden.

Der Annahme folgend, dass das *td1-glf* Allel womöglich auch eine *Mu*-Insertion trägt, konnten unter Verwendung der *Kin5* spezifischen Primer 5-SEQ 533, 5-SEQ 826 und 5-SEQ 1206 jeweils in Kombination mit einem *Mu*-spezifischen Primer, sowie der genomischen DNA einer *td1-glf* homozygoten Pflanze als Matrize mittels PCR Amplifikationsprodukte korrespondierender Größen

erzeugt werden. Nach Klonierung der unterschiedlichen Amplifikationsprodukte konnte eine *Mu*-Element Insertion an Position +1908 identifiziert werden. Des Weiteren konnte in *tdl-glf* Allelen die *tdl-R* Mutation innerhalb der aminoterminalen Signalsequenz nachgewiesen werden (Abb. 24).

Um sicherzustellen, dass die in den PCR als Matrize eingesetzte genomische DNA aus einer *tdl-glf* homozygoten Pflanze präpariert wurde, wurde eine *Southern*-Analyse durchgeführt. Unter Verwendung einer *Kin5* spezifischen Sonde konnte eine einzelne Bande innerhalb der *tdl-glf* Spur detektiert werden, die, im Vergleich zu den als Referenzen eingesetzten genomischen DNA Präparationen der genetischen Hintergründe B73 bzw. Mo17, nach BamHI Restriktion einen deutlich unterscheidbaren RFLP aufzeigte (Abb.25).



**Abb. 25: Autoradiogramm der *Southern* Analyse:** Genomische DNA von Wildtypen der genetischen Hintergründe B73 und Mo17 sowie von einer *tdl-glf* Mutante wurden mit einer *Kin5*-spezifischen Sonde hybridisiert. Das dargestellte Autoradiogramm zeigt die Existenz von jeweils einer einzelnen hybridisierenden Bande, was den homozygoten Genotyp der analysierten, mutanten *tdl-glf* Pflanze indiziert.

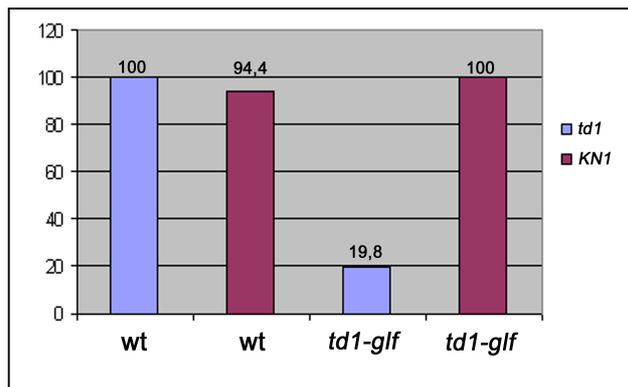
Weiterhin wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *Kin5*-56-12 und 3-SEQ-336 die aminoterminalen Signalsequenz im *tdl-glf* homozygoten Hintergrund amplifiziert. Anschließend wurde das PCR Produkt direkt als Matrize in einer Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Unter Verwendung des Primers 3-SEQ-140 konnte in der Sequenzierungsreaktion ausschließlich die aminoterminalen Deletion nachgewiesen werden, so dass von einem *tdl-glf* homozygoten Hintergrund ausgegangen werden musste. Daraus kann man schließen, dass das *tdl-glf* Allel letztlich eine *Mu*-Insertion innerhalb des *tdl-R* Allels darstellt (Abb.24).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die fünf in dieser Arbeit molekular charakterisierten unterschiedlichen *tdl* Allele, allesamt einen Defekt innerhalb des *Kin5* Gens tragen. Das *tdl-R* Allel repräsentiert eine zusammenhängende 15bp Deletion sowie die Substitution von vier Basenpaaren innerhalb der aminoterminalen Sequenz. Das *tdl-glf* Allel trägt neben der *tdl-R* Mutation zusätzlich eine *Mu*-Insertion innerhalb der extrazellulären Domäne. Darüber hinaus konnten in drei unabhängig voneinander generierten Linien die Existenz einer *Mu*-Element Insertion innerhalb des *Kin5* Gens identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Kin5* und *tdl* mit hoher Wahrscheinlichkeit identische Loci repräsentieren.

### 3.9 Expressionsanalysen im *td1-glf* Hintergrund

Um zu verifizieren, ob die identifizierte *Mu*-Element Insertion innerhalb des *td1-glf* Allels die Bildung eines funktionalen *td1*-Transkripts unterbindet, wurden erneut *Real time* RT-PCR Analysen durchgeführt.

*Td1* spezifische cDNA Fragmente sollten durch Verwendung der Primer 5-SEQ-2923 und PB-gen-3end amplifiziert werden. *Ubiquitin* spezifische cDNA Fragmente sollten durch die Verwendung der Primer UBI-Fo und UBI-Re amplifiziert werden. Darüber hinaus sollten durch Verwendung der *knotted1*-spezifischen Primer, KN1-Fo und KN1-Re, die Transkription von *knotted1* analysiert werden. Auf Basis der *Ubiquitin* Amplifikationsprofile wurden die unterschiedlichen cDNA Synthesen normiert. Diese Analysen wurden erneut in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Westhoff durchgeführt.



**Abb. 26: Graphische Darstellung der *td1* und *kn1* Expressionsstärken in *td1-glf* bzw. wildtypischen cDNA Präparationen weiblicher Infloreszenzen.** In der analysierten *td1-glf* cDNA Präparation konnte durch *Real time* RT-PCR Analysen 20% verbleibende *td1* Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im Vergleich zum Wildtyp ~6% mehr *kn1*-Transkript nachgewiesener werden.

Wie in Abbildung 26 dargestellt, konnten interessanterweise in der *td1-glf* cDNA Präparation ca. 20% verbleibende *td1* Expression im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten in der *td1-glf* cDNA Präparation im Vergleich zum Wildtyp ca. 6% mehr *kn1* Transkript nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen *kn1* Expressionsstärken lassen sich unter Umständen durch die Anlage eines vergrößerten Infloreszenzmeristems in weiblichen *td1-glf* Infloreszenzen erklären.

Die gezeigte *td1* Expression in den analysierten homozygoten *td1-glf* Infloreszenzen können durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen worden sein. Denkbar ist eine somatische Exzision des *Mu*-Elements, die durch autonome *Mu*-Elemente hervorgerufen werden können (Chomet et al., 1991). Auch ein Spleiss-Ereignis muss als Ursache in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus kann auch eine genomische Kontamination der gesamt RNA-Präparation nicht ausgeschlossen werden.

Aufschluss über die Ursache sollte eine weitere RT-PCR Analyse geben, in der unter Verwendung der Primer 5-SEQ-1750 und PB-gen-3end der Bereich der *td1-glf* cDNA amplifiziert wurde, der die genomische *Mu*-Element Insertionsstelle innerhalb des *td1-glf* Allels repräsentiert. Nach Auftrag im Agarosegel konnte ein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden, dass im Vergleich zur wildtypischen cDNA um ca. 200bp größer war. Die Klonierung und Sequenzierung des

Amplifikationsprodukts zeigte eine Insertion einer partiellen 179bp *Mu*-Element Sequenz innerhalb der *tdl-glf* cDNA, die eine Verschiebung des Leserasters bedingt. Die Insertionsstelle ist identisch mit der *Mu*-Element Insertionsstelle, die zuvor in genomischer DNA des *tdl-glf* Allels definiert werden konnte. Die Amplifikation einer genomische Kontamination innerhalb der initial durchgeführten RNA Präparation konnte ausgeschlossen werden, da die amplifizierte cDNA keine Intronsequenzen beinhaltet.

Somit konnte gezeigt werden, dass das in den *Real time* RT-PCR Analysen amplifizierte cDNA Fragment ein nicht funktionales *tdl* Transkript repräsentiert.

### **3.10 Der *tdl* Phänotyp zeichnet sich durch die Bildung vergrößerter Meristeme aus**

Die molekulare Charakterisierung der unterschiedlichen *tdl* Allele erbrachte den Nachweis fünf unterschiedlicher Mutationen im *Kin5* Gen, das in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit als *tdl*-Gen bezeichnet wird. Phänotypisch war die Mutation *tdl* jedoch noch nicht detailliert charakterisiert worden. Bekannt waren die starke Fasziation des weiblichen Blütenstandes sowie das reduzierte Längenwachstum des männlichen Blütenstandes (Mark Running, persönliche Mitteilung).

In dieser Arbeit sollte nun eine genauere phänotypische Charakterisierung der sich entwickelnden weiblichen Infloreszenzen basierend auf rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie RNA *in situ* Hybridisierungsexperimenten erfolgen.

Es wurde erneut Saatgut des *tdl-R* Allel im Gewächshaus ausgebracht. Weibliche Infloreszenzen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung präpariert und elektronenmikroskopisch dargestellt bzw. für *in situ* Hybridisierungsexperimente in Parafin eingebettet.

Die Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte am Max Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln Vogelsang, mit freundlicher Unterstützung von Herrn Rolf-Dieter Hirtz.

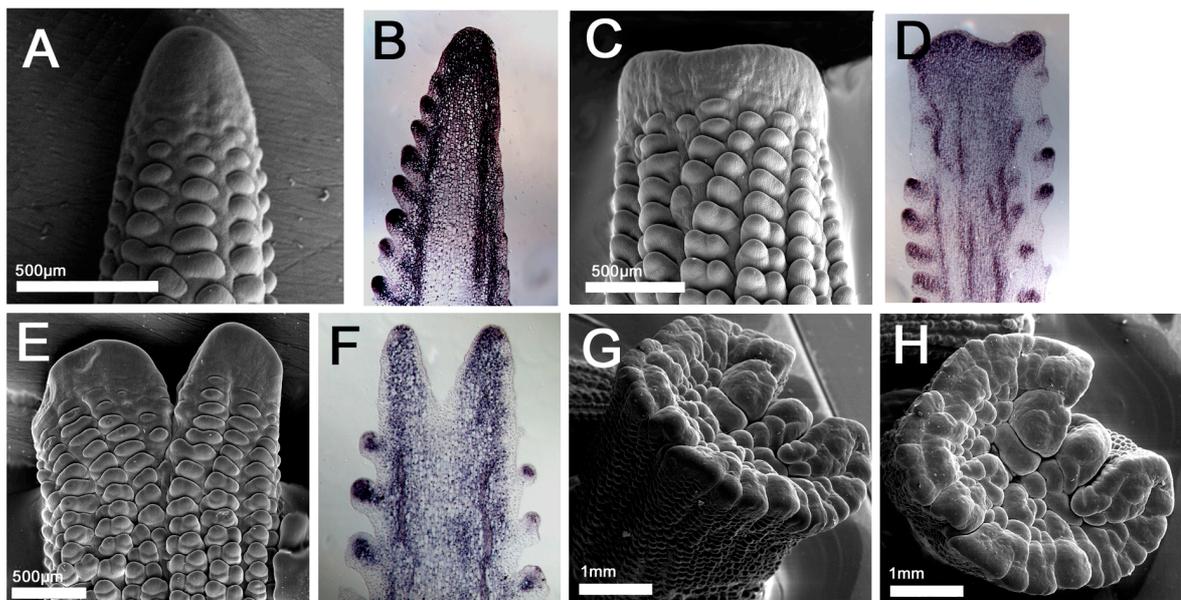
Die Analyse von 20 *tdl* Infloreszenzen zeigte eine abnormale Vergrößerung des Infloreszenzmeristems. Dabei konnten unterschiedliche Fasziationstypen des Infloreszenzmeristems (IM) beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 27A) konnte in einigen *tdl*-mutanten Blütenständen einer Abflachung und laterale Ausdehnung des IM beobachtet werden (Abb. 27C). Andere *tdl*-mutante IM zeigten eine Aufspaltung in zwei sich separat entwickelnde IM, die beide aufgrund der angelegten *spikelet pair* Meristeme als funktional betrachtet werden können (Abb. 27E). Eine weitere Variante, zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung dargestellt, zeigt eine Art Ringfasziation, die in einem massiv vergrößerten IM resultiert (Abb. 27G/H).

Durch Verwendung des meristemspezifischen Markergens *knotted1 (kn1)* in *in situ* Hybridisierungsexperimenten konnte die meristematische Identität der sich aberrant entwickelnden Infloreszenzmeristeme gezeigt werden. Die in den Abbildungen 27D und F dargestellten *tdl*-mutante Infloreszenzmeristeme zeigen ein zum Wildtyp (Abb. 27B) vergleichbares *kn1* Expressionsmuster mit nachweisbarer Expression innerhalb der apikal gelegenen Infloreszenzmeristeme, sowie Expression innerhalb der *spikelet pair*- und *spikelet* Meristeme. In allen Fällen ist die L1 Schicht der

sich entwickelnden Infloreszenzen frei von *kn1* Expression, so dass Defekte in Bezug auf fehlerhafte bzw. ektopische *kn1* Expression ausgeschlossen werden können.

Der Befund, dass *kn1* Expression auch in Zellen des vaskulären Gewebes detektierbar ist, erlaubt zusätzliche Aussagen über die Organisation des vaskulären Gewebes von *td1*-mutanten Infloreszenzen. Während sich im Wildtyp die Ausbildung eines regelmäßig geformten vaskulären Zylinders zeigt (Abb. 27B), kann in *td1*-mutanten Infloreszenzen die Ausbildung eines unregelmäßigen aus mehreren Strängen bestehendes vaskuläres System beobachtet werden (Abb. 27D).

Die vergrößerten Infloreszenzmeristeme produzieren schließlich eine größere Anzahl von *spikelet pair* Meristemen, die in einem veränderten phyllotaktischen Muster angelegt werden. Die in diesen Analysen eingesetzte Linie produziert in wildtypischen Infloreszenzen 11 Reihen von *spikelet pair* Meristemen, in *td1*-mutanten Infloreszenzen konnten hingegen zwischen 20 und 32 in einigen Fällen bis zu 40 Reihen angelegter *spikelet pair* Meristeme identifiziert werden.



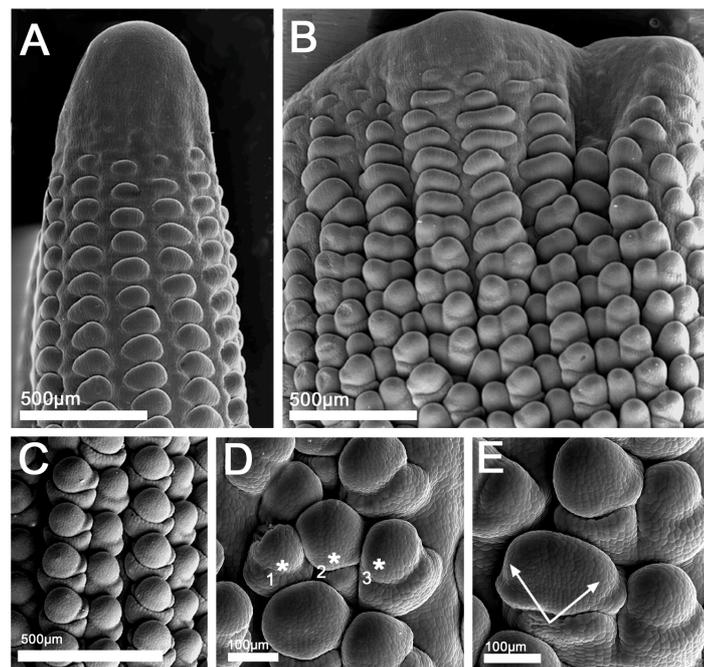
**Abb. 27: Morphologie *td1*-mutanter Infloreszenzen im Vergleich zum Wildtyp.** Dargestellt sind die in *td1*-mutanten Pflanzen beobachteten, unterschiedliche Fasziationstypen des Infloreszenzmeristems (C,E,G,H) im Vergleich zum Wildtyp (A). Die dargestellten *kn1* Expressionsmuster in *td1*-mutanten Infloreszenzen (D,F) zeigen ein zum Wildtyp (B) vergleichbares Expressionsmuster, mit starker *kn1* Expression innerhalb der einzelnen Meristeme und innerhalb des vaskulären Systems.

Wie in Abbildung 28 dargestellt sind die von den IM gebildeten *spikelet pair* Meristeme in *td1*-mutanten Infloreszenzen zum Teil stark vergrößert (Abb. 28B). Des Weiteren ist die im Wildtyp regelmäßige Anordnung der *spikelet pair* Meristeme in *td1*-mutanten Infloreszenzen aufgrund des

sich zuvor fehlerhaft entwickelnden IM nicht mehr gegeben (Abb. 28A und B). Im Wildtyp erfolgt die Anordnung der *spikelet pair* Meristeme entlang vertikaler Reihen in einem regelmäßigen, polystichen phyllotaktischen Muster (Abb. 28A). Diese regelmäßige, phyllotaktische Anordnung ist in *tdl*-mutanten Infloreszenzen weitestgehend aufgehoben. So kann in einigen *tdl*-mutanten Infloreszenzen eine Zuordnung einzelner *spikelet pair* Meristeme zu distinkten angelegten, vertikalen Reihen nicht mehr erfolgen (Abb. 28B).

Inwieweit die Größenzunahme der einzelnen *spikelet pair* Meristeme als Konsequenz der zuvor erfolgten Größenzunahme des IM zu beurteilen ist, oder ob die Größenzunahme einen spezifischen *tdl* Funktionsverlusteffekt innerhalb der *spikelet pair* Meristeme darstellt, kann aufgrund dieser rein morphologischen Analyse nicht bestimmt werden.

Auch die Entwicklung der einzelnen *spikelet* Meristeme, die aus einer transversalen Separation eines einzelnen *spikelet pair* Meristems hervorgehen, ist in *tdl*-mutanten Infloreszenzen gestört. Während der Wildtyp eine regelmäßige, paarige Anordnung von *spikelet* Meristemen zeigt (Abb. 28C), kann in *tdl*-mutanten Infloreszenzen gelegentlich die Formation dreier einzelner *spikelet* Meristeme nebeneinander beobachtet werden (Abb. 28D). Darüber hinaus waren in *tdl*-mutanten Infloreszenzen einzelner *spikelet* Meristeme stark vergrößert (Abb. 28E).



**Abb. 28: Morphologie *tdl*-mutanter *spikelet pair*- und *spikelet* Meristeme im Vergleich zum Wildtyp.** Die im Wildtyp beobachtete regelmäßige Anordnung der *spikelet pair*- und *spikelet*- Meristeme entlang vertikaler Reihen (A,C) ist in *tdl*-mutanten weiblichen Blütenständen aufgehoben. Einzelne *spikelet pair* Meristeme in *tdl*-mutanten Infloreszenzen sind stark vergrößert (B). In einigen Fällen konnte die Formation dreier einzelner *spikelet* Meristeme gezeigt werden (D). Darüber hinaus waren einzelne *spikelet* Meristeme stark vergrößert (E).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die *tdl* Mutation die Kontrolle der Meristemgröße in Infloreszenzmeristemen, sowie in *spikelet pair*- als auch *spikelet* Meristemen beeinflusst. In den genannten unterschiedlichen Meristemen kann eine Vergrößerung abweichend vom Wildtyp festgestellt werden. Dabei zeigt die Vergrößerung des Infloreszenzmeristems der weiblichen Blütenstände die stärkste Abweichung vom Wildtyp. Die Vergrößerungen innerhalb der *spikelet pair*- und *spikelet* Meristeme sind weniger stark ausgeprägt. Darüber hinaus traten diese nicht in allen *spikelet pair* und *spikelet* Meristemen auf. Neben den beschriebenen Meristemvergrößerungen, konnten auch Defekte in Bezug auf die phyllotaktischen Muster in denen die *spikelet pair*- und *spikelet* Meristeme initiiert wurden, beobachtet werden.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, *CLAVATA1*-ähnliche Gene aus *Zea mays* mit Hilfe eines auf Sequenzhomologie basierenden PCR Ansatzes zu isolieren und zu charakterisieren. So konnten unter Verwendung unterschiedlicher, degenerierter Oligonukleotide zu Beginn dieser Arbeit fünf unterschiedliche cDNAs mit einer signifikanten Sequenzhomologie zu *CLAVATA1* aus *Zea mays* isoliert werden.

Eine genauere phylogenetische Analyse zeigte, dass die Kinasesequenz des *Kin5* Gens den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *CLV1* repräsentierte. Die molekulare Charakterisierung von *Kin5* bestätigte dies.

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *Kin5* mit Hilfe rekombinanter Inzuchtlinien ergab, dass *Kin5* in unmittelbarer Umgebung zu der Mutation *td1* kartiert.

Die anschließende molekulare Analyse diverser *td1* Allele zeigte, dass sie alle einen Defekt innerhalb des in dieser Arbeit isolierten *Kin5* Gens darstellten und somit beide Loci als identisch zu betrachten sind.

Die folgende Diskussion soll basierend auf diesem Befund geführt werden. Dabei sollen *td1* Phänotyp, Genstruktur und Expression unter anderem im Vergleich zu *CLV1* betrachtet werden.

### 4.1 Die Analyse der isolierten unterschiedlichen *td1* Allele zeigt, dass *td1* und *Kin5* einen identischen Locus repräsentieren

In dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche *td1* Allele molekular charakterisiert. Die molekulare Charakterisierung des *td1* Locus in homozygoten *td1-R* Pflanzen zeigte die Koexistenz einer zusammenhängenden Deletion von 12 Basenpaaren und 4 Basenpaaraustauschen innerhalb der aminoterminalen Signalsequenz. Die Basenpaaraustausche resultieren in 4 Aminosäuresubstitutionen. Die *td1-R* Mutation könnte somit eine reduzierte Funktionalität der Signalsequenz bedingen. Diese Annahme basiert auf einer mit dem Programm *TargetP V1.0* erstellten Analyse, die eine deutlich reduzierte Wahrscheinlichkeit einer Sekretion voraussagte.

Des Weiteren konnte unter zu Hilfenahme des *TargetP V1.0* Programms gezeigt werden, dass die alleinige Existenz der Deletion innerhalb der hydrophoben Kernsequenz den gleichen verringernenden Effekt ausübte wie den in der originär analysierten *td1-R* Signalsequenz. Die Existenz der vier Aminosäuresubstitutionen allein scheint also keinen verringernenden Einfluss auf die Funktionalität der Signalsequenz auszuüben.

Diese *in-silico* Vorhersagen lassen vermuten, dass die Deletion innerhalb der hydrophoben Kernsequenz ursächlich für den *td1*-Funktionsverlust im *td1-R* Allel ist.

Dafür spricht, dass in anderen eukaryotischen Systemen gezeigt werden konnte, dass durch Deletion einzelner oder mehrerer Aminosäuren innerhalb der hydrophoben Kernsequenz die Effizienz der

Zielsteuerung der Ribosomen-assoziierten Polypeptidkette zum ER reduziert bzw. ganz unterbunden wird (Bird et al., 1990).

Derzeit wird angenommen, dass die hydrophobe Kernsequenz die Interaktion mit SRPs (signal recognition particles) vermittelt. Dieser Komplex kann anschließend mit dem ER interagieren, wobei die SRPs eine Chaperon-ähnliche Funktion bei der Integration der Polypeptidkette in die Membran des ERs ausüben scheinen. Die Wechselwirkung zwischen Signalsequenz und SRP kann jedoch nur effizient erfolgen, wenn eine definierte Hydrophobizität der Kernsequenz gegeben ist. Sinkt die Hydrophobizität unter einen gewissen Schwellenwert, kann die Interaktion nicht mehr vermittelt werden, mit der Folge, dass die Polypeptidkette nicht mehr zum ER dirigiert wird (Zheng und Nicchitta, 1999).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur die absolute Hydrophobizität der Kernsequenz von Bedeutung ist, sondern auch deren Aminosäurekomposition. Ein Vergleich von pro- und eukaryotischen Signalsequenzen zeigte, dass innerhalb der Kernsequenz eukaryotischer Signalsequenzen eine statistisch signifikante Abundanz der Aminosäure Leucin festgestellt werden kann. In prokaryotischen Organismen finden hingegen auch die Aminosäuren Valin und Isoleucin innerhalb der Kernsequenz Verwendung (Nielsen et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Existenz von Leucinresten erheblichen Einfluss auf die Effizienz der Proteinzielsteuerung ausübt. Es wird angenommen, dass diese Leucinreste eine ungefaltete Konformation der Signalsequenz aufrechterhalten, welche notwendig für die Assoziation mit weiteren Komponenten der ER-Membran zu sein scheint (Zheng und Nicchitta, 1999).

Auch die *tdl* Signalsequenz besitzt sieben aufeinanderfolgende Leucinreste innerhalb der hydrophoben Kernsequenz. Interessanterweise sind bei der *tdl-R* Mutation zwei Leucinreste deletiert und ein Leucinrest durch Isoleucin substituiert. Es ist also möglich, dass durch die Deletion bzw. Substitution der Leucinreste die ungefaltete Konformation nicht hergestellt werden kann. Dies unterstreicht die durch das *TargetP VI.0* Programm berechnete verminderte Funktionalität der aminoterminalen *tdl-R* Signalsequenz.

Die molekulare Analyse der drei *Mutator* induzierten Allele, die in *targeted Mu-screens* unter Verwendung des *tdl-R* Allels, identifiziert worden sind, zeigte die Insertion von *Mu*-Elementen innerhalb unterschiedlicher Bereiche des *tdl* Gens.

Die *Mu*-Element Insertionen in den Allelen *tdl-mum1* und *tdl-mum3* liegen innerhalb der extrazellulären *tdl* Domäne. Es kann in beiden Fällen davon ausgegangen werden, dass die *Mu*-Element Insertion die Bildung eines funktionalen TD1 Proteins unterbindet.

Die *Mu*-Element Insertion im *tdl-mum2*-Allel liegt innerhalb der Intron Sequenz 29bp *downstream* der Spleiss Donator Stelle. Somit könnte durch Spleissen des Introns auch die *Mu*-Element Insertion herausgespleisst werden. Die Beobachtung, dass dieses Allel aber einen schwachen *tdl* Phänotyp zeigt, lässt allerdings vermuten, dass die *Mu*-Element Insertion das korrekte Spleissen des Introns beeinträchtigt.

Die durch *Real-time* RT PCR analysierte *tdl* Expression in homozygoten *tdl-glf* Pflanzen, zeigte eine stark reduzierte *tdl* Expression. Darüber hinaus konnte das amplifizierte Transkript aufgrund der Insertion eines partiellen *Mu*-Elementes als nicht funktional charakterisiert werden.

Die Identifikation der *Mu*-induzierten *tdl* Allele belegt die Effizienz des *Mutator* Systems, das sich vor allem durch seine hohe Transpositionsfrequenz auszeichnet (Lisch, 2002). Tatsächlich konnten

bisher die meisten Maisgene durch Verwendung des *Mutator* Systems kloniert werden (Walbot, 2000).

## 4.2 Der *td1* Phänotyp ist dem *clv* Phänotyp ähnlich

Die in dieser Arbeit durchgeführte phänotypische Charakterisierung konzentriert sich im Wesentlichen auf die Entwicklung des weiblichen Blütenstandes. Ausschlaggebend hierfür waren die Ergebnisse der zuvor von Mark Running durchgeführten phänotypischen Analysen. Laut diesen kann die stärkste phänotypische Ausprägung der *td1* Mutation innerhalb der weiblichen Blütenstände beobachtet werden (M. Running, persönliche Mitteilung).

Da sich die von Mark Running durchgeführten Analysen jedoch im wesentlichen auf die Betrachtung reifer männlicher bzw. weiblicher Infloreszenzen beschränkte, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine präzisere Analyse der Entwicklung weiblicher *td1*-mutanter Infloreszenzen unter Einbeziehung früherer Entwicklungsstadien erfolgen. Eine genauere Analyse des *td1* Phänotyps in männlichen Blütenständen, ist von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Sarah Hake durchgeführt worden und soll in dieser Diskussion mit aufgegriffen werden.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von weiblichen Infloreszenzen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigten die stärkste Ausprägung des *td1* Phänotyps in sich entwickelnden Infloreszenzmeristemen (IM).

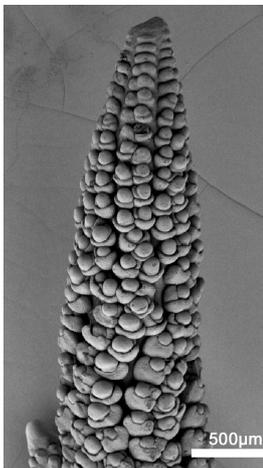
Darüber hinaus zeigten *in situ* Hybridisierungsexperimente mit dem meristemspezifischen Markergen *kn1*, dass die Meristemidentität *per se* in sich aberrant entwickelnden *td1* IM nicht gestört zu sein scheint. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass innerhalb mutanter weiblicher Blütenstände die Formation von *spikelet pair*- und *spikelet* Meristemen als Folge meristematischer Aktivität beobachtet werden kann. Auch die Schicht-spezifische Expression des *kn1* Gens (Jackson und Hake, 1994) zeigte keine Abweichung vom Wildtyp. Wie in wildtypischen Infloreszenzen konnte auch in *td1*-mutanten Infloreszenzen kein *kn1* Transkript in der L1-Schicht nachgewiesen werden. Somit kann festgehalten werden, dass es sich um einen spezifischen Defekt in Bezug auf die Regulation der Meristemgröße handelt. Die Organisation des Meristems scheint jedoch zumindest hinsichtlich der Etablierung einer distinkten L1-Schicht nicht betroffen zu sein.

Neben den vergrößerten und fasziierten Infloreszenzmeristeme zeigten auch die sich entwickelnden *spikelet pair*- und *spikelet* Meristeme *td1*-mutanter Infloreszenzen eine Vergrößerung. Inwieweit diese Vergrößerungen eine Konsequenz des sich zuvor fehlerhaft entwickelten Infloreszenzmeristems darstellt, oder ob sie Vergrößerungen einen *td1* spezifischen Defekt innerhalb dieser Meristeme reflektieren, kann nicht eindeutig geklärt werden. Der in den *spikelet pair*- und *spikelet* Meristemen beobachtete Phänotyp ist aber bei weitem nicht so ausgeprägt wie der des Infloreszenzmeristems.

In *clv* Mutanten konnte gezeigt werden, dass die progressive Vergrößerung der Spross- und Blütenmeristeme auf eine mit der Entwicklungsdauer fortschreitende Akkumulation von Stammzellen in Meristemen zurückzuführen ist (Clark et al., 1993). Somit sollte in Betracht gezogen werden, dass den sich entwickelnden Infloreszenzmeristemen relativ gesehen ein größerer Zeitraum zur Verfügung steht, Stammzellen zu akkumulieren, als den *spikelet pair* und *spikelet* Meristemen, deren Entwicklung von wesentlich kürzerer Dauer ist.

Dass der absolute Zeitraum der den unterschiedlichen Infloreszenzmeristemen zur Akkumulation von Stammzellen zur Verfügung steht, einen wichtigen Parameter darstellt, kann auch anhand der phänotypischen Varianz von *td1* in unterschiedlichen genetischen Hintergründen gezeigt werden. So kann in sogenannten schnellen Inzuchtlinien wie z.B. A188 oder A632 ein schwächerer Fasziationsphänotyp innerhalb weiblicher Infloreszenzmeristeme beobachtet werden als in sog. langsamen Linien (M. Running, persönliche Mitteilung).

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Infloreszenzmeristeme der sich entwickelnden männlicher Blütenstände *td1*-mutanter Pflanzen einen wesentlich geringeren Grad an Vergrößerung aufweisen. Massive Fasziationsereignisse, wie für *td1*-mutante weibliche Infloreszenzen gezeigt, konnten hier nicht beobachtet werden (Abb. 29), auch wenn männliche und weibliche Blütenstände sich in ihrer frühen Entwicklung nur geringfügig unterscheiden (McSteen et al., 2000).



**Abb. 29: SEM Aufnahme eines *td1*-mutanten männlichen Blütenstandes.** Das Infloreszenzmeristem zeigt im Vergleich zu einer *td1*-mutanten weiblichen Infloreszenzmeristemen keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Anlage der *spikelet* Meristeme zeigt allerdings abweichend vom Wildtyp ein unregelmäßiges phyllotaktisches Muster. (Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. Sarah Hake zur Verfügung gestellt)

Möglicherweise lässt sich hier die absolute Größe der unterschiedlichen Infloreszenzmeristeme als ein weiterer den Grad der Fasziation bedingender Parameter heranziehen. Ein entscheidender Unterschied in der Entwicklung männlicher und weiblicher Blütenstände ist die Formation von *branch* Meristemen in männlichen Blütenständen. Womöglich bedingt die Bildung der *branch* Meristeme innerhalb männlicher Blütenstände eine Reduzierung der absoluten Anzahl von Infloreszenzmeristem-spezifischen Zellen zu einem früheren Entwicklungsstadium. Dies hat zur Folge, dass ein im Vergleich zur weiblichen Infloreszenz insgesamt verkleinertes Infloreszenzmeristem entsteht.

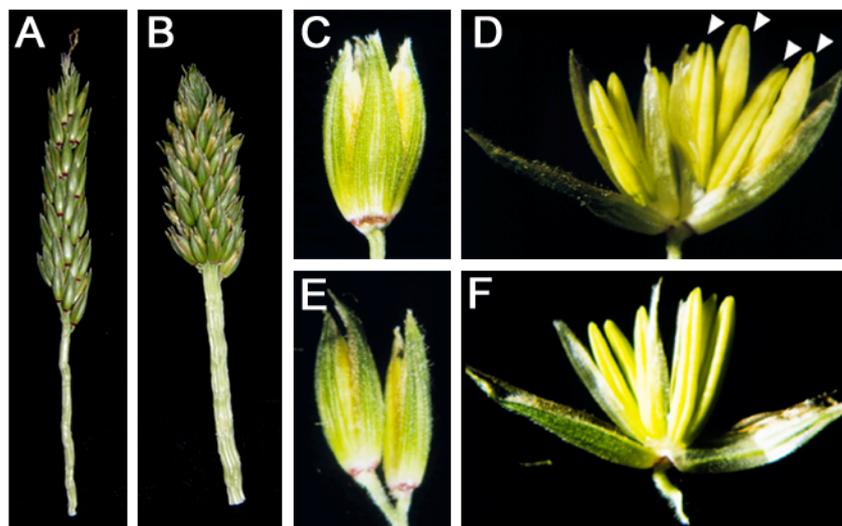
Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in genetischen Hintergründen, die *per se* größere weibliche Blütenstände produzieren, relativ gesehen ein stärkerer Fasziationsphänotyp beobachtet werden kann, als in genetischen Hintergründen, die kleinere weibliche Blütenstände produzieren.

Alternativ muss auch die Existenz eines zu TD1 redundanten Faktors in Betracht gezogen werden. Wie bereits zuvor beschrieben, konnten allein im Genom von *Arabidopsis* 235 LRR- Rezeptorkinasen nachgewiesen werden; demzufolge kann von einer zumindest ähnlichen großen Anzahl im Maisgenom ausgegangen werden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass eine weitere LRR-Rezeptorkinase den *td1* Funktionsverlust kompensieren könnte.

Die Beobachtung, dass die *tdl* Mutation während der vegetativen Entwicklung keinen augenscheinlichen Phänotyp hervorruft, könnte ebenfalls durch die Existenz einer zu TD1 funktional redundanten LRR- Rezeptorkinase erklärt werden. Der Aspekt der funktionalen Redundanz soll eingehend in Kapitel 4.4. erörtert werden.

Die phänotypische Analyse reifer *tdl*-mutanter männlicher Blütenstände (Abb. 30B) zeigte, dass die Hauptachse in *tdl* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 30A) einen größeren Umfang besitzt. In ihrer Gesamtlänge ist die Hauptachse der männlichen Blütenstände jedoch verkürzt. Des Weiteren wurden mehr Blüten angelegt. So konnten in männlichen *tdl* Blütenständen durchschnittlich 21 Blüten pro cm Hauptachse gezählt werden, wohingegen in wildtypischen männlichen Blütenständen durchschnittlich 14 Blüten pro cm Hauptachse gezählt werden. Diese deutliche Zunahme kann als Konsequenz eines zuvor vergrößert angelegten Infloreszenzmeristems interpretiert werden.

Außerdem konnte in einigen Blüten abweichend vom Wildtyp die Anlage von drei Hüllspelzen beobachtet werden. Diese Blüten wurden nicht paarig, sondern einzeln initiiert (Abb. 30C, D). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in einigen Blüten vier statt der normalerweise drei angelegten Staubgefäße angelegt wurden (Abb.30D, F). Auch dies weist darauf hin, dass die während der Blütenentwicklung angelegten, unterschiedlichen Meristeme in *tdl*-mutanten Pflanzen vergrößert sind. Die Bildung zusätzlicher Blütenorgane konnte auch in den vergrößerten Blütenmeristemen von *clv1* Mutanten beobachtet werden (Clark et al., 1993). Die Vergleichbarkeit der Phänotypen unterstützt die Annahme, dass *tdl* das zu *CLV1* orthologe Gen in *Zea mays* darstellt.



**Abb. 30: Die Mutation *tdl* zeigt die Bildung zusätzlicher Blütenorgane.** Darstellung unterschiedlicher Defekte der männlichen Blütenentwicklung. Die Hauptachse in männlichen *tdl*-mutanten Blütenständen (**B**) ist im Vergleich zum Wildtyp (**A**) verbreitert und trägt mehr Blüten. Einzelne angelegte *tdl*-mutante Blüten werden von drei Hüllspelzen ummantelt (**C**), wohingegen im Wildtyp die einzelnen Blüten paarig angelegt werden und nur von 2 Hüllspelzen ummantelt sind (**E**). In einigen *tdl*-mutanter Blüten kann die Bildung von vier Staubgefäßen beobachtet werden (**D**), der Wildtyp hingegen produziert nur drei (**F**). (Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Sarah Hake zur Verfügung gestellt).

Interessanterweise konnten nahezu identische Beobachtungen bei der phänotypischen Charakterisierung *fea2*-mutanter Infloreszenzen gemacht werden (Taguchi-Shiobara et al., 2001). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kodiert *fea2* für ein LRR Rezeptorprotein in Mais, das als das putativ orthologe Gen zu *CLAVATA2* gilt. Die Klonierung dieses Gens wies erstmals darauf hin, dass der CLAVATA-Signaltransduktionsweg auch in monokotylen Spezies an der Kontrolle von Stammzellpopulationen beteiligt ist.

Analog zur *td1* Mutation zeigen *fea2* Mutanten eine massive Vergrößerung des Infloreszenzmeristems weiblicher Blütenstände, darüber hinaus konnten auch in dieser Mutation vergrößerte *spikelet pair*- und *spikelet* Meristeme sowie die Bildung zusätzlicher Blütenorgane beobachtet werden. Die Infloreszenzmeristeme männlicher Blütenstände zeigen jedoch keine Fasziation. Auch während der vegetativen Entwicklung zeigt die *fea2* Mutation keine phänotypische Ausprägung.

Somit zeigen beide Mutationen einen nahezu identischen Phänotyp. Unter Berücksichtigung der in *Arabidopsis* gezeigten Daten, kann dieser Befund als ein starkes Indiz dafür gewertet werden, dass TD1 und FEA2 in einem gemeinsamen Regulationsprozess involviert sind. Im folgenden Kapitel werden aufgrund der molekularen Eigenschaften von TD1 weitere Argumente aufgegriffen, die diese Annahme unterstützen.

### **4.3 Die molekulare Charakterisierung von *td1* unterstützt die Annahme, dass der CLAVATA- Signaltransduktionsweg konserviert ist**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte in *Arabidopsis* die Existenz eines CLAVATA Signaltransduktionsweg gezeigt werden, in dem CLAVATA1 und CLAVATA2 einen heterodimeren Rezeptorkomplex ausbilden (Trotochaud et al., 1999), der wahrscheinlich durch die Bindung des Liganden CLAVATA3 aktiviert wird (Brand et al., 2000). Der aktivierte Rezeptorkomplex bedingt letztendlich über noch nicht identifizierte intrazelluläre Faktoren eine negative transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors *WUSCHEL* im organisierenden Zentrums des Meristems (Brand et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *td1* für eine LRR-Rezeptorkinase mit hoher Sequenzverwandtschaft zu *CLV1* kodiert. Nach Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen beider Gene konnten die Identität mit 57,5% und die Ähnlichkeit zwischen *td1* und *CLV1* mit 65,9% bestimmt werden.

Ein mit der *td1* Aminosäuresequenz durchgeführter Datenbankabgleich zeigte, dass neben einer LRR-Rezeptorkinase aus *O. sativa* die *CLV1* Sequenz aus *Arabidopsis* die zweithöchsten Werte bezüglich Aminosäureidentität bzw. -ähnlichkeit aufwies. Die von *CLV1* repräsentierten Domänen konnten alle in der TD1 Sequenz identifiziert werden.

So kodiert *td1* für ein Rezeptormolekül, das extrazellulär aus 21 vollständigen, von paarigen Cysteinresten flankierten LRR-Motiven und einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinasedomäne

besteht. Die Ableitung der Serin/Threonin Spezifität basiert auf den existierenden Sequenzhomologien zu bereits biochemisch charakterisierten Kinasen.

Auch die genomische Struktur von *td1* und *CLV1* ist auffallend ähnlich. Beide Gene besitzen ein einzelnes, innerhalb der Kinasedomäne liegendes Intron, das - basierend auf den Aminosäuresequenzen beider Gene - an identischer Stelle lokalisiert ist. Auch die Größen der Introns mit 79bp für *CLV1* und 83bp für *td1* sind sehr ähnlich. Anzahl, Größe und Lage der einzelnen LRR-Motive sind ebenfalls hochkonserviert.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von LRR-Rezeptorkinasen sind die die LRR-Domäne flankierenden paarigen Cysteinreste. In *Arabidopsis* sollen sie die Heterodimerisierung von *CLV1* und *CLV2* vermitteln (Jeong et al., 1999). Wie bereits unter 3.4.3.1 aufgeführt sind die paarigen Cysteinreste auch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *td1* konserviert, wobei die carboxyterminal gelegenen Cysteinreste allerdings einen abweichenden Abstand zueinander haben. Dies steht im Einklang mit der von Diévert und Clark (2003) durchgeführten vergleichender Analyse pflanzlicher LRR-Rezeptorkinasen, die einen generell geringen Konservierungsgrad innerhalb der carboxyterminalen paarigen Cysteinreste aufzeigen konnte.

Interessanterweise können in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *fea2* nur die carboxyterminal gelegenen paarigen Cysteinreste identifiziert werden, die sich – wie bei *td1* – durch einen abnormalen Abstand zueinander auszeichnen (Taguchi-Shiobara et al., 2001).

Der Annahme folgend, dass TD1 und FEA2 einen heterodimeren Rezeptorkomplex ausbilden, und dass diese Dimerisierung über die paarigen Cysteinreste vermittelt wird, muss die Existenz eines einzelnen paarigen Cystein-Motivs als funktional ausreichend angenommen werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die aminoterminal gelegenen paarigen Cysteinreste der TD1 Sequenz für die Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptorproteins verantwortlich sind. Denkbar wäre, dass TD1 innerhalb des CLAVATA-Signaltransduktionsweg einen weiteren, bisher noch nicht identifizierten, Dimerisierungspartner besitzt oder aber dass TD1 in einem weiteren bisher noch nicht identifizierten Signaltransduktionsweg involviert ist, der eine Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptorprotein voraussetzt, die unter anderem über die aminoterminalen Cysteinreste vermittelt werden könnte.

In diesem Zusammenhang muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass eine Dimerisierung von LRR- Rezeptorkinasen bzw. LRR-Rezeptorproteinen auch über die membranständigen Bereiche der extrazellulären Domäne vermittelt werden könnten (Diévert und Clark, 2003). So konnte in einer funktionalen Analyse einer *brl* Mutante gezeigt werden, dass eine Mutation innerhalb der extrazellulären membranständigen Domäne zwar eine Inaktivierung des Rezeptors zur Folge hatte die Ligandenbindung aber nicht beeinträchtigt war. Diese Schlussfolgerung setzt voraus, dass die extrazelluläre membranständige Domäne in weiteren Proteininteraktionen involviert ist, die unabhängig von der Ligandenbindung sind (Friedrichsen et al., 2000).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die durch die Klonierung von *fea2* erstmalig formulierte Annahme, dass der CLAVATA-Signaltransduktionsweg zur Kontrolle von Stammzellpopulationen auch in Mais konserviert ist, durch die Identifikation und molekulare Charakterisierung des *td1* Gens weitere Unterstützung erhält.

#### 4.4 Die Analyse der *tdl* Expression

Anhand der durchgeführten *Northern*-Analysen konnte die Transkriptgröße von *tdl* mit ca. 3,2 kb bestimmt werden. Da der aus einer cDNA Bank isolierte *tdl* Klon nicht das gesamte offene Leseraster repräsentierte, konnte durch die *Northern*-Analyse das auf der Basis genomischer Sequenzdaten vorhergesagte offene Leseraster von 2991bp verifiziert werden.

Die Ergebnisse der *tdl*-spezifischen *Real time* RT-PCR-Analysen bestätigten die zuvor erstellten *Northern*-Analysen in Bezug auf die unterschiedlichen gewebespezifischen *tdl* Expressionsniveaus. Darüber hinaus konnte anhand der durchgeführten *Real time* RT PCR auch das Expressionsniveau in weiblichen Infloreszenzen bestimmt werden, welches dem *tdl* Expressionsniveau in jungen Blättern gleichgesetzt werden kann.

Unter Berücksichtigung der veröffentlichten *CLVI* Expressionsdaten erscheinen diese Ergebnisse in erster Hinsicht als überraschend. So wurde unter der Prämisse, dass *CLVI* und *TD1* analoge biologische Funktionen ausüben, *tdl* Expression exklusiv in solchen Geweben vermutet, die Zellen des sprossapikalen-, Infloreszenz- bzw. Blütenmeristems beinhalten. Tatsächlich kann *tdl* Expression in sämtlichen analysierten Gewebetypen nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich die stärksten *tdl* Expressionsniveaus in Analogie zur *CLVI* Expression im vegetativen Spross und weiblichen Blütenständen, es konnte aber auch starke Expression in jungen Blättern nachgewiesen werden. Zudem wird *tdl* Expression - wenn auch schwach - in Embryonen und Wurzelgewebe exprimiert. In diesem Zusammenhang sollte aber darauf hingewiesen werden, dass keine publizierten *CLVI* *Northern*-Analysen bzw. RT-PCR Ergebnisse vorliegen. Die publizierten *CLVI* Expressionsdaten basieren auf <sup>35</sup>S-markierten *in situ* Hybridisierungen von Infloreszenz und Blütenmeristemen (Clark et al., 1997), so dass nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass auch *CLVI* in anderen Geweben exprimiert ist.

Das zelluläre Expressionsmuster von *tdl* wurde anhand von RNA *in situ* Hybridisierungsexperimenten analysiert. Durch die Verwendung einer *tdl*-spezifischen Sonde, die den schwach konservierten, carboxyterminalen Bereich der Kinasedomäne sowie 170bp des 3'UTR repräsentiert, sollte unspezifische Kreuzhybridisierung weitestgehend ausgeschlossen sein. Dass keine spezifische zelluläre *tdl* Expression innerhalb der embryonalen und vegetativen Entwicklung nachgewiesen wurde, kann durch eine schwache ubiquitäre *tdl* Expression erklärt werden.

In den männlichen und weiblichen Blütenständen konnte anhand der *in situ* Hybridisierungen ein spezifisches *tdl* Expressionsmuster nachgewiesen werden. *Tdl* Expression wurde in den lateral angelegten *spikelet pair*-, *spikelet*- und Blütenmeristemen nachgewiesen. Anders als *CLVI* ist *tdl* auch in der L1-Schicht der jeweiligen Meristeme exprimiert. Auch in Organprimordien konnte *tdl* Expression detektiert werden.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die in *Arabidopsis* gezeigten *CLVI* Expressionsmuster nicht grundsätzlich repräsentativ für *CLVI* orthologe Gene anderer Spezies sein müssen. Leider sind bis heute keine zellulären Expressionsmuster *CLVI* orthologer Gene anderer Spezies veröffentlicht.

Dass aber *CLVI* nicht notwendigerweise in sehr definierten Domänen exprimiert werden muss, um seine Funktionalität innerhalb des Meristems zu gewährleisten, konnte anhand einer Analyse transgener Arabidopsispflanzen, die *CLVI* ektopisch unter der Kontrolle des *Erecta* Promotors exprimierten, gezeigt werden (Diévar et al., 2003). Diese transgenen Pflanzen zeigten keine

phänotypischen Veränderung der Spross- und Blütenmeristeme, obwohl das *Erecta* Gen, das ebenfalls für eine LRR- Rezeptorkinase kodiert, sowohl im gesamten sprossapikalen Meristem als auch in Organprimordien exprimiert ist (Yokoyama et al., 1998). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Spezifität des Wirkungsortes in diesem Falle durch das definierte Expressionsmuster des Liganden gegeben ist. Dass in *Arabidopsis* sowohl Rezeptor (*CLV1*) als auch Ligand (*CLV3*) in sehr definierten Mustern exprimiert sind, reflektiert womöglich eine Ausnahme.

Der sicherlich interessanteste Befund ist das Fehlen einer detektierbaren *tdl* Expression innerhalb der weiblichen und männlichen Infloreszenzmeristeme. Interessant insofern, als gerade das weibliche Infloreszenzmeristem die stärkste phänotypische Ausprägung der *tdl* Mutation zeigt.

Dafür können mehrere Erklärungsansätze aufgeführt werden. Ein Ansatz bedient sich dabei des Arguments, dass *tdl* innerhalb des Infloreszenzmeristems, ähnlich wie in den embryonalen und vegetativen Meristemen, schwach ubiquitär exprimiert wird.

Dieses Argument erklärt jedoch nicht, warum sich der *tdl* Phänotyp erst in reproduktiven Entwicklungsstadien manifestiert. Will man jedoch das *tdl* Expressionsmuster mit dem *tdl* Phänotyp in Einklang bringen können drei weitere Erklärungsansätze aufgeführt werden.

## 1. Funktionelle Redundanz zu TD1

In *Arabidopsis* gilt die Existenz weiterer Rezeptorkinasen, die mit *CLV1* überschneidende Funktionen ausüben, mittlerweile als gesichert (Diévar et al., 2003). Diese These stützt sich im Wesentlichen auf folgende Beobachtungen.

Das *clv1-7* Allel zeigt einen vergleichsweise schwachen Phänotyp, obwohl dieses Allel eine Deletion der nahezu kompletten intrazellulären Kinasedomäne repräsentiert. Da die Phosphorylierung der Kinasedomäne wahrscheinlich eine Voraussetzung für die Bildung des aktiven Rezeptorkomplexes ist (Trotochaud et al., 1999), sollte das *clv1-7* Allel einen starken Phänotyp aufweisen. Auch die Analyse weiterer *clv1*-Null-Allele zeigte einen vergleichsweise schwachen Phänotyp (Diévar et al., 2003).

Diese Beobachtungen führten zu der Überlegung, dass die starken *clv1* Allele, die alle eine Mutation in der extrazellulären Domäne aufweisen, einen dominant negativen Effekt ausüben. Mit der Existenz einer oder mehrerer Rezeptorkinasen, die eine zu *CLV1* redundante Funktion ausüben, kann jedoch der in *clv1-7* Allelen beobachtete schwache Phänotyp bzw. die Existenz der dominant- negativen Allele erklärt werden (DeYoung und Clark, 2001; Diévar et al., 2003).

Tatsächlich sind auf der *Arabidopsis Conference* 2002 von DeYoung et al. Daten präsentiert worden, die demonstrieren, dass in *Arabidopsis* zwei weitere *CLV1*-ähnliche Rezeptorkinasen, *Bam1* und *Bam2*, im CLAVATA-Signaltransduktionsweg involviert sind, deren Phänotyp nur in einem *clv1*-mutanten Hintergrund offensichtlich wird.

Unter Berücksichtigung dieser in *Arabidopsis* gezeigten Redundanz könnte man annehmen, dass auch in Mais neben TD1 weitere Rezeptorkinasen in der Kontrolle der Stammzellidentität in einem CLAVATA-ähnlichen Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen.

Die vergleichsweise moderaten Vergrößerungen des männlichen Infloreszenzmeristems sowie die der *spikelet pair*-, *spikelet*- und Blütenmeristeme beider Blütenstände könnten demnach durch die

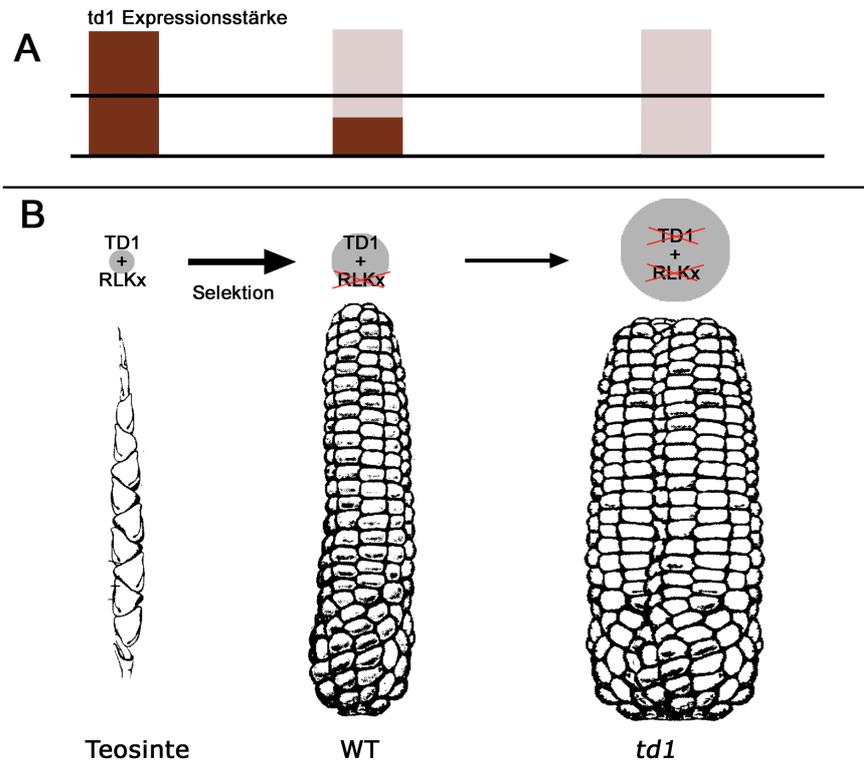
Aktivität einer oder mehrerer zu TD1 redundanten Rezeptorkinasen erklärt werden. Diese Annahme erlaubt auch Überlegungen in Bezug auf evolutionäre Aspekte der Entwicklung von *Zea mays*.

Es gilt mittlerweile als gesichert, dass die wildwachsende Teosinte die Urform der heutigen Kulturform *Zea mays* repräsentiert (Doebley 1992). Diese von George Beadle bereits in den 30iger Jahren postulierte These, war in den letzten beiden Jahrzehnten Bestandteil umfangreicher genetischer und morphologischer Analysen. Diese zeigten, dass die morphologischen Unterschiede zwischen Mais und Teosinte auf die Existenz von fünf QTLs (*Quantitative Trait Loci*) reduziert werden können (Doebley und Stec, 1991, 1993). Neben vier QTLs, die für die morphologischen Unterschiede Samenabwurf, Hüllspelzenverhärtung, Seitentriebentwicklung und paariger Blüteninitiation verantwortlich gemacht werden konnten, konnte ein fünfter QTL definiert werden, der die Phyllotaxis der weiblichen Infloreszenz kontrolliert. Wie in Abbildung 32 dargestellt, werden in Teosinte die einzelnen Blüten in einer distichen Phyllotaxis angelegt, wohingegen die Blüten auf einem Maiskolben einem polystichen Muster folgend angelegt werden. Es ist durchaus denkbar, dass diese Veränderung der Phyllotaxis eine direkte Konsequenz eines vergrößerten Infloreszenzmeristems darstellt. Eine direkte Korrelation zwischen Meristemgröße und Phyllotaxis konnte anhand mehrerer Mutationen gezeigt werden (Leyser und Furner, 1992; Jackson und Hake, 1998).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die morphologischen Veränderungen in Bezug auf die Größe der Infloreszenzmeristeme zwischen Teosinte und Mais durch Modifikationen einzelner oder mehrerer Komponenten des CLAVATA-Signaltransduktionswegs hervorgerufen worden sind.

Demzufolge kann vermutet werden, dass die Selektion auf die heutige Kulturform *Zea mays* zum funktionalen Verlust und/oder verminderter Aktivität einer oder mehrerer zu TD1 funktional redundanter LRR-Rezeptorkinasen führte, der in einer Vergrößerung des Infloreszenzmeristems resultierte. Aufgrund der verbleibenden TD1 Funktion kann eine Restfunktionalität des CLAVATA-Signaltransduktionsweg dennoch aufrechterhalten werden. Die starke Fasziation der *td1* Infloreszenzen kann diesem Modell folgend durch den zusätzlichen Verlust der TD1 LRR-Rezeptorkinase erklärt werden (Abb. 32B). Somit resultiert der beobachtete Fasziationsphänotyp in weiblichen *td1*-mutanten Infloreszenzen womöglich aus dem Funktionsverlust einer oder mehrerer Komponenten des CLAVATA-Signaltransduktionswegs.

Die in Kapitel 3.3. erstellte phylogenetische Rekonstruktion zeigte, dass zwei weitere LRR-Rezeptorkinasen aus *Arabidopsis* mit bis jetzt unbekannter Funktion in Unterfamilie A eingeordnet werden konnten. Die Beobachtung, dass transgene *OsLRK1 antisense* Pflanzen zusätzliche Blütenorgane bilden (Kim et al., 2001), weist darauf hin, dass die Unterfamilie A eingeordneten LRR-Rezeptorkinasen in *CLV1*-ähnlichen Regulationsprozessen involviert sein könnten. Die Vermutung liegt nahe, dass *Bam1/Bam2* und die in der phylogenetischen Rekonstruktion analysierten Gene *RLK1A.t./RLK2A.t.* der Unterfamilie A identisch sind. In diesem Zusammenhang könnten die drei Maissequenzen KIN1-3, die ebenfalls in Unterfamilie A eingeordnet worden sind, die in dem angesprochenen Modell implizierten zu TD1 funktional redundanten Proteine repräsentieren.



**Abb. 32: Zwei Modelle zur Erklärung der in *Zea mays* beobachteten Infloreszenzmeristemvergrößerung.** Teosinte bildet Samen entlang zweier Reihen in einer distichen Phyllotaxis. Moderne Mais Linien bilden die Samen entlang mehrerer Reihen (8-18), wobei die einzelnen Samen in einem polystichen phyllotaktischen Muster angelegt werden. In *td1*-mutanten Kolben konnten bis zu 40 Reihen von angelegten Samen beobachtet werden.

**A:** Diesem Modell folgend ist der in weiblichen *td1*-mutanten Infloreszenzen beobachtete Phänotyp auf einen vollständigen Verlust der *td1* Expression zurückzuführen. Die braunen Säulen stellen die jeweiligen *td1* Transkriptmengen in den Infloreszenzmeristemen dar.

**B:** Diesem Modell folgend ist der in weiblichen *td1*-mutanten Infloreszenzen beobachtete Phänotyp auf den Funktionsverlust mehrerer zueinander redundanter Gene zurückzuführen. Die in grau dargestellten Kreise spiegeln die jeweiligen Größen der Infloreszenzmeristeme schematisch wieder.

## 2. Differentielle Expression von *td1*

Ein zweiter Erklärungsansatz beschränkt sich auf das *td1* Expressionsniveau. Es ist denkbar, dass die starke Fasziation des weiblichen Infloreszenzmeristems durch den alleinigen Verlust der TD1 Funktion hervorgerufen wird. Dass innerhalb wildtypischer Infloreszenzmeristeme keine *td1* Expression nachgewiesen werden konnte, lässt sich durch eine reduzierte Expression erklären, die womöglich ebenfalls eine Konsequenz der Selektion auf die Kulturform *Zea mays* ist. Der durch Mutation des *td1* Gens hervorgerufene vollständige Verlust der *td1* Expression resultiert in einer massiven Vergrößerung des Infloreszenzmeristems (Abb. 32A).

Dass durch die Regulation der Transkriptionsrate eines einzelnen Gens morphologische Veränderungen zwischen Teosinte und *Zea mays* hervorgerufen werden können, wurde durch die Klonierung und Analyse des *teosinte branched1 (tb1)* Gens gezeigt. So konnten Doebley et al. 1997

zeigen, dass die in *Zea mays* im Vergleich zu Teosinte stark reduzierte Seitentriebbildung direkt mit einer gesteigerten Transkriptionsrate des *td1* Gens in *Zea mays* korreliert

### 3.TD1-abhängiger *long distance signaling*-Mechanismus

Ein dritter Erklärungsansatz postuliert die Existenz eines *long distance signaling* Mechanismus. Da aufgrund der experimentellen Daten nicht ausgeschlossen werden kann, dass *td1* innerhalb der Infloreszenzmeristeme nicht exprimiert wird, wäre es denkbar, dass die in den *spikelet pair* Meristemen gezeigte *td1* Expression Einfluss auf die Regulation der Stammzellpopulation im Infloreszenzmeristem ausübt.

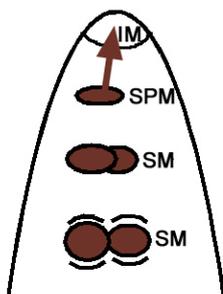
Diesem Szenario folgend wird durch einen noch nicht identifizierten Signaltransduktionsweg ausgehend von Zellen des *spikelet pair* Meristems, nach TD1-abhängiger Aktivierung ein Signal freigesetzt, das letztendlich im Infloreszenzmeristem wahrgenommen wird. Die Perzeption dieses unbekanntes Signals vermittelt die Kontrolle der Stammzellpopulation, womöglich über eine transkriptionelle Regulation eines zu *WUSCHEL* orthologen Transkriptionsfaktors in Mais (Abb. 33).

Zwei Beobachtungen stehen im Einklang mit dieser Hypothese:

1.: Durch Analyse der *bif2*-Mutation konnte gezeigt werden, dass Infloreszenzmeristeme, die aufgrund eines *bif2*-Funktionsverlusts keine *spikelet pair* Meristeme anlegen, zu einem beträchtlichen Anteil faszieren (McSteen und Hake, 2001). Dies kann als ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen Infloreszenz- und *spikelet pair* Meristemen betrachtet werden. In Bezug auf das entworfene Modell würde dies bedeuten, dass in *bif2*-mutanten Pflanzen die Quelle des freigesetzten Signals nicht mehr vorhanden ist.

2.: Die funktionale Analyse des *GmNARK* Gens aus Soja zeigte, dass *CLV1*-ähnliche Rezeptorkinasen in sogenannten *long distance signaling* Prozessen involviert sind. *GmNARK* codiert für eine *CLV1*-ähnliche Rezeptorkinase, die in Blättern exprimiert wird und über einen *long distance signaling* Mechanismus bei der Regulation der Entwicklung symbiotischer Wurzelknöllchen mitwirkt (Searle et al., 2003).

Eine experimentelle Möglichkeit diesen Erklärungsansatz zu überprüfen könnte darin bestehen, eine Infloreszenzmeristem-spezifische cDNA Bank zu erstellen, um diese auf Abwesenheit eines *td1* Transkripts zu durchmustern.



**Abb. 33: Schematische Darstellung eines möglichen TD1-abhängigen *long distance signaling* Mechanismus.** Diesem Modell folgend wird *td1* in *spikelet pair* Meristemen exprimiert. Nach TD1-abhängiger Aktivierung wird ein Signal freigesetzt, das nach Perzeption innerhalb des Infloreszenzmeristems die Kontrolle der Stammzellpopulation reguliert.

#### 4.5 Abschließende Bemerkungen

Die hohe Sequenzverwandtschaft zwischen *td1* und *CLV1* sowie die erstellte phylogenetische Analyse erlauben die Schlussfolgerung, dass *td1* und *CLV1* orthologe Gene darstellen. Diese Annahme wird durch die beobachteten phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *td1* und *clv1* Mutanten unterstützt. Somit ist *td1* neben *fae2* das zweite Gen, das in *Zea mays* charakterisiert werden konnte, das eine Funktion innerhalb eines CLAVATA-Signaltransduktionswegs ausübt.

Die in *Arabidopsis* gezeigte funktionelle Redundanz *CLV1*-ähnlicher Rezeptorkinasen wirft die Frage auf, warum die Evolution funktionale Redundanz innerhalb unterschiedlicher Signaltransduktionswege bevorzugt. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, ist das Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelldifferenzierung innerhalb von Meristemen einer der kritischen Faktoren für eine normale Entwicklung einer Pflanze. Es ist denkbar, dass durch die Existenz mehrerer LRR-Rezeptorkinasen, die zu *CLV1* partiell redundante Funktionen ausüben, eine präzisere Regulation dieses Gleichgewichts erfolgen kann. Durch die Expression mehrerer *CLV1*-ähnlicher Rezeptorkinasen, die sich ihrerseits durch unterschiedliche biochemische Affinitäten zu einem oder mehreren Liganden auszeichnen, kann einzelnen Zellen die Kompetenz gegeben werden, ihre relative Lage innerhalb eines Gewebes präziser zu definieren.

Ein ähnliches Prinzip der Sensitivitätssteigerung ist in *Arabidopsis* innerhalb einer Rezeptorfamilie beobachtet worden, die die Perzeption von Ethylen vermitteln. Durch die Existenz fünf zueinander redundanter Rezeptorkinasen kann eine Sensitivität über vier Konzentrationsgrößenordnungen hinweg bei der Perzeption von Ethylen gewährleistet werden (Chen und Bleeker, 1995).

Ein weiterer evolutionärer Vorteil könnte in der Möglichkeit bestehen, die zueinander redundanten Rezeptorkinasen zeitlich und/oder räumlich differentiell zu exprimieren.

In diesem Zusammenhang erscheint es als sinnvoll, die Maissequenzen *Kin1*, *Kin2* und *Kin3* weiter zu charakterisieren. Aufgrund der antizipierten funktionellen Redundanz könnte eine Analyse dieser bisher noch nicht detailliert charakterisierten Maissequenzen in *td1*-mutanten Hintergründen weitere Einblicke in den - auch in *Zea mays* - konservierten CLAVATA-Signaltransduktionsweg erlauben.

## 5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit die Balance zwischen der Teilungsrate der Stammzellen in der zentralen Zone und der Zelldifferenzierung in der peripheren Zone zu kontrollieren, ist eine charakteristische Eigenschaft pflanzlicher Meristeme, die durch den CLAVATA-Signaltransduktionsweg kontrolliert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, *CLVI*-ähnliche Gene aus *Zea mays* mit Hilfe eines auf Sequenzhomologie basierenden PCR Ansatzes zu isolieren und zu charakterisieren. Durch eine zu Beginn dieser durchgeführte vergleichende Sequenzanalyse *CLVI*-ähnlicher Gene aus *Arabidopsis* und Reis, konnten konservierte Bereiche innerhalb der Kinasedomänen identifiziert werden, die das Design von degenerierten Primern erlaubten. Durch Verwendung der degenerierten Primer sind zu Beginn dieser Arbeit fünf unterschiedliche cDNAs mit signifikanten Sequenzhomologien zu *CLVI* aus isoliert worden.

Eine genauere phylogenetische Analyse zeigte, dass die Kinasesequenz *Kin5* den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *CLVI* darstellte. Darüber hinaus zeigte die phylogenetische Rekonstruktion, die Existenz zweier Unterfamilien *CLVI*-ähnlicher Gene.

Die molekulare Charakterisierung der vollständigen *Kin5* DNA Sequenz zeigte, dass *Kin5* für eine *CLVI*-ähnliche LRR-Rezeptorkinase kodiert, die aus 21 vollständigen extrazellulär gelegenen LRR-Motiven, die ihrerseits von paarigen Cysteinresten flankiert werden, sowie einer intrazellulären Kinasedomäne mit abgeleiteter Serin/Threonin Spezifität aufgebaut ist. *Kin5* spezifische *Northern*- und *Real time* RT-PCR Analysen zeigten, dass *Kin5* Transkripte in unterschiedlichen Mengen in allen Gewebetypen nachgewiesen werden können. Durch Analyse der zellulären *Kin5* Expression anhand durchgeführter *in situ* Hybridisierungen konnte *Kin5* spezifische Expression in *spikelet pair*-, *spikelet*- und Blütenmeristemen detektiert werden. Neben der meristemspezifischen Expression konnte *Kin5* Expression auch in den lateral angelegten Blütenprimordien nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *Kin5* mit Hilfe rekombinanter Inzuchtlinien ergab, dass *Kin5* in unmittelbarer Umgebung zu der Mutation *td1* kartiert. Die anschließende molekulare Analyse unterschiedlicher *td1* Allele zeigte, dass sie alle einen Defekt innerhalb des in dieser Arbeit isolierten *Kin5* Gens darstellen und somit beide Loci als identisch zu betrachten sind.

Die phänotypische Charakterisierung *td1*-mutanter weiblicher Blütenstände zeigte eine starke Vergrößerung des Infloreszenzmeristems sowie moderate Vergrößerungen der *spikelet pair*-, *spikelet*- und Blütenmeristeme. Darüber hinaus konnte in *td1*-mutanten Blüten die Bildung zusätzlicher Blütenorgane beobachtet werden. Die hohe Sequenzverwandtschaft zwischen *td1* und *CLVI* sowie die vergleichbaren Phänotypen unterstützen die Annahme, dass *td1* das zu *CLVI* orthologe Gen in *Zea mays* repräsentiert.

## 6 Literatur

- Abbe, E.C. and Stein, O.L.** (1954). The growth of the shoot apex in maize: embryogeny. *Am J Bot* **41**, 285-293.
- Ambrose, B.A., Lerner, D.R., Ciceri, P., Padilla, C.M., Yanofsky, M.F. and Schmidt, R.J.** (2000). Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Mol Cell* **5**, 569-579.
- Asubel, F., et al.** (Hrsg. 1996). Current protocols in molecular biology. John Wiley & sons. New York.
- Barton, M.K. and Poethig, R.S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and *SHOOT MERISTEMLESS* mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Becraft, P. W.** (2002): Receptor Kinase Signaling In Plant Development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **18**, 163-192.
- Bird P., Gething M.J. and Sambrook J.** (1990). The functional efficiency of a mammalian signal peptide is directly related to its hydrophobicity. *J Biol Chem.* **265**:8420-25.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M. and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-9.
- Burr, B. and Burr, F.A.** (1991). Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *TIG* **7**, 55-60.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R.A.** (2000). *ASYMMETRIC LEAVES1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-71.
- Chen, Q.G. and Bleecker, A.B.** (1995). Analysis of ethylene signaltransduction kinetics associated with seedling-growth response and chitinase induction in wild-type and mutant *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **108**, 597-607.
- Cheng, P. C., Greyson, R.I. and Walden, D.B.** (1983). Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Amer J Bot* **70**, 450-462.
- Chomet, P., Lisch, D., Hardeman, K.J., Chandler, V.L. and Freeling, M.** (1991). Identification of a regulatory transposon that controls the *Mutator* transposable element system in maize. *Genetics* **129**, 261-270.
- Clark, S.E., Running, M.P. and 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., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z. and Meyerowitz, E. M.** (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-75.
- Clark, S. E., Williams, R.W. and 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.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: Version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-22.
- Deleu, W.K.** (2002). Molecular and functional analysis of *AGL2*-like MADS-box genes in maize. *Dissertation Universität Köln*
- Dermen, H. and S., R.N.** (1973). Ontogenetic study of floral organs of peach (*Prunus persica*) utilizing cytohimeral plants. *Amer J Bot* **60**, 283-291.
- DeYoung, B.J., Schrage, K.J., Pate, K., Jones, J. D., Muskett, P., Dean, C. and Clark, S.E.** (2002). Signaling in the *Arabidopsis* meristem: BAM, BAM and a Club. *Arabidopsis Conference abstract* 4-08
- DeYoung, B.J. and Clark, S.E.,** (2001). Signaling through the *CLAVATA1* receptor complex. *Plant Mol Biol* **46**, 505-513.
- Diévert, A. and Clark, S.E.,** (2003). Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 507-516.
- Diévert, A., Dalal, M., Tax, F.E., Lacey, A.D., Huttly, A., Li, J. and Clark, S.E.** (2003). *CLAVATA1* Dominant-Negative Alleles Reveal Functional Overlap between Multiple Receptor Kinases That Regulate Meristem and Organ Development. *Plant Cell* **15**, 1198-1211.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *TIG* **9**, 302-307.
- Doebley J. and Stec A.** (1991): Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* **129**, 285–295.
- Doebley J and Stec A.** (1993): Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F2 populations. *Genetics* **134**, 559–570.
- Doebley J., Stec A. and Hubbard L.** (1997): The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**, 485–488.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. and Laux, T.** (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* **10**, 101–113.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. and Meyerowitz, E.M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-4.
- Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A.P., Li, J.M., Hunter, T. and Chory, J.** (2000). Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol* **123**, 1247–1255.

- Gaut, B.S. and Doebley, J.F.** (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6809–6814.
- Hanks, S.K. and Quinn, A.M.** (1991). Protein-kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* **200**, 38–62.
- Hirt, H.** (1997). Multiple roles of MAP kinases in signal transduction in plants. *Trends Plant Sci* **2**, 11-15.
- Huse, M. and Kuriyan, J.** (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282.
- Ishiguro, S., Watanabe, Y., Ito, N., Nonaka, H., Takeda, N., Sakai, T., Kanaya, H. and Okada, K.** (2002). *SHEPHERD* is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *Embo J* **21**, 898-908.
- Jackson, D. P.** (1991). In situ hybridisation in plants. In: *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Jackson, D., Veit, B. and Hake, S.** (1994). Expression of maize *knotted1*-related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* **120**, 405-413.
- Jackson, D. and Hake, S.** (1998). The genetics of ear fasciation in maize. *Maize newsletters* **38:2**
- Jackson, D. and Hake, S.** (1999). Control of phyllotaxy in maize by the *abphyll1* gene. *Development* **126**, 315–323.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E. and 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.
- Kayes, J.M. and Clark, S.E.** (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843-51.
- Kerstetter, R.A. and Hake, S.** (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell* **9**, 1001-10.
- Kerstetter R.A., Laudencia-Chinguanco, D., Smith, L.G. and Hake S.** (1997). Loss of function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Development* **124**, 3045–3054.
- Kim, C.H., Jeong, D.H. and An, G.H.** (2000). Molecular cloning and characterization of OsLRK1 encoding a putative receptor-like protein kinase from *Oryza sativa*. *Plant Sci* **152**,17–26.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J.** (1994). The leucine-rich repeat. A versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**, 415–421.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J.** (1995) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* **37**, 183–186.

- Kobe, B. and Kajava, A.V.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 725-732.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Masatoshi Nei, M.** (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J. and Jurgens, G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.
- Leyser, H.M.O. and F., I.J.** (1992). Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **116**, 397-403.
- Lisch, D.** (2002). *Mutator* transposons. *Trends Plant Sci* **7**, 498-504.
- Long, J.A. and 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. and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-9.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-15.
- McSteen, I., Laudencia-Chingcuanco, I., and Colasanti, I.** (2000). A floret by any other name: Control of meristem identity in maize. *Trends Plant Sci* **5**, 61–66.
- McSteen, P. and Hake, S.** (2001). *barren inflorescence2* regulates axillary meristem development in the maize inflorescence. *Development* **128**, 2881-2891.
- Mühlhardt, C.** (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Neuffer, M.G., Coe E.H. and Wessler, S.R.** (1997). Mutants of maize. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Nielsen, H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Orr, A.R., Haas, G. and Sundberg M.D.** (1997). Organogenesis of *fascicled* ear mutant inflorescences in maize (Poaceae). *Am J Bot* **84**, 723–734.
- Robertson, D.S.** (1978). Characterization of a *Mutator* system in maize. *Mutat Res* **51**, 21-28.
- Rojo, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V. and Fletcher, J.C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969–977.
- Sambrooke, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Satina, S.** (1940). Demonstrations of three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer J Bot* **27**, 895-905.

- Satina, S. and Blakeslee, A.F.** (1941). Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development of leaf and flower. *Amer J Bot* **28**, 862-871.
- Schmidt, A.** (1924). Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot Arch* **8**, 245-404.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G. and 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.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J. and Gresshoff PM.** (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a *CLAVATA1*-like receptor kinase. *Science* **299**, 109-112.
- Sharma, V.K., Carles, C. and Fletcher, J.C.** (2003). Maintenance of stem cell populations in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11823-29.
- Shiu, S.H. and Bleeker, A.B.** (2001). Plant receptor-like kinase gene family: Diversity, function, and signaling. *Sci. STKE* **2001**, RE22.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Steeves, T.A. and Sussex, I.M.** (1989). Patterns in Plant Development. (New York: Cambridge University Press), 895-905.
- Stewart, R.N. and Burk, L.G.** (1970). Independence of tissue derived from apical layers in ontogeny of the tobacco leaf and ovary. *Amer J Bot* **57**, 1010-1016.
- Stone, J.M., Trotochaud, A.E., Walker, J.C. and Clark, S.E.** (1998). Control of meristem development by *CLAVATA1* receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol* **117**, 1217-25.
- Sussex, I. M.** (1955). Morphogenesis in *Solanum tuberosum* L.: Experimental investigation of leaf dorsoventrality and orientation in the juvenile shoot. *Phytomorphology* **5**, 286-300.
- Taguchi-Shiobara, F., Yuan Z., Hake S. and Jackson D.** (2001). The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes Dev* **15**, 2755-66.
- Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. and 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.
- Tsiantis, M. and Hay, A.** (2003). Comparative plant development: the time of the leaf? *Nature Rev Genetics* **4**, 169-180.
- Vaughn, J. G.** (1952). Structure of the angiosperm apex. *Nature* **169**, 458-459.
- Vollbrecht E., Reiser, L. and Hake S.** (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development* **127**, 3161-72.

- Vollbrecht, E., Reiser, L. and Hake, S.** (2000). Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development* **127**, 3161-3172.
- Walbot, V.** (2000). Saturation mutagenesis using maize transposons. *Curr Opin Plant Biol.* **3**, 103-107.
- Weigel, D. and Jürgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-4.
- Williams, R.W., Wilson, J.M. and Meyerowitz, E.M.** (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis CLAVATA1* signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10467-72.
- Yokoyama, R., Takahashi, T., Kato, A., Torii, K.U. and Komeda, Y.** (1998). The *Arabidopsis* ERECTA gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. *Plant J.* **15**, 301–310.
- Zheng, T. and Nicchitta, C. V.** (1999). Structural Determinants for Signal Sequence Function in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **274**, 36623–36630.

#### **Internet Referenzen:**

---

Brook Haven National Laboratory (BNL)	<a href="http://burr.bio.bnl.gov/acemaz.html">http://burr.bio.bnl.gov/acemaz.html</a>
<i>CLUSTALW</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html</a>
DDBJ-Datenbank	<a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp">http://www.ddbj.nig.ac.jp</a>
MaizeGDB-Datenbank	<a href="http://www.maizegdb.org/">http://www.maizegdb.org/</a>
NCBI-Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Maize Co-operative Genetic Stock Center	<a href="http://www.ag.uiuc.edu/maize-coop">http://www.ag.uiuc.edu/maize-coop</a>
<i>SMART</i>	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
<i>Target P V1.0</i>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>

## Anhang

NCBI- bzw. DDBJ- Datenbank Annotationen der in der phylogenetischen Rekonstruktion verwendeten Sequenzen:

CLV1	NP_177710
RLK1 <i>A. thaliana</i>	NP_201371
RLK2 <i>A. thaliana</i>	NP_190536
RLK3 <i>A. thaliana</i>	NP_193760
RLK4 <i>A. thaliana</i>	NP_180875
RLK5 <i>A. thaliana</i>	NP_173166
OsLRK1	AAF73373
RLK1 <i>O. sativa</i>	AAL79717
RLK2 <i>O. sativa</i>	NP_919058
GmRLK1	AAF91322
GmRLK2	AAF91323
GmRLK3	AAF91324
GmClv1a	T50851
GmNARK	AAN74865
RLK <i>P. sativum</i>	CAD42181
RLK <i>L. japonicus</i>	CAD42335
RLK <i>S. duneii</i>	AY061836

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe 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 zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen nicht veröffentlicht worden ist sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. W. Werr betreut worden.

## Abstract

Development of the aerial parts of higher plants depends on the activity of meristems, the formative regions that continuously initiate new organs at their flanks. Morphologically and functionally, meristems can be subdivided into distinct domains, i.e. a central zone maintaining the stem cells and a peripheral zone where organs are formed.

In *Arabidopsis*, analysis of fasciated mutants has identified some of the genes involved in maintaining the balance between stem cells and cells destined for subsequent developmental steps. Mutations in the genes involved in the CLAVATA signaling pathway lead to increased cell numbers in meristems. The current working model postulates that the CLAVATA3 ligand is secreted from stem cells and binds to a receptor complex containing CLAVATA1, CLAVATA2, and other signal transducers. Activation of the receptor results in the restriction of transcription of *WUSCHEL*, a positive regulator of stem cell identity.

This thesis reports on the isolation and characterization of a LRR-receptor kinase with high degree of homology to the *Arabidopsis* CLAVATA1 protein, by using a homology-based PCR approach. Mapping of the gene isolated, places it in the close vicinity of the *thick tassel dwarf (td1)* locus. Investigation of the *td1-R* and *td1-nickerson* alleles reveals that they are identical and that they display a deletion within the 5'-signal sequence probably, resulting in false protein targeting.

Sequence analysis of several *Mutator*-tagged *td1* populations reveals the existence of various *Mutator* element insertions within the *td1* locus. Phenotypically, *td1* mutants affect various aspects of development in both the female and male inflorescence, displaying severely fasciated female inflorescence meristems as well as the formation of additional floral organs.

The data as a whole indicate that *td1* is the maize orthologue of the *Arabidopsis* CLAVATA1 (*CLV1*) gene. This assumption is further supported by a phylogenetic analysis, which demonstrates that *td1* and *CLV1* are highly related.

Analysis of the expression pattern reveals that *td1* is expressed within spikelet-, spikelet pair and floral meristems of female and male inflorescences. The *td1* phenotype and expression pattern are discussed with respect to the evolution of maize.