

Funktionale Analyse und Identifizierung
potentieller Zielgene
von *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE*
in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung eines Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Ingo Seeliger
aus Bonn

Funktionale Analyse und Identifizierung
potentieller Zielgene
von *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE*
in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung eines Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Ingo Seeliger
aus Bonn

Berichterstatter (Gutachter):

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

17.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XII
Kurzzusammenfassung	XIII
Abstract	XIV
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Sprossapikalmeristem (SAM)	1
1.2. <i>DORNRÖSCHEN</i> und <i>DORNRÖSCHEN-LIKE</i>	2
1.2.1. Expression von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i>	3
1.2.2. Genetische Interaktion zwischen <i>DRN</i> und <i>DRNL</i>	4
1.2.3. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> im regulatorischen Netzwerk von Auxin	5
1.3. Stomataentwicklung	6
1.4. Zellzyklus	9
1.4.1. Mitotische Zellzyklen	9
1.4.2. Zellzykluskontrolle	10
1.4.3. Endoreplikation.....	13
1.5. Zielsetzung.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.1.1. Chemikalien	16
2.1.1.2. Kits	17
2.1.1.3. Medien	17
2.1.1.4. Antibiotika	18

2.1.2. Biologisches Material.....	19
2.1.2.1. Bakterienstämme	19
2.1.2.2. Vektoren.....	19
2.1.2.3. Enzyme	20
2.1.2.4 Oligonukleotide	21
2.1.2.5. Pflanzenmaterial	21
2.1.3. Geräte	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Isolation von Nukleinsäuren.....	23
2.2.2. Erstellen von Gen-Konstrukten, Primerdesign und Sequenzanalysen am Computer.....	23
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.3.1. PCR zur Amplifikation Gen-Sequenzen aus genomischer DNA	23
2.2.3.2. Kolonie-PCR	24
2.2.3.3. Genotypisierung.....	25
2.2.4. Klonierung von PCR Fragmenten.....	25
2.2.5. Agarosegelelektrophorese.....	25
2.2.6. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	26
2.2.7. Ligation.....	26
2.2.8. Sequenzierung	27
2.2.9. Transformationen	27
2.2.9.1. Bakterientransformationen.....	27
2.2.9.2. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.2.10. Selektion und Anzucht transgener Pflanzen	28
2.2.11. Induktion mit Dexamethason	29
2.2.12. Mikroskopie	29
2.2.12.1. Lichtmikroskopie	29
2.2.12.2. Rasterelektronenmikroskopie.....	29

2.2.12.3. Konfokale Mikroskopie	29
2.2.13. Transkriptomanalysen	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1. Epidermisspezifische Expression von <i>DORNRÖSCHEN</i> und <i>DORNRÖSCHEN-LIKE</i>	32
3.1.1. Klonierung von <i>ATML1</i> Promotor-Konstrukten	32
3.1.2. Phänotypische Auswirkungen ektopischer <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> Expression .	33
3.1.2.1. Makroskopische Effekte und der Habitus von <i>ATML1::DRN</i> und <i>ATML1::DRNL</i> Pflanzen.....	33
3.1.2.2 Auswirkungen ektopischer Expression auf mikroskopischer Ebene ..	35
3.2. <i>DRN</i> und <i>DRN-LIKE</i> überschreiben zelluläre Muster und Identitäten im Hypokotyl	42
3.2.1 Überzählige Zellen im Hypokotyl exprimieren Marker der Stomatazelllinie	43
3.2.2. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> agieren unabhängig von der Genfunktion von Regulatoren der Stomatazelllinie.....	45
3.3. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> verzögern Differenzierung und fördern die Überschreitung des G1/S-Kontrollpunktes im Zellzyklus	47
3.3.1. Terminale Differenzierung unterdrückt das durch die ektopische Expression von <i>DRN</i> hervorgerufene Zellteilungspotential	47
3.3.2. Kernimport von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> führt zu Überproliferation in der Stomatazelllinie und fördert Endoreplikation in epidermalen Grundzellen.....	50
3.4. Potentielle Zielgene von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i>	55
3.4.1. Transkriptomanalysen von <i>ATML1::DRN/DRNL</i> und <i>ATML1::DRN-GR/DRNL-GR</i>	55
3.4.2. S-Phase spezifische Gene sind in <i>ATML1::DRN/DRNL</i> und <i>ATML1::DRN-GR/DRNL-GR</i> Pflanzen differentiell exprimiert.....	57
3.4.3. <i>ATML1::DRN/DRNL</i> und <i>35S::E2Fa/E2Fa-DPa</i> Pflanzen erzeugen eine ähnliche Sekundärantwort des Transkriptoms.....	63
4. Diskussion	65

4.1. DRN und DRNL agieren als Transkriptionsfaktoren.....	65
4.2. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> verändern zelluläre Muster in der Epidermis	66
4.2.1. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> erzeugen Zellteilungspotential und verändern Zellidentitäten im Hypokotyl.....	66
4.2.2. Die von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> erzeugten Phänotypen sind abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen.....	68
4.2.3. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> agieren unabhängig von Schlüsselregulatoren der Stomataentwicklung	69
4.2.4. Der Blattphänotyp von <i>ATML1::DRN</i> und <i>ATML1::DRN</i> Überexpressionslinien	71
4.3. <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> fördern die Überschreitung des G1/S Kontrollpunktes im Zell-Zyklus.....	72
4.4. Transkriptomanalysen.....	73
4.4.1. S-Phase spezifische Gene sind in Abhängigkeit von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> differentiell exprimiert	74
4.4.2. Die Überexpression von <i>E2Fa</i> und <i>DRN/DRNL</i> erzeugt eine ähnliche Sekundärantwort des Transkriptoms	74
4.4.3. Potentielle Zielgene von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i>	75
4.5. Die Rolle von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> im Infloreszenz- und Blütenmeristem	78
4.6. Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung	83
Literatur	85
Danksagung	96
Anhang	97
A.1. Sequenzen	97
A.1.1. Das offene Leseraster von <i>DRN</i>	97
A.1.2. Das offene Leseraster von <i>DRNL</i>	98
A.1.3. 5KB „upstream“ Bereich von <i>ATML1</i>	99
A.2. Vektorkarten	101

A.3. Differentiell exprimierte Gene	104
A.3.1. In Abhängigkeit von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> herunter regulierte Gene	104
A.3.2. In Abhängigkeit von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> hoch regulierte Gene	105
A 4. Korrekturen und Ergänzungen	109
A 4.1. Zellzahlen von Wildtyp, <i>ATML1::DRN</i> und <i>ATML1:DRN-LIKE</i> Keimlingen	109
A 4.2. Chromatin-Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls von Wildtyp, <i>ATML1::DRN</i> und <i>ATML1:DRN-LIKE</i> Keimlingen	111
A.4.2.1. Die Anzahl Zellen mit einem Chromatin-Gehalt von 2C ist in <i>ATML1::DRN/DRNL</i> signifikant erhöht	111
A.4.2.2. In etiolierten Keimlingen reduziert sich die Anzahl von Zellen in der 2C Fraktion	112
A 4.2.3. Apikal-basale Polarität in <i>ATML1::DRN</i> und <i>ATML1:DRNL</i>	114
A 4.3. Aktuelle Erkenntnisse und Schlussfolgerungen	115
Erklärung	116

Abkürzungsverzeichnis

35S	35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus
AS	Aminosäure(n)
<i>A::D</i>	<i>ATML1::DRN</i>
<i>A::DL</i>	<i>ATML1::DRNL</i>
<i>A::D-GR</i>	<i>ATML1::DRN-GR</i>
<i>A::DL-GR</i>	<i>ATML1::DRNL-GR</i>
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>ATML1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Meristem Layer 1 Promoter
AuxREs	englisch: Auxin Response Elements
Col-0	Columbia Wildtyp <i>Arabidopsis thaliana</i>
DNA	englisch Desoxyribonucleic Acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FM	Florales Meristem (Blütenmeristem)
g	Gramm
GFP	englisch: Green Fluorescent Protein
h	englisch: hours
IM	Infloreszenzmeristem
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
N-terminal	Amino-terminal
nuc	englisch: nuclear; im Zellkern
nSZR	nicht-Stomatazellreihe
SZL	Stomatazelllinie
SZR	Stomatazellreihe
PCR	englisch: polymerase chain reaction
YFP	englisch: Yellow Fluorescent Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.: Expression von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> im Sprossapex	4
Abbildung 1.2.: Zelltypübergänge während der Stomataentwicklung	7
Abbildung 1.3.: Die einzelnen Phasen des Zellzyklus	10
Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung des G1/S Übergangs; modifiziert nach Inze and De Veylder, 2006.	12
Abbildung 1.5.: Unterschiede zwischen mitotischen Zellzyklen und Endozyklen.....	14
Abbildung 3.1.: Schema der in dieser Arbeit hergestellten Gen-Konstrukte	32
Abbildung 3.2.: Konfokale Bilder von <i>ATML1::DRN-GFP</i> der T2 Generation	33
Abbildung 3.3.: Hypokotyl 5-10 Tage alter Keimlinge	33
Abbildung 3.4.: Habitus in Seiten- und Aufsicht sowie von isolierten Blättern und Blüten	34
Abbildung 3.5.: Aufnahmen vom Hypokotyl	36
Abbildung 3.6.: Hypokotyl von Embryonen	37
Abbildung 3.7.: Fotografische Aufnahmen des Habitus und konfokale Bilder des Hypokotyls	38
Abbildung 3.8.: Anzahl der Zellen pro Zellreihe und Stomata pro Zellreihe	40
Abbildung 3.9.: Konfokale Bilder der abaxialen Seite von Kotyledonen	41
Abbildung 3.10.: Konfokale Bilder des Hypokotyls 2-4 Tage alter Keimlinge	43
Abbildung 3.11.: Konfokale Bilder des Hypokotyls und der abaxialen Seite von Kotyledonen.....	46
Abbildung 3.12.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse	48
Abbildung 3.13.: Anzahl (absolut) epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse	49
Abbildung 3.14.: Anzahl der Zellen pro Zellreihe	50
Abbildung 3.15.: Konfokale Bilder des Hypokotyls 3-5 Tage alter Keimlinge	52

Abbildung 3.16.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse.....	53
Abbildung 3.17.: Anzahl epidermaler Zellen der abaxialen Seite von Blättern in der jeweiligen C-Klasse	54
Abbildung 3.18.: Differentiell exprimierte Gene in <i>ATML1::DRN</i> und <i>ATML1::DRNL</i>	56
Abbildung 3.19.: Differentiell exprimierte Gene in <i>ATML1::DRN-GR</i> und <i>ATML1::DRNL-GR</i>	57
Abbildung 3.20.: Vorgehensweise zur Eingrenzung potentieller Zielgene	58
Abbildung 3.21.: Gemeinsam differentiell exprimierte Gene in <i>35S::E2Fa-DPa</i> und <i>ATML1::DRN/DRNL</i>	59
Abbildung 3.22.: Clusteranalyse	60
Abbildung 3.23.: Clusteranalyse	61
Abbildung 3.24.: Clusteranalyse	64
Abbildung A.1.: pJet 1.2 Vektor	101
Abbildung A.2.: TOPO pCR II Vektor.....	102
Abbildung A.3.: pGPTV-Kan Vektor.....	103
Abbildung A.4.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls.....	110
Abbildung A.5.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls 2 Tage alter Keimlinge in der jeweiligen C-Klasse	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.: Chemikalien	16
Tabelle 2.2.: Kits.....	17
Tabelle 2.3.: Antibiotika	18
Tabelle 2.4.: Vektoren.....	19
Tabelle 2.5.: Enzyme	20
Tabelle 2.6.: Oligonukleotide	21
Tabelle 2.7.: <i>ATML1</i> Promotor Linien	22
Tabelle 2.8.: Reporterlinien und Mutanten.....	22
Tabelle 2.9.: Geräte	22
Tabelle 2.10.: Standard-PCR (High Fidelity).....	24
Tabelle 2.11.: Kolonie-PCR	24
Tabelle 2.12.: Liste der in den Transkriptomanalysen untersuchten RNAs	31
Tabelle 3.1.: Zellanzahl/Zellreihe und Stomataanzahl/Zellreihe	40
Tabelle 3.2.: DNA-Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls.....	49
Tabelle 3.3.: Zellanzahl/Zellreihe und Stomataanzahl/Zellreihe	50
Tabelle 3.4.: DNA-Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls.....	53
Tabelle 3.5.: DNA-Gehalt epidermaler Zellen von der abaxialen Seite von Blättern. 54	
Tabelle 3.6.: In <i>35S::E2Fa-DPa</i> hoch regulierte S-Phase Gene.....	62
Tabelle A.1.: In Abhängigkeit von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> herunter regulierte Gene.....	105
Tabelle A.2.: In Abhängigkeit von <i>DRN</i> und <i>DRNL</i> hoch regulierte Gene	108
Tabelle A.3.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls.....	110
Tabelle A.4.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls 2 Tage alter Keimlinge in der jeweiligen C-Klasse	113
Tabelle A.5.: Statische Signifikanz der Verteilung epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse	114

Kurzzusammenfassung

Die beiden AP2 Transkriptionsfaktoren *DORNRÖSCHEN* (*DRN*) und *DORNRÖSCHEN-LIKE* (*DRNL*) kontrollieren redundant die Embryonalentwicklung und die Organogenese am Sproßapex. Die epidermisspezifische Überexpression von *DRN* oder *DRNL* unter Kontrolle des *ATML1* Promotors erzeugt Zellteilungen und Hyperplasien in epidermalen Zellen des Hypokotyls sowie Musterbildungsdefekte in Form von Stomataclustern in der Epidermis von Kotyledonen und Blättern.

Expressionsanalysen und Kreuzungen mit Mutanten von Schlüsselregulatoren der Stomatazelllinie zeigten, dass diese Phänotypen unabhängig von der Funktion dieser Gene sind und *DRN* und *DRNL* eine stimulierende Wirkung auf den Zellzyklus besitzen.

Messungen des DNA-Gehaltes von epidermalen Zellen des Hypokotyls ließen darauf schließen, dass *DRN* und *DRNL*, abhängig von Differenzierungsstatus der Zellen, sowohl Zellteilungen als auch Endoreplikation fördern können. Dies deutete darauf hin, dass *DRN* und *DRNL* den G1/S-Übergang des Zellzyklus positiv beeinflussen. Differentiell exprimierte Gene aus Transkriptomanalysen transgener *ATML1::DRN/DRNL* Linien bestätigten diese Annahme, indem sie eine Schnittmenge mit differentiell exprimierten Genen aus Transkriptomanalysen aufwiesen, die im Rahmen zu Studien des G1/S Übergangs durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse ließen auf eine Funktion für *DRN* und *DRNL* im Meristem schließen, bei der sie in kleinen Populationen von Zellen zusätzliches Teilungspotential erzeugen, welches für das Auswachsen von Organen nötig ist.

Abstract

The two AP2 transcription factors *DORNRÖSCHEN* (*DRN*) and *DORNRÖSCHEN-LIKE* redundantly control embryogenesis and floral organ development in the shoot apex. The epidermisspecific overexpression of either *DRN* or *DRNL* under control of the *ATML1* promotor causes extra cell divisions in the epidermis of the hypocotyl and leads to stomatal clustering in cotyledons and leaves.

Expression and mutant analysis revealed that both *DRN* and *DRNL* act independently from gene functions of the stomatal lineage and that they have a more general role in cell cycle control. Measurement of DNA content in epidermal hypocotyl cells showed that *DRN* and *DRNL* promote both mitotic cell cycles and endocycles indicating that both genes have a role at the G1/S-phase checkpoint.

This suggestion was confirmed by transcriptome analysis of transgenic *ATML1* lines, which showed a strong overlap with differentially expressed genes from published transcriptome data performed for cell cycle studies. These results suggest a role for *DRN* and *DRNL* in creating additional division potential in a small population of cells, which is necessary for organ outgrowth.

1. Einleitung

1.1. Das Sprossapikalmeristem (SAM)

Das Wachstum von Pflanzen und die Bildung von Organen, wie Blättern und Blüten beruht auf der Aktivität des Sprossapikalmeristems (SAM). Das SAM produziert dabei kontinuierlich neue Zellen, die an der Peripherie des Meristems schrittweise zu Organen differenzieren. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung bestimmt dabei im Wesentlichen die Bildung von Organen, was sich im Aufbau des Meristems widerspiegelt.

Das Meristem ist eine hochorganisierte Zellpopulation und besteht aus verschiedenen Zonen und Schichten. Sich langsam teilende Zellen, die für die Selbsterhaltung des Meristems sorgen, befinden sich im Zentrum des Meristems, der zentralen Stammzellzone. Diese Stammzellzone ist umgeben von der peripheren Zone, wo die Zellen die Kompetenz erlangen zu differenzieren, erhöhte Zellteilungsraten aufweisen und Organanlagen entstehen (Besnard et al., 2011; Grandjean et al., 2004). Der Übergang zwischen Proliferation und Differenzierung ist daher eng mit der Kontrolle des Zellzyklus verbunden.

Die Organisation des Meristems unterliegt der Kontrolle zahlreicher Gene und Phytohormone. Die Gene *WUSCHEL* (*WUS*) und *CLAVATA3* (*CLV3*) beispielsweise spielen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Stammzellpopulation. *WUS* erzeugt Stammzellidentität in den Zellen oberhalb seiner Expressionsdomäne (Mayer et al., 1998). *CLV3* ist ein sekretorisches Peptid, welches nicht-zellautonom, als Teil eines Rezeptor-Kinase-Systems die Expression von *WUS* hemmt. *CLV3* Expression ist wiederum von *WUS* abhängig (Fletcher et al., 1999; Kondo et al., 2006; Rieu and Laux, 2009). Zusammen bilden sie einen Rückkopplungsmechanismus, der essentiell für die Homöostase des Meristems und die Kontrolle der Stammzellzahl ist (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000).

Für die Initiierung einer Organanlage bzw. eines Primordiums müssen Subpopulationen von Zellen vermehrt Zellteilungen durchlaufen (Chandler, 2011). Solche positionsbestimmenden Signale, werden beispielsweise durch Auxin vermittelt (Benkova et al., 2009). In früheren Studien wurde gezeigt, dass Auxin

essentiell für die Bildung lateraler Organe ist, da Auxin Perzeption mit der Initiierung von Organanlagen korreliert und Mutanten wie *pin1* (*pin-formed*), deren polarer Auxin Transport gehemmt ist, Infloreszenzen ohne Blüten bilden (Galweiler et al., 1998; Reinhardt et al., 2003).

Zwei Gene, für die gezeigt wurde, dass sie in das Auxin-Netzwerk integriert sind und sowohl Musterbildungsprozesse während der Embryogenese, als auch an der Bildung von Organen im Sprossapex kontrollieren, sind *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE* (Chandler et al., 2007; Chandler et al., 2011a; Chandler et al., 2011b; Kirch et al., 2003; Nag et al., 2007).

1.2. *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE*

DORNRÖSCHEN (*DRN*) und *DORNRÖSCHEN-LIKE* (*DRNL*) auch bekannt als *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1* (*ESR*) und *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2* (*ERS2*) sind nah verwandte Paraloge aus der Familie der sogenannten AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR) Transkriptionsfaktoren. Die AP2-Domäne ist die charakteristische Domäne dieser Proteine, über die in der Regel die DNA-Bindung erfolgt, aber auch Protein-Protein Interaktionen eingegangen werden können (Chandler et al., 2007; Liu et al., 2006; Okamoto et al., 1997; Riechmann and Meyerowitz, 1998). In *Brassica napus* konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in der AP2-Domäne, welche zu einem Austausch von Alanin zu Valin führt, den Verlust der DNA-Bindung zur Folge hat (Liu et al., 2006). Die gleiche Mutation findet sich auch in der *drnl-2* (*bcm-1*) Mutante (Nag et al., 2007).

DRN und *DRNL* bilden zusammen mit *PUCHI* und *LEAFY PETIOLE* eine separate Gruppe innerhalb der AP2 Transkriptionsfaktorfamilie. Eine weitere, für *DRN*, *DRNL* und *PUCHI* spezifische Domäne ist das sogenannte ESR-Motiv. Dies ist eine kurze, C-terminale Aminosäuresequenz, welche eine Funktion als Transaktivierungsdomäne besitzt (Matsuo and Banno, 2008; Nomura et al., 2009).

DRN wurde in zwei unabhängigen genetischen Screens entdeckt. Zum einen bei einem Screen nach Genen, die die Entwicklung des Sprossapikalmeristems kontrollieren. Hierbei wurde die Mutante *drn-D* identifiziert (Kirch et al., 2003). Diese Mutante trägt vier Kopien des 35S Enhancer-Elements aus dem *Cauliflower mosaic virus* (Tissier et al., 1999) im *DRN*-Promotor, was eine lokale Überexpression zur

Folge hat. Dies resultiert in *drn-D* Pflanzen, die ein vergrößertes Meristem besitzen und radialisierte, filamentartige laterale Organe ausbilden.

In einer zweiten Studie wurde gezeigt, dass Überexpression von *DRN* (*ESR1*) die Sprossregeneration aus Kalluskulturen beschleunigt (Banno et al., 2001). Dabei beschleunigte *DRN* nicht nur die Regeneration unabhängig von Cytokinin, sondern auch die Effizienz der Sprossregeneration in Anwesenheit desselben.

DRNL wurde unter anderem durch einen Screen nach Genen entdeckt, die Einfluss auf die Entwicklung von Stamen und Petalen haben. Aufgrund seiner Rolle während der Stamenentwicklung wird *DRNL* auch *B CLASS MODIFIER1* (*BCM1*) genannt (Nag et al., 2007). Die *drnl-2* (*bcm-1*) Mutante verstärkt den *pistillata-5* (*pi-5*) Phänotyp, was zur Ausbildung filamentöser Strukturen im dritten Wirtel der Blüte führt. In der *bcm-1* Mutante selber bilden sich zwar morphologisch erkennbare Stamenprimordien, die aber nicht in der Lage sind auszuwachsen (Nag et al., 2007). Wie auch im Falle von *DRN* beschleunigt die Überexpression von *DRNL* die Sprossregeneration aus Kalluskulturen (Ikeda et al., 2006).

1.2.1. Expression von *DRN* und *DRNL*

DRN und *DRNL* sind schon während der frühen Embryonalentwicklung exprimiert.

DRN Expression ist ab dem Vier-Zell-Stadium im ganzen globulären Embryo zu beobachten und verschiebt sich im Verlauf der Entwicklung in den apikalen Teil des Embryos (Chandler et al., 2007; Kirch et al., 2003). Kurz vor der Samenreife, im „walking stick“ Stadium, beschränkt sie sich auf die Spitzen der Kotyledonen und das SAM. Die Expression von *DRNL* folgt im Wesentlichen dem gleichen Muster, jedoch beginnt sie im globulären Stadium später als die von *DRN*. *DRNL* Expression ist zudem nicht im Zentrum des SAMs, sondern in den Spitzen der Blattprimordien zu beobachten (Chandler et al., 2007; Chandler et al., 2011a; Cole et al., 2009).

In Infloreszenzen sind beide Gene differentiell exprimiert. Der *DRN* Promotor ist im Zentrum von Infloreszenz- und Blütenmeristemen exprimiert.

DRNL Expression ist hingegen nicht im Zentrum von Infloreszenzen zu beobachten, sondern markiert die sich bildenden Primordien an der Peripherie des Infloreszenzmeristems und die Gründerzellen der Blütenorgane im Blütenmeristem (Chandler et al., 2011a; Chandler et al., 2011b). Abbildung 1.1. zeigt die Expression

von *DRN* im Zentrum und die von *DRNL* an der Peripherie des Infloreszenz- und Blütenmeristems (Chandler 2013, unveröffentlicht).

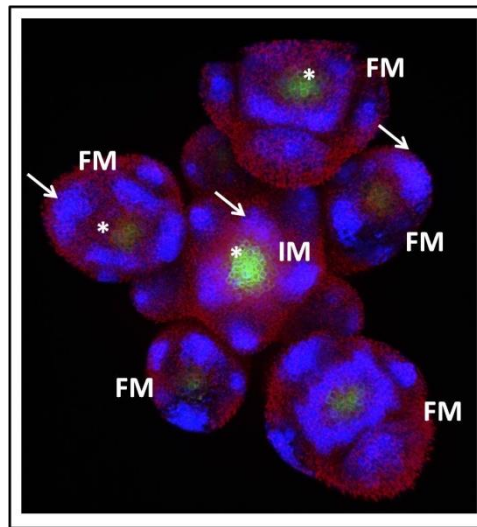


Abbildung 1.1.: Expression von *DRN* und *DRNL* im Sprossapex. Z-Stack konfokaler Bilder, Färbung: *DRN::erGFP* (grün) und *DRNL::erCER* (CERULEAN, blau): Dargestellt ist die Aufsicht auf das Infloreszenz- und Blütenmeristem. Sterne markieren die Expression von *DRN* im Zentrum, Pfeile markieren die Expression von *DRNL* in der Peripherie des IM und FM.

1.2.2. Genetische Interaktion zwischen *DRN* und *DRNL*

Die *DRN* Mutante (*drn-1*) zeichnet sich durch veränderte Zellteilungsmuster während der Embryonalentwicklung aus. Hier besitzen ca. 50% der Embryonen von *drn-1* Mutanten Musterbildungsdefekte in frühen Entwicklungsstadien (Chandler et al., 2007). Die Embryonalentwicklung von *drnl-1* und *drnl-2* (*bcm1*) verläuft hingegen normal (Chandler et al., 2007). *DRN* und *DRNL* sind redundant während der Embryonalentwicklung, was dadurch gezeigt werden konnte, dass 93,8% aller Embryonen von *drn-1 drnl-1* Doppelmutanten Zellteilungsdefekte besitzen (Chandler et al., 2007).

Zusätzlich zeigen Einzelmutanten von *DRN* und *DRNL* Defekte in der Entwicklung von Kotyledonen mit niedriger Penetranz (<10%). Diese äußern sich in fusionierten Kotyledonen, veränderter Kotyledonenanzahl und Kombinationen aus diesen Phänotypen. Die Penetranz dieser Phänotypen erhöht sich in Doppelmutanten auf näherungsweise 50% (Chandler et al., 2007).

„Promotor Swap“ Experimente, bei denen beide Gene jeweils unter dem Promotor des anderen Gens exprimiert wurden, bestätigten dass sie redundant zur Entwicklung der Kotyledonen beitragen (Chandler et al., 2011a). Im Sprossapex ist *DRN* in der Lage den *bcm-1* Phänotyp zu komplementieren, wenn es unter Kontrolle des *DRNL* Promotors exprimiert wird, und kann demnach *DRNL* in seiner Funktion ersetzen (Chandler et al., 2011a). Die Redundanz beider Gene während der Blütenentwicklung zeigt sich auch darin, dass *drn drnl* Pflanzen eine erhöhte Penetranz in Hinblick auf Blütenphänotypen aufweisen (Chandler et al., 2011b).

1.2.3. *DRN* und *DRNL* im regulatorischen Netzwerk von Auxin

Der polare Transport des Phytohormons Auxin ist essentiell für das Entstehen apikal-basaler Polarität und bilateraler Symmetrie (Friml et al., 2003; Liu et al., 1993). Die Rolle von Auxin während der Embryogenese wurde anhand der *PIN* (*PIN-FORMED*) Genfamilie studiert, die für Auxin Efflux Proteine kodieren. Die *PIN* Genfamilie ist höchst redundant und Mutanten höherer Ordnung zeigen Zellteilungsdefekte und entwickeln missgebildete und fusionierte Kotyledonen.

Chandler et al. zeigten 2007, dass die Aktivität des *DR5* Promotors, welche repräsentativ für Maxima der Auxin Antwort ist, und die Lokalisation des *PIN1* Proteins in *DRN* Mutanten verändert sind und *DRN* damit „upstream“ von Auxin agiert.

Ähnliche Defekte wie in Mutanten der *PIN* Familie treten in der Mutante von *MONOPTEROS* (*MP/ARF5*) auf (Berleth and Jurgens, 1993). *MP* gehört zur Familie der Auxin response Faktoren (*ARFs*) und bindet kanonische AuxREs (Auxin Response Elemente) im *DRN* Promotor. *DRN* ist damit ein direktes Zielgen dieses Transkriptionsfaktors (Cole et al., 2009). Funktionsverlust von *MP* führt zum Verlust von *DRN* Expression in den Spitzen der Kotyledonen von Embryonen (Cole et al., 2009). Hierdurch wurde gezeigt, dass *DRN* eine Doppelrolle innerhalb des Auxin Netzwerks einnimmt und sowohl „upstream“ als auch „downstream“ des Auxin Signalweges agiert.

Mutantenanalysen mit den Schlüsselregulatoren des Auxin Transports *PIN1* und *PID* zeigten, dass *DRN* und *DRNL* synergistisch innerhalb des Auxin Netzwerkes agieren, aber unterschiedlich in dieses integriert sind (Chandler et al., 2011a).

Die Primorden von Blütenorganen werden markiert durch die Aktivität des *DR5* Promotors. Chandler et al. (2011) zeigten, dass *DRNL* Expression in Gründerzellen von Blütenorganen der Expression von *DR5* vorangeht und dass Mutationen von kanonischen AuxREs (Auxin Response Elements) im *DRNL* Promotor keine Auswirkungen auf die Expression von *DRNL* während der frühen Organogenese hatten. *DRNL* scheint deshalb während der Spezifizierung von Gründerzellen unabhängig von Auxin oder durch nicht-kanonische Elemente reguliert zu sein.

1.3. Stomataentwicklung

Stomata sind mikroskopisch kleine Öffnungen in der Epidermis von Pflanzen und dienen dem Austausch von CO₂ und Wasserdampf. Das Öffnen und Schließen der Stomata wird bewerkstelligt durch die turgor-vermittelte Formveränderung der hochspezialisierten Schließzellen (engl. guard cells; GCs). Zusammen mit angrenzenden Zellen bilden sie den sogenannten Spaltöffnungsapparat.

Die Entwicklung von Stomata stellt, aufgrund der charakteristischen Struktur und der leichten Zugänglichkeit der Epidermis, ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung zellulärer Musterbildung und Differenzierung dar.

Stomataentwicklung beginnt mit der Differenzierung einer protodermalen Zelle zur sogenannten Meristemoidmutterzelle (engl.: meristemoid mother cell (MMC) und Abb. 1.2. A). Diese durchläuft eine asymmetrische Zellteilung und differenziert zur sog. Meristemoidzelle (B). Diese kann mehrere Zellteilungen durchlaufen bis sie zur Schließmutterzelle (engl.: guard mother cell; GMCs) differenziert (C) und sich mit einer letzten symmetrischen Zellteilung die Schließzellen (engl.: guard cell (GCs)) bilden (D).

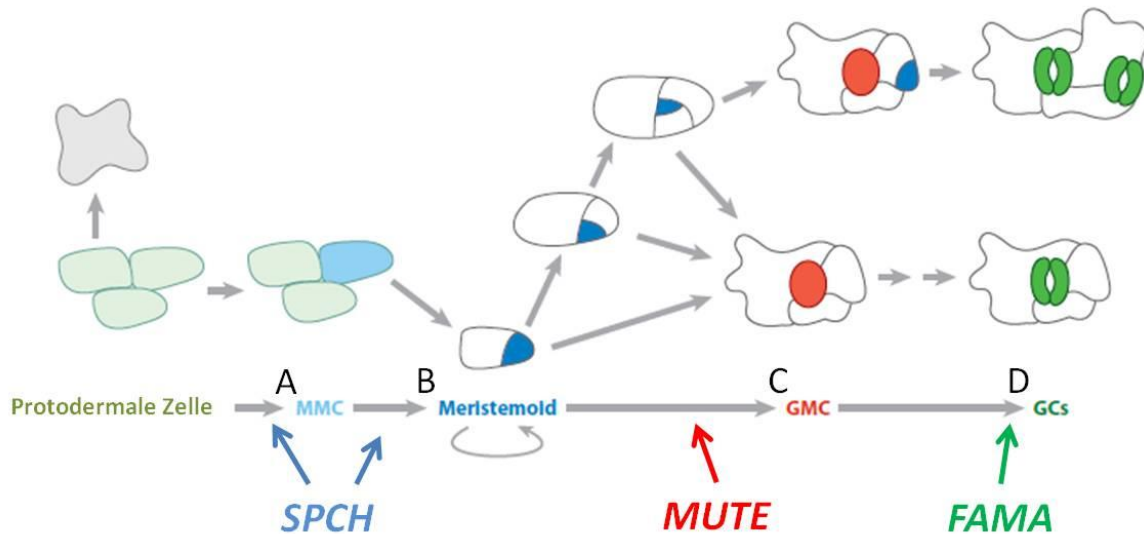


Abbildung 1.2.: Zelltypübergänge während der Stomataentwicklung (Pillitteri and Torii, 2012). MMCs (A), Meristemoide (B), GMCs (C) und GCs (D).

Stomata findet man in der Epidermis von Blättern und Kotyledonen von *A. thaliana* nur einzeln und nie als Paare oder Cluster von mehreren Stomata vorliegend. Mit dem Auftreten von Clustern wird die sogenannte „one cell spacing“-Regel verletzt (Kagan and Sachs, 1991; Peterson et al., 2010).

TMM (**T**OO **M**ANY **M**OUTHS) kodiert für ein LRR-RLP (Leucine-Rich-Repeat Receptor-Like Protein) und ist zusammen mit den RLKs (Receptor-Like Kinases) der *ERECTA* Familie für die Aufrechterhaltung der „one cell spacing“-Regel in Blättern und Kotyledonen verantwortlich. Die Mutante von *TMM* bildet Cluster in der Epidermis von Kotyledonen und Blättern, besitzt hingegen keine Stomata im Hypokotyl (Geisler et al., 1998; Nadeau and Sack, 2002).

Im Hypokotyl verhalten sich *TMM* und Gene der *ERECTA* Familie hingegen antagonistisch. Hier unterdrückt eine Mutation in *ERECTA-LIKE 1* den *tmm* (nicht Stomata)-Phänotyp (Shpak et al., 2005). Die Kontrolle der Stomataentwicklung in Blättern und Kotyledonen unterliegt damit teilweise einem anderen Mechanismus als im Hypokotyl.

TMM zeichnet sich durch eine breite Expression in der Stomatazelllinie (SZL) aus und wird oft als genereller Marker für Zellen verwendet, die an der Stomataentwicklung beteiligt sind (Nadeau and Sack, 2002).

SPEECHLESS (*SPCH*), *MUTE* und *FAMA* gehören zur Familie der bHLH (Basic Helix-Loop-Helix) Transkriptionsfaktoren und kontrollieren die Übergänge zwischen den einzelnen Zelltypen während der Stomataentwicklung.

SPCH ist für die Differenzierung einer protodermalen Zelle zur MMC und die darauf folgende ersten asymmetrische Zellteilung für den Eintritt in die SZL essentiell (Abb.1.2. A und B) (MacAlister et al., 2007).

Funktionsverlust in *SPCH* resultiert in Keimlingen, die keine Stomata ausbilden und nicht überlebensfähig sind. Die gesteigerte Aktivität von *SPCH* hingegen führt zur Ausbildung von Clustern und einer erhöhten Anzahl von Zellen, die in die Stomataentwicklung eintreten (Lampard et al., 2008). Der *SPCH* Promotor ist in allen protodermalen Zellen aktiv, bis er sich mit zunehmender Differenzierung der Epidermis auf die teilungsaktiven Zellen der SZL beschränkt. (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007).

MUTE stoppt die asymmetrischen Zellteilung von Meristemoiden und ist verantwortlich für den Übergang vom Meristemoid zum GMC Stadium (Abb. 1.2. C) (Pillitteri et al., 2007) In *mute* endet die Stomataentwicklung in kreisförmig angeordneten, im Meristemoidstadium arretierten Zellen, die nicht weiter differenzieren. Konstitutive Überexpression von *MUTE* führt dazu, dass alle epidermalen Zellen Schließzellidentität annehmen. Der *MUTE* Promotor ist in Meristemoiden und GMCs aktiv und zeigt Restaktivität in GCs (Pillitteri et al., 2007).

Die Differenzierung von Schließzellen wird durch *FAMA* positiv reguliert, die symmetrische Zellteilung von GMCs hingegen gehemmt (Abb. 1.2. D). Funktionsverlust von *FAMA* resultiert in Überproliferation von GMCs. Überexpression von *FAMA* hingegen führt zur Ausbildung reihenförmig angeordneter Zellen mit Schließzellidentität. Der *FAMA* Promotor ist in GMCs und GCs aktiv (Ohashi-Ito and Bergmann, 2006). Die Promotoren von *MUTE* und *FAMA* markieren damit späte Zellschicksale der Stomataentwicklung.

Stomataentwicklung ist begleitet von symmetrischen und asymmetrischen Zellteilungen und unterliegt deshalb der Kontrolle des Zellzyklus.

CDKB1;1 (cyclin dependent kinase B1;1) interagiert funktional mit *CYCA2;3* und zusammen fördern sie die Teilung von GMCs (Boudolf et al., 2009; Vanneste et al., 2011).

Das D-TYP Cyclin *CYCD4;2*, beispielsweise, kontrolliert Zellteilungen in der Stomata produzierenden Zellreihe im Hypokotyl. Das *Arabidopsis thaliana* Hypokotyl besteht

aus zwei verschiedenen Zellreihen und zwar einer herausragenden, in der keine Stomata auftreten (nSZR) und einer nicht-herausragenden in der sich Stomata bilden (SZR).

Eine Mutation in *CYCD4;2-1* führt zu einer reduzierten Anzahl von Zellen in der Stomatazellreihe (SZR), wohingegen eine Überexpression von *CYCD4* eine Überproliferation sowohl in der SZR als auch in der nicht-Stomatazellreihe (SZR) zur Folge hat (Kono et al., 2007)

Neben Genen, die die Stomataentwicklung im Hypokotyl fördern, wird diese durch verschiedene Gene negativ reguliert.

GLABRA2 (GL2), beispielsweise, reprimiert die Bildung von Stomata in der nSZR (Berger et al., 1998; Hung et al., 1998). *GL2*, ein HD-Zip (Homeodomain-leucine zipper) Protein, ist ein negativer Regulator der Wurzelhaardifferenzierung und ist für die Bildung von Trichomen essentiell (Di Cristina et al., 1996; Rerie et al., 1994).

Der *GL2* Promotor ist spezifisch für die nSZR und markiert damit die Zellreihe in der sich in der Regel (<5%) keine Stomata bilden (Hung et al., 1998).

1.4. Zellzyklus

1.4.1. Mitotische Zellzyklen

Zellproliferation und Differenzierung sind eng mit der Kontrolle des Zellzyklus verbunden.

Die Funktion des Zellzyklus ist im Wesentlichen die Produktion zweier Tochterzellen. Dieser wird grundsätzlich in vier aufeinanderfolgende Phasen unterteilt: Die G1-, S-, G2- und die M-Phase.

Während der S-Phase, die ungefähr die Hälfte der Zeit des Zellzyklus in Anspruch nimmt, wird das Genom der Zelle dupliziert. S-Phase und M-Phase sind unterbrochen von den sogenannten „Gap-Phasen“, die die Zelle für Wachstum, Proteinbiosynthese und zur Produktion von Zellorganellen nutzt, die später auf die zwei Tochterzellen verteilt werden.

Die S-Phase wird gefolgt von der G2-Phase, auf die wiederum die M-Phase folgt.

Die M-Phase ist unterteilt in die Mitose, die Kernteilung, und die Zytokinese, bei der das Zytoplasma geteilt und letztendlich zwei Tochterzellen entstehen. Die M-Phase

ist gefolgt von der G1-Phase, die unter anderem dazu dient, auf äußere Signale zu reagieren, um sich auf einen neuen Zellzyklus vorzubereiten, oder ein Stadium ist, in der die Zelle verharnt. Abbildung 1.3. A zeigt schematisch einen typischen Zellzyklus (Nordman and Orr-Weaver, 2012).

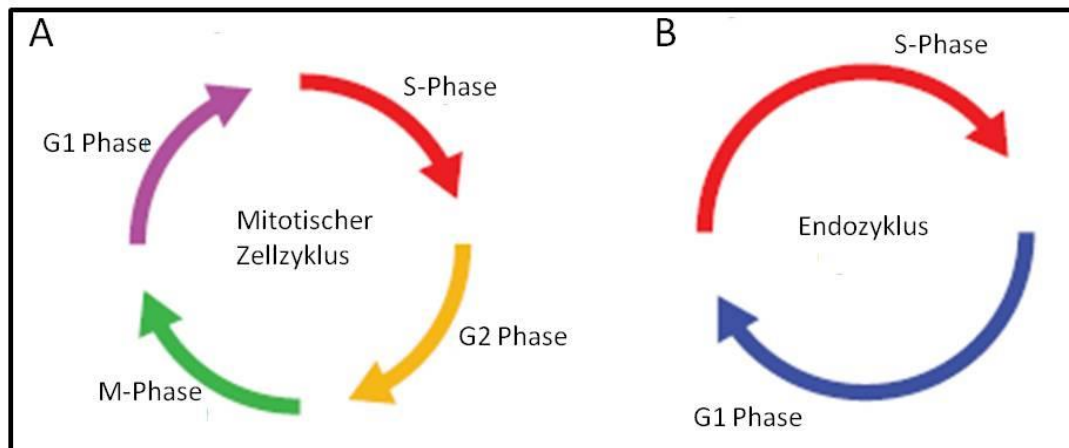


Abbildung 1.3.: Die einzelnen Phasen des Zellzyklus; modifiziert nach Nordman and Orr-Weaver, 2012: Mitotische Zellzyklen (A) und Endozyklen (B).

1.4.2. Zellzykluskontrolle

Die Regulation des Zellzyklus in Pflanzen wird, wie in allen Eukaryoten, von der Aktivität Cyclin abhängiger Kinasen (CDKs) gesteuert (Abb. 1.4. A und B und Abb. 1.5.).

Verschiedene CDK-Cyclin Komplexe phosphorylieren an den Übergängen zwischen den G1/S und G2/M Phasen eine Vielzahl von Substraten, die jeweils die DNA-Replikation bzw. die Mitose einleiten.

Die CDKs erkennen dabei spezifische Bindestellen ihrer Substrate. Die verschiedenen Cycline hingegen spielen eine Rolle bei der Unterscheidung, welches Substrat in Verbindung mit einer CDK phosphoryliert wird.

Neben einer auch in anderen Eukaryoten konservierten CDK, der CDKA (Ferreira et al., 1991; Hirayama et al., 1991), besitzen Pflanzen eine für sie spezifische Klasse von CDKs, die sogenannten B-Typ CDKs, die bisher in keinem anderen Organismus beschrieben wurden (Boudolf et al., 2001; Hirayama et al., 1991; Joubes et al., 2000)

Diese beinhaltet zwei Untergruppen von CDKBs, die CDKB1-Gruppe mit *CDKB1;1* und *CDKB1;2* und die CDKB2-Gruppe mit *CDKB2;1* und *CDKB2;2* (Vandepoele et al., 2002).

Die Konzentration der CDKA bleibt den ganzen Zellzyklus über konstant (Hemerly et al., 1995; Joubes et al., 2004; Porceddu et al., 2001) und sie ist sowohl für den G1/S als auch für den G2/M Übergang essentiell (Magyar et al., 1997; Porceddu et al., 1999; Sorrell et al., 2001).

CDKB1 Transkripte akkumulieren während S, G2 und M-Phase, wohingegen *CDKB2* Expression sich nur auf die G2- und M-Phase beschränkt (Breyne et al., 2002; Menges et al., 2002; Meszaros et al., 2000; Porceddu et al., 2001). Die Akkumulation von CDKB Proteinen entspricht ihrem Expressionsmuster und sie erreichen ihre maximale Kinaseaktivität während der Mitose. *CDKB1* ist essentiell für den G2/M Übergang und für Mitosen (Boudolf et al., 2004a; Porceddu et al., 2001). Des Weiteren ist *CDKB1;1* involviert in die Entwicklung des Spaltöffnungsapparat und den Abschluss des Zellzyklus (Boudolf et al., 2004a; Boudolf et al., 2004b)

Cycline können aufgrund ihrer Funktion näherungsweise in Klassen eingeteilt werden. D-Typ Cycline regulieren den G1/S und A-Typ Cycline den G2/M Übergang. B-Typ Cycline spielen sowohl beim G2/M Übergang als auch während der M-Phase eine Rolle (Breyne and Zabeau, 2001; Mironov et al., 1999; Potuschak and Doerner, 2001). Diese Regel wird jedoch nicht selten von Ausnahmen gebrochen (Roudier et al., 2000).

Die Expressionsmuster unterliegen großen Variationen und werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren bestimmt. Die Expression von D-Typ Cyclinen wird durch Saccharose, Cytokinin, Auxin, Brassinosteroide und Gibbereline reguliert infolgedessen CDKs aktiviert werden (Fuerst et al., 1996; Hu et al., 2000; Meijer and Murray, 2000; Oakenfull et al., 2002; Riou-Khamlichi et al., 1999; Riou-Khamlichi et al., 2000).

Die Kontrolle des G1/S Übergangs erfolgt über einen weiteren, in Pflanzen und Tieren konservierten, Bestandteil des Zellzyklus, den sogenannten *RBR/E2F/DP* (engl.: dimerization partner) Signalweg.

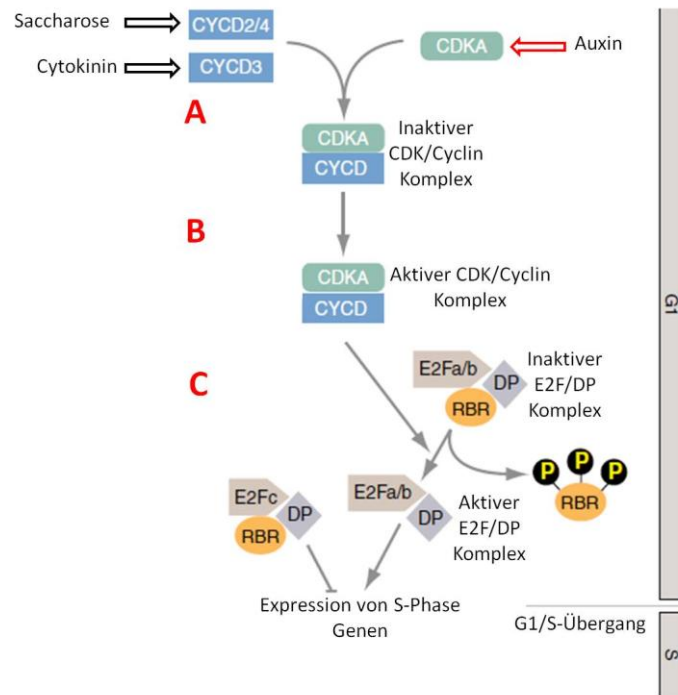


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung des G1/S Übergangs; modifiziert nach Inze and De Veylder, 2006.

RBR1 (*RETINOBLASTOMA RELATED 1*) kontrolliert die Aktivität von Mitgliedern der *E2F* (engl.: adenovirus E2 promoter-binding factor) Transkriptionsfaktorfamilie, die wiederum die Expression einer Vielzahl S-Phase relevanter Gene kontrollieren (Attwooll et al., 2004; Blais and Dynlacht, 2004; Stevens and La Thangue, 2004). *Arabidopsis* besitzt 6 *E2Fs* bzw. DELs (*DP-E2F-like*) (*E2Fa*, *E2Fb*, *E2Fc*, *E2Fd/DEL2*, *E2Fe/DEL1*, und *E2Ff/DEL3*) und zwei DPs (*DPa* und *DPb*).

In Pflanzen wird RBR über einen CDKA/CYCD Komplex phosphoryliert, infolgedessen RBR inaktiviert und E2F freigesetzt wird (Abb. 1.4. C).

E2Fa und *E2Fb* sind transkriptionelle Aktivatoren (Kosugi and Ohashi, 2002a, b; Mariconti et al., 2002; Stevens et al., 2002b). Überexpression von *E2Fa* führt zum Wiedereintritt von Mesophyllzellen in die S-Phase. Co-Überexpression von *E2Fa* und dem Dimerisierungspartner *DPa* induziert Proliferation differenzierter Zellen in Kotyledonen und führt zu Überproliferation im Hypokotyl sowie erhöhten Endoreplikationsraten (De Veylder et al., 2002; Rossignol et al., 2002). Auch die Überexpression von *E2Fb* zusammen mit *DPa* hat erhöhte Zellteilungsraten zur Folge (Magyar et al., 2005)

Typische S-Phase relevante Gene und Zielgene von E2F sind *MCM3*, *CDC6*, *CDT1a*, *PCNA*, *RBR*, und *RNR* (de Jager et al., 2001; De Veylder et al., 2002; Egelkrout et al., 2002; Egelkrout et al., 2001; Ramirez-Parra et al., 2003; Sabelli et al., 2005; Stevens et al., 2002a).

E2Fc ist hingegen ein Repressor, dem die für E2Fa und E2Fb typische Aktivierungsdomäne fehlt, und der *E2Fa/E2Fb* abhängige Gene reprimiert (del Pozo et al., 2002; Kosugi and Ohashi, 2002a; Mariconti et al., 2002; Rossignol et al., 2002). E2Fs und DPs besitzen nur eine DNA-Bindedomäne und sind darauf angewiesen Heterodimere zu bilden, um das E2F spezifische DNA-Motiv zu binden (Kosugi and Ohashi, 2002a; Magyar et al., 2000; Potuschak and Doerner, 2001). Im Gegensatz dazu stellen *E2Fd/DEL2 (DP-E2F-LIKE)*, *E2Fe/DEL1*, und *E2Ff/DEL3* besondere Faktoren dar, da sie zwei DNA-Bindedomänen besitzen und unabhängig von DPs agieren.

E2Fe/DEL1 inhibiert den Übergang zu Endozyklen, indem er einen Aktivator des APC (anaphase-promoting complex) hemmt, der zum Abbau von M-Phase Cyclinen führt (Lammens et al., 2008). E2Ff/DEL3 hingegen kontrolliert die Elongation von Wurzel- und Hypokotylzellen in dem er Gene reprimiert, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind (Ramirez-Parra et al., 2004).

Überexpression von *E2FD/DEL2* führt zu Aktivierung von *E2Fa*, *E2Fb* und *E2FE/DEL1*, in Folge seiner Inaktivierung hingegen werden Gene hoch reguliert, die für Repressoren von Zellteilungen kodieren (Sozzani et al., 2010).

1.4.3. Endoreplikation

Eine sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Organismen weit verbreitete Zellzyklusmodifikation ist der Prozess der Endoreduplikation, auch genannt Endoreplikation oder Endozyklus. Hierbei durchlaufen die Zellen mehrere Runden der DNA-Replikation ohne sich zu teilen.

Endoreplikation ist typischerweise in hoch spezialisierten, metabolisch aktiven und großen Zellen, wie Trichomen, epidermalen Zellen des Hypokotyls sowie Blättern zu beobachten (Gendreau et al., 1997; Lee et al., 2009).

Ob ein Endozyklus abläuft oder nicht ist im Wesentlichen von der Aktivität von M-Phase CDKs und Cyclinen abhängig. Bleibt diese unter einem bestimmten Schwellenwert, der die Mitose auslöst, kommt es zum Ablauf von Endozyklen

(Beemster et al., 2006; Boudolf et al., 2004a). In Abbildung 1.3. und 1.5. sind die Unterschiede im Ablauf und in der Regulation von mitotischen Zellzyklen und Endozyklen vereinfacht dargestellt.

Inaktivierung der G2/M-Phase spezifischen *CDKB1* führt zum Einsetzen von Endozyklen (Boudolf et al., 2004a). Die *CDKB1*;1 bildet einen Komplex mit dem Cyclin *CYCA2*;3, welches Zellteilungen fördert und Endoreplikation inhibiert. Mit dem Einsetzen von Endoreplikation in Blättern wird *CYCA2*;3 zusammen mit anderen A Cyclinen herunter reguliert (Boudolf et al., 2009; Imai et al., 2006). Endozyklen und mitotische Zellzyklen stehen in direkter Konkurrenz zueinander.

Die Gemeinsamkeit beider Formen des Zellzyklus besteht in dem Eintritt in die S-Phase, welche in beiden Fällen den gleichen bzw. ähnlichen Kontrollmechanismen unterliegt (De Veylder et al., 2011).

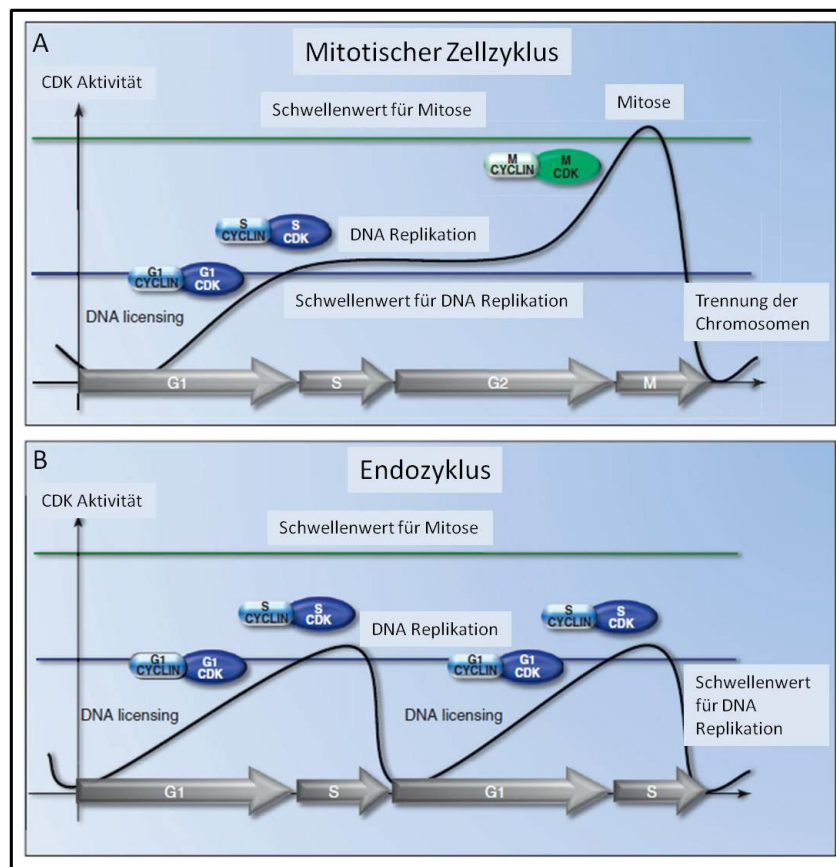


Abbildung 1.5.: Unterschiede zwischen mitotischen Zellzyklen und Endozyklen; modifiziert nach De Veylder et al., 2011.

1.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es neue Informationen über die Funktionsweise von *DRN* und *DRNL* zu sammeln und die Gemeinsamkeiten beider Gene weiter zu spezifizieren.

Hierzu wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt.

Da *DRN* und *DRNL* eine, auf eine kleine Zellpopulation beschränkte, Expressionsdomäne besitzen und transgene Pflanzen, die *DRN* oder *DRNL* konstitutiv unter Kontrolle des *CaMV 35S* Promotors überexprimieren, nicht überlebensfähig sind oder es zu einem „Silencing“ des Transgens kommt (Banno et al., 2001; Marsch-Martinez et al., 2006), wurde der experimentelle Ansatz einer epidermisspezifischen Überexpression verfolgt, in der Annahme, dass die Pflanzen in der Lage sind diese Art der Überexpression zu tolerieren.

Hierfür eignete sich der Promotor des *ATML1* (*Arabidopsis Thaliana Meristem Layer 1*) Gens, welcher ausschließlich und nahezu in der ganzen Epidermis von *A. thaliana* aktiv ist (Sessions et al., 1999; Takada and Jurgens, 2007).

Zudem stellt die Epidermis, aufgrund ihrer charakteristischen Struktur und den dadurch gegebenen Möglichkeiten zur Analyse, ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung auftretender Phänotypen dar.

Weiterhin sollte durch Mutantanalysen, Expressionsstudien sowie Transkriptomanalysen die Funktion von *DRN* und *DRNL* als Transkriptionsfaktoren und ihre Auswirkungen auf Musterbildungsprozesse und Differenzierung genauer untersucht werden.

Die Resultate dieser Versuche sind im Folgenden detailliert beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

2.1.1.1. Chemikalien

In Tabelle 2.1. sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und die jeweiligen Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2.1.: Chemikalien

Chemikalien	
Agarose	Invitrogen (Darmstadt), Biozym (Hess, Oldendorf)
Ampicillin	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Bromphenolblau	Biomol
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich (München)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich (München)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (München)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (München)
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich (München)
Ethanol	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromid-Lösung	Roth (Karlsruhe)
Gamborg B5-4 Pulver	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Gentamycin	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Sigma-Aldrich (München)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hygromycin	Sigma-Aldrich (München)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCL ₂)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
Mannitol	Sigma-Aldrich (München)
MS (Murashige and Skoog) Pulver	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe)
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich (München)
Rifampicin	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Rinderextrakt (BSA)	Sigma-Aldrich (München)
Saccharose (D(+)) Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Silwet L-77	Lehle Seeds (Round Rock, USA)
Triadimefon	Sigma-Aldrich (München)
Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
Wasser für die Molekularbiologie	Roth (Karlsruhe)

2.1.1.2. Kits

In Tabelle 2.2. sind die verschiedenen Kits und deren Hersteller aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2.2.: Kits

	Kits
NucleoSpin [®] Plant II	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond [®] PC 500	Macherey-Nagel (Düren)
InviTrap [®] Spin Plant RNA	STRATEC Molecular (Berlin)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect Rev. Transcription Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO [®] TA Cloning Kit	Invitrogen
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas/Thermo Scientific

2.1.1.3. Medien

LB (engl.: lysogeny broth)-**Medium** (Bertani, 1951)

0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1% NaCl, pH 7,0 (NaOH), (für eine Plattenkultur wurden 15 g/l Agar zugegeben). Zugabe der entsprechenden Antibiotika für die Selektion.

DYT-Medium

1% Hefeextrakt, 1,6% Trypton, 0,5% NaCl, (für Plattenkultur Zugabe von 15 g/l Agar). Zugabe der entsprechenden Antibiotika für die Selektion.

YEB- Medium

0,5% Rinderextrakt, 0,5% Trypton/Pepton aus Casein, 0,5% Saccharose, 0,1% Hefeextrakt, 0,05% Magnesiumsulfat-Heptahydrat (für Plattenkultur Zugabe von 15 g/l Agar). Zugabe der entsprechenden Antibiotika für die Selektion.

SOC-Medium

0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.

MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962)

4,4 g/l MS, pH 5,8 (KOH), (8 g/l Plant Agar). Zugabe von Saccharose auf eine Endkonzentration von 1%. Zugabe der entsprechenden Antibiotika für die Selektion.

B5-4 Medium (Gamborg et al., 1968)

3,2 g/l B5-4 (Duchefa) Pulver, 2% Saccharose, 4,5 µM 2,4-D pH 5,8 (KOH)

Infiltrationsmedium

50 g Saccharose gelöst in 1 l Wasser. Zugabe von 200 µl Silwet. Das Medium wurde stets frisch angesetzt.

Lösung zur Protoplastierung

120 g/l D-Sorbitol, 20g/l Cellulase, 1g/l Pectolyase

FACS-Medium A

10ml/l 1M KCl, 2ml 1M MgCl₂, 2ml 1M CaCl₂, 1g/l BSA, 0,4 g/l MES, 109,3g/l Mannitol

Entfärbelösung (Hoyer's Solution)

Für das Entfärben von Blättern und Kotyledonen wurde eine Lösung bestehend aus 12,5 g Chloralhydrat, 3,5 ml Wasser, 1,5 ml Glycerol hergestellt.

2.1.1.4. Antibiotika

In Tabelle 2.3. sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika mit ihrer entsprechenden Konzentration aufgeführt.

Tabelle 2.3.: Antibiotika

Antibiotika	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100
Gentamycin	25
Kanamycin	50
Rifampicin	25-50

2.1.2. Biologisches Material

2.1.2.1. Bakterienstämme

Bakterientransformationen wurden mit folgenden Stämmen von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt.

E. coli:

DH5 α : F' 80d/lacZ Δ M15, Δ (lacZY A-argF), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK-, mk*), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

A. tumefaciens:

GV 3101: (pMP90) Gent^R, Rif^R (Koncz and Schell, 1986).

2.1.2.2. Vektoren

Abhängig von der jeweiligen Klonierungsstrategie wurden zur Klonierung von PCR-Produkten der pJET1.2/blunt Vektor von Fermentas und der TOPO® TA Cloning Vektor von Invitrogen verwendet.

Für die Transformation von *A. tumefaciens* und zur Herstellung transgener Pflanzen wurde der pGPTV-Kan Vektor (Überlacker and Werr, 1996) verwendet.

Die Vektoren und deren Hersteller sind in Tabelle 2.4. aufgelistet. Die zugehörigen Vektorkarten befinden sich im Anhang.

Tabelle 2.4.: Vektoren

Vektoren	Resistenz	Hersteller
TOPO®	Ampicillin	Invitrogen
pJET1.2/blunt	Ampicillin/Kanamycin	Fermentas/Thermo Scientific
pGPTV-Kan	Kanamycin	

2.1.2.3. Enzyme

In Tabelle 2.5. sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme ihrer Funktion nach sortiert und aufgelistet.

Tabelle 2.5.: Enzyme

Restriktionsendonukleasen	
Ascl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EagI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NaeI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NotI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NotHF	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SacI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
SphI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bam HI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen	
T4 Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PhusionDNA-Polymerase	Finzymes, Hess. Oldendorf
Hifi DNA-Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
Klenow Fragment	
Zelllysierende Enzyme	
Cellulase	Sigma-Aldrich (München)
Pectolyase	Sigma-Aldrich (München)

2.1.2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.6. aufgelistet.

Tabelle 2.6.: Oligonukleotide

Name	Sequenz	Funktion
Atml1For_Asc1	GGCGCGCCTTCGAAAATAAAGCTTAGTTT	AML1 Promotor
Atml1Rev_Sac1	GAGCTCGATGATGATGGATGCCTATCA	AML1 Promotor
Atml1For_1KB Up	CCATTGACTTAATGTCAACTCTAT	AML1 Promotor/Seq.
Atml1For_77Up	GATAATCATCTTGAAGATTTGAAGGAAA	AML1 Promotor/Seq.
Atml1For_278Up	AAGACCATATAAATATATCTATTAAAGG	AML1 Promotor/Seq.
Atml1_Start_Rev	AACCAATTTCCAATTCAGAAATTC	AML1 Promotor/Seq.
DRNFor_Sac1	GAGCTCATGGAAAAGCCTTGAGAAAC	DRN ORF
DRNrev_Asc1_UTR_Not1	GCGGCCGCCCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	3'UTR/PRT
DRNRev_BamHI	GGATCCCTATCCCCACGATCTTCGGCA	DRN ORF/Seq.
DRNFor_760	CTGGTTATTTCTCTAATCTCACTA	DRN ORF/Seq.
DRNLFor_Sac1	GAGCTCATGGAAGAAGCAATCATGAGACTC	DRNL ORF
DRNLRev_BamHI	GGATCCCTAATAATCATCATGAAAGCAATA	DRNL ORF/Seq
DRNLFor_755	TGTTTCGTTTAGCTGACTTCCATGT	DRNL ORF/Seq
CYCD4 2,1_Int_For	ATGGCTGAATTTATGGAACCAAATCT	cycD4 2,1 Genotyp.
CYCD4 2,1_Int Rev	TGGAACCATTAGATTTTGGAGTGACAAAAA	cycD4 2,1 Genotyp.
CYCD4 2,1_Int For	GTTCTATTAATAATCTCATTGTCTCTTATTG	cycD4 2,1 Genotyp.
SAIL_LB1	GCCTTT TCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	SAIL Line left border
SAIL_LB2	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	SAIL Line left border
SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	SAIL Line left border
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	SALK Line left border
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	SALK Line left border
SPCH_ATG_For	ATGCAGGAGATAATACCGGATTTT	SPCH/ORF/Genotyp.
SPCH_Gene_Rev	CTAGCAGAATGTTTGCTGAATTTGTTG	SPCH/ORF/Genotyp.
SPCH310up_For	GAAAACCTAGATCCTCCCC	SPCH/ORF/Genotyp.
SPCH_EX2_Rev	TCCTATGATCGATGCTTGCTC	SPCH/ORF/Genotyp.
SPCH_EX2_mid_Rev	CTTCAGTTAGTAGTAACCATGAGAG	SPCH/ORF/Genotyp.
MUTE_ATG_Exon1_For	ATGTCTCACATCGCTGTTGAAAGGA	MUTE ORF Genotyp.
MUTE_EXON2_REV	GGTCATCACATTTTCGATTTCGAC	MUTE ORF Genotyp.
M13 For	CATTTTGCTGCCGGTC	Standard Seq.
M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Standard Seq.

2.1.2.5. Pflanzenmaterial

Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen des Wildtyps, sowie Transformationen zur Herstellung transgener Linien von *Arabidopsis thaliana*, wurden mit den Ökotypen Columbia (Col 0) und Landsberg erecta (Ler) durchgeführt. Transgene Linien, die während dieser Arbeit hergestellt wurden sind in Tabelle 2.7., die für Expressionsstudien oder Kreuzungen verwendeten Pflanzen sind in Tabelle 2.8. aufgeführt. *A. thaliana* Mutanten wurden, wenn nicht anders vermerkt, beim European Arabidopsis Stock Centre (NASC) bestellt.

Tabelle 2.7.: *ATML1* Promotor Linien

Transgene Linien			
Name	Gen.Hintergrund	Transformationsvektor	Resistenz
<i>ATML1::DRN (A::D)</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin
<i>ATML1::DRN-LIKE (A::DL)</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin
<i>ATML1::DRN-GFP (A::D-GFP)</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin
<i>ATML1::DRN(mut) (A::D(mut))</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin
<i>ATML1::DRN-GR (A::D-GR)</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin
<i>ATML1::DRN-LIKE-GR (A::DL-GR)</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin
<i>ATML1::DRNΔESR (A::DΔESR)</i>	Col	pGPTV-Kan	Kanamycin

Tabelle 2.8.: Reporterlinien und Mutanten

Reporterlinien		Mutanten	
Name	Gewebe	Name	Mutatiostyp
<i>SPEECH::nucGFP</i>	MMC	<i>spch-3</i>	T-DNA
<i>MUTE::nucGFP</i>	Meristemoid	<i>mute</i>	EMS
<i>TMM::TMM-GFP</i>	Stomata Zelllinie	<i>tmm-1</i>	T-DNA
<i>BASL::GFP-BASL</i>	Stomata Zelllinie	<i>basl-3</i>	T-DNA
<i>GL2::GFP</i>	Trichom/Hypocotyl	<i>drn</i>	T-DNA
<i>35S::(29-1)YFP</i>	Zellwand	<i>cycD4-2;1</i>	T-DNA
<i>DRN::GFP_{er}</i>	Embryo/Meristem	<i>myb63</i>	T-DNA
<i>STM::VENUS</i>	Meristem	<i>bcm1</i>	EMS
<i>FAMA::GFP</i>	GMC/GC	<i>gl2</i>	T-DNA

2.1.3. Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller sind in Tabelle 2.9. aufgelistet.

Tabelle 2.9.: Geräte

Geräte		
LSM 700	Zeiss	Konfokale Mikroskopie
Stemi 2000	Zeiss	Bino
C 1000 Thermal Cycler	Bio-Rad	PCR
7500 Fast Real-Time	Applied Biosystems	RT-PCR
Gel Doc XR	Bio-Rad	Gel Dokumentation
Gene Pulser	Bio-Rad	Elektroporation
LMD 6000	Leica	Fluoreszenzmikroskopie
MZ16 FA	Leica	Fluoreszenzmikroskopie
Percival AR-4IL3	CLF Plant Climatics	Klimakammern

2.2. Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden erfolgten, wenn nicht anders vermerkt, nach (Sambrook et al., 1989) bzw. nach den Angaben der Hersteller.

2.2.1. Isolation von Nukleinsäuren

Die Isolation genomischer DNA und RNA aus *Arabidopsis thaliana* und die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte jeweils mit den in Abb.2.2. aufgeführten Kits.

2.2.2. Erstellen von Gen-Konstrukten, Primerdesign und Sequenzanalysen am Computer

Die virtuelle Erstellung von Gen-Konstrukten und das Design, der in dieser Arbeit verwendeten Primer, erfolgte in silico mit Hilfe des Programmes Vector NTI®.

Sequenzanalysen, wie das Invertieren von DNA Sequenzen, Vergleiche von DNA Sequenzen (Alignments) oder virtuelle Translation von DNA in Aminosäuresequenzen erfolgte mittels den Online Anwendungen http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Primerdesign für die quantitative Real-Time (RT) PCR wurde mit der Anwendung <http://frodo.wi.mit.edu/> durchgeführt.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard PCRs wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) durchgeführt.

2.2.3.1. PCR zur Amplifikation Gen-Sequenzen aus genomischer DNA

Für die Amplifikation genomischer DNA, welche für Klonierungsexperimente verwendet wurde, wurde eine Polymerase mit „Proofreading-Funktion“ gewählt, da hier die Genauigkeit der Amplifikation im Vordergrund stand. In Tabelle 2.10. ist eine

typische PCR mit Standardeinstellungen dargestellt. Einzelne Einstellungen, wie Hybridisierungstemperatur (Annealing) und Elongationszeiten, wurden abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments individuell angepasst. Für PCRs bei denen die Amplifikationsgenauigkeit sekundär war und eine gewöhnliche Taq-Polymerase verwendet wurde, wurde ein ähnliches Protokoll in leicht abgewandelter Form angewandt. Hierbei wurde die Reaktion stets nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Tabelle 2.10.: Standard-PCR (High Fidelity)

Reaktionsansatz		Standard-PCR (High Fidelity)	
		Bedingungen	
5x PCR Hi-Fi Puffer	5 µl	1. Denaturierung	94°C, 3 min
DNTPs	1 µl	2. Denaturierung	94°C, 30 sek.
forward Primer	2 µl	3. Primerhybridisierung	56°C, 30 sek. 35x
reverse Primer	2 µl	4. Elongation	68°C, 1 min pro kb
MgSO ₄	2,5 µl	5. Elongation	68°C, 10 min
Hi-Fi Taq Polymerase	0,2 µl	6. Stop	4-12°C
aqua bidest.	<u>38,3 µl</u>		
Reaktionsvolumen	50 µl		

2.2.3.2. Kolonie-PCR

Die Überprüfung erfolgreicher Bakterientransformationen erfolgte mittels Kolonie-PCR unter Verwendung von spezifischen Primern. In Tabelle 2.11. sind die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und die Reaktionsbedingungen einer Kolonie-PCR dargestellt. Die zu vervielfältigende DNA-Probe wurde in Form einer gepickten Bakterienkolonie in den Reaktionsansatz gegeben.

Tabelle 2.11.: Kolonie-PCR

Reaktionsansatz		Kolonie-PCR	
		Bedingungen	
5x PCR Mastermix	4 µl	1. Denaturierung	94°C, 3 min
forward Primer	0,6 µl	2. Denaturierung	94°C, 30 sek.
reverse Primer	0,6 µl	3. Primerhybridisierung	55°C, 30 sek. 30-35x
aqua bidest.	<u>14,8 µl</u>	4. Elongation	72°C, 1 min pro Kb
		5. Elongation	72°C, 10 min
Reaktionsvolumen	20 µl	6. Stop	4-12°C

2.2.3.3. Genotypisierung

Für die Bestimmung des Genotyps einzelner Pflanzen wurde zunächst genomische DNA isoliert (NucleoSpin® Plant II, Macherey-Nagel (Düren)). Diese wurde anschließend in eine PCR eingesetzt. Reaktionsansatz und Bedingungen erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie bei der Kolonie-PCR (Tabelle 2.11). Anstatt einer gepickten Kolonie wurde hier 1µl DNA in die Reaktion eingesetzt und die Menge an Wasser entsprechend angepasst.

2.2.4. Klonierung von PCR Fragmenten

Für die Klonierung von PCR Fragmenten wurde standardmäßig das TOPO TA Cloning® Kit von Invitrogen verwendet.

2.2.5. Agarosegelelektrophorese

Auftragspuffer

10x BFA: 75mM EDTA, 50% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau

Lauf- und Gelpuffer

1x TAE: 2 mM Tris, 1 mM Natriumacetat, 50µM EDTA pH 8,5 (Eisessig),

Nach Aufkochen und anschließendem Abkühlen bildet das Disaccharid Agarose in wässriger Lösung eine Matrix, in der Moleküle durch Anlegung elektrischer Spannung (5-15V/cm) abhängig von ihrer Nettoladung wandern können (Elektrophorese). Die Wanderungsgeschwindigkeit (v) hängt von der Nettoladung der Moleküle (E), der Feldstärke (z) und dem Reibungskoeffizienten ab und wird wie folgt berechnet:

$$v = (E \cdot z) / f$$

Zur Herstellung eines 1-2 prozentigen Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Anschließend wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid pro ml Gelvolumen nach der

Abkühlung auf 50°C hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, wodurch man in der Lage ist diese unter UV-Licht nachzuweisen. Die Elektrophorese lief bis zur gewünschten Auftrennung. Für anschließende Größenbestimmung der DNA-Fragmente, wurde ein DNA-Größenmarker zusammen mit den Proben aufgetragen. Die fotografische Dokumentation erfolgte unter UV-Licht (Gel Doc XR, Bio-Rad). Die Elektrophorese diente überwiegend dem Nachweis von PCR-Fragmenten und Plasmid-Präparationen.

2.2.6. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Verdaue mit Restriktionsendonukleasen wurden einerseits angewandt um Plasmid-Präparationen zu überprüfen, weiterhin wurde für Klonierungen mit spezifischen Endonukleasen verdaut, um bestimmte Fragmente aus Plasmiden herauszuschneiden oder um Plasmide zu linearisieren.

2.2.7. Ligation

Der Einbau von DNA-Fragmenten in Vektoren erfolgte mittels Ligation. Für die Ligation wurde standardmäßig 25 ng Vektor eingesetzt. Für eine optimale Ausbeute wurde das Verhältnis von Vektor und einzubauendem DNA-Fragment (Insert) auf ein molares Verhältnis von 1:5 eingestellt. Die entsprechende Menge Fragment berechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Eine Standardreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µl Vektor
- x µl Insert
- 2 µl 5x Reaktionspuffer
- 1 µl Ligase
- H₂O ad 20 µl

Dabei wurde bei Raumtemperatur für mindestens 3 Stunden oder über Nacht bei 4°C ligiert.

2.2.8. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von GATC Biotech (Konstanz) vorgenommen.

2.2.9. Transformationen

2.2.9.1. Bakterientransformationen

2.2.9.1.1 Transformation *Escherichia coli* Bakterien

Transformationen von *E.coli* erfolgten zur Vervielfältigung von Plasmid DNA. Die zu transformierende DNA wurde im Falle einer Re-Transformation in einer angemessen verdünnten Konzentration auf chemisch kompetente, noch gefrorene DH5 α -Zellen gegeben. Im Falle einer Ligation wurde stets die Hälfte des Ligationsansatzes eingesetzt. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Danach wurden die Bakterien sofort wieder auf Eis gelegt und dort für höchstens fünf Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 250 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C regeneriert und anschließend auf LB-Agaroseplatten mit dem vektorspezifischen Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei ebenfalls 37°C inkubiert.

2.2.9.1.2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens wurde stets mit einem Plasmid bestehend aus dem pGPTV-Vektor und dem gewünschten Gen-Konstrukt transformiert. Hierbei dienten die transformierten Zellen als Grundlage für die Transformation von *Arabidopsis thaliana*. Die Transformation der Agrobakterien erfolgte durch Elektroporation, da diese Methode in der Regel eine höhere Ausbeute erzielt als die Behandlung durch

Hitzeschock. Zunächst wurde den tiefgefrorenen Bakterien 1 µl DNA hinzugefügt. Die Bakterien tauten auf Eis auf und wurden schließlich in eine gekühlte Küvette mit Aluminiumelektroden überführt. Vor der Elektroporation war darauf zu achten, dass die Elektroden von Kondenswasser befreit wurden, um einem Kurzschluss vorzubeugen. Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporator (Gene Pulser, Bio-Rad) bei 1,8 kV. Im Anschluss wurde 1 ml YEB-Medium in die Küvette gegeben und der gesamte Inhalt der Küvette in ein Reaktionsgefäß auf Eis zurückgeführt. Die Bakterien regenerierten bei 28°C für zwei Stunden. Anschließend wurden die Bakterien auf YEB Platten mit den Antibiotika Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin ausplattiert und für zwei Tage bei ebenfalls 28°C inkubiert.

2.2.9.2. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch die Floral Dip Methode (Clough and Bent, 1998). Hierbei wurden die zur Transformation verwendeten Pflanzen mit ihren Infloreszenzen für jeweils etwa 10-15 min in eine Lösung aus in Infiltrationsmedium gelösten transformierten *A. tumefaciens* getunkt. Nach dem Dip wurden alle Pflanzen mit einer Plastikhaube abgedeckt und wie gewohnt bei Langtagbedingungen ins Gewächshaus gestellt. Nach vier Tagen wurde die Plastikhaube abgenommen. Die aus den Transformationen resultierenden transgenen Linien sind in Tabelle 2.7. im Abschnitt Pflanzenmaterial aufgeführt.

2.2.10. Selektion und Anzucht transgener Pflanzen

Nach der Transformation wurden die Samen der T₀-Generation (Pflanzen die gedippt wurden) auf transgene Pflanzen (T₁-Generation) selektiert. Hierzu wurden die Samen auf Antibiotika-haltigem MS-Medium ausgesät. Nach Selektion der Keimlinge wurden diese auf normale Erde ausgesetzt und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) aufgezogen.

Pflanzen die das BASTA (Glufosinat)-Resistenzgen (Thompson et al., 1987) tragen wurden, entweder auf Phosphinotricin-haltigem Medium ausgesät oder keimten zunächst auf Erde und wurden anschließend mit BASTA (Glufosinat) besprüht.

2.2.11. Induktion mit Dexamethason

Die Induktion der transgenen Pflanzen, die Gen-Konstrukte mit der hormonbindende Domäne (HBD) des Glucocorticoidrezeptors (GR) enthalten, erfolgte mit dem Steroidhormon Dexamethason. Dieses wurde entweder in flüssiger Form (10µM) auf die Pflanzen aufgesprüht, bis diese vollständig benetzt waren oder die Samen keimten auf MS-Platten, die 25µM Dexamethason beinhalten. Die für diesen Versuch verwendeten induzierbaren transgenen Linien wurden von Laura Wessels (2011) in ihrer Bachelorarbeit hergestellt.

2.2.12. Mikroskopie

2.2.12.1. Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen einzelner Zellen von Embryonen und Blättern wurden mit einem LMD 6000 (Leica) durchgeführt. Um Ovulen und Blätter zu entfärben, wurden diese über Nacht in Entfärbelösung (Hoyer's) inkubiert bis sie klar und durchsichtig waren.

Präparationen von Ovulen und Embryonen aus Schoten erfolgten unter einem Binokular (Stemi 2000, Zeiss).

2.2.12.2. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Analyse von Keimlingen unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden diese zunächst mit Osmiumtetroxid (OsO₄) fixiert und anschließend in einer Ethanol und Acetonreihe (10-100%) entwässert. Zum Schluss wurden die Präparate mit Goldpartikeln beschichtet.

2.2.12.3. Konfokale Mikroskopie

Hochauflösende Bilder zellulärer Strukturen von Hypokotylen und Blättern wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Modell: LSM 700, Zeiss) aufgenommen. Insofern die

Pflanzen nicht schon ein Fluorochrom wie *GFP* oder *YFP* exprimierten, wurden die Präparate mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt. Um Zellmembranen zu färben wurde das zu untersuchende Material für 5-10 Minuten in 10µM Propidiumiodid gefärbt. Die Färbung von Zellkernen erfolgte mit 5 µg/ml DAPI-Lösung für 15 min. Anschließend wurden die Präparate zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.12.3.1. Bestimmung des Chromatingehalts (Gendreau et al., 1998)

Für die Bestimmung des Chromatingehalts von Kotyledonen, Blättern und Hypokotylen wurde diese mit DAPI-Lösung gefärbt und anschließend auf einem Objektträger vorsichtig ausgebreitet.

Für die Messung des Chromatingehalts wurden Bilder fluoreszierender Kerne an einem Konfokalmikroskop (Modell: LSM 700, Zeiss) aufgenommen und die Intensität der Fluoreszenz wurde anschließend am Computer mit Hilfe des Programms ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) analysiert.

Zunächst wurden die Kerne von ca 100 Stomata gemessen und dienten als Referenz für den diploiden Chromosomensatz von 2C (2n). Hierzu wurde die Fläche eines Kernes (**Region of interest (ROI)**) markiert und die mittlere Intensität gemessen. Von diesem Wert, wurde ebenfalls die mittlere Intensität des Zytoplasmas abgezogen und die Differenz wurde wiederum mit der Fläche der ROI multipliziert. Anschließend wurden die Messwerte der zu analysierenden Kerne durch den Referenzwert (Stomata) geteilt und mit 2 multipliziert. Die Werte wurden in halboffene Intervalle eingeteilt, die repräsentativ für einen bestimmten C-Gehalt waren. Die Unterteilung wurde wie folgt vorgenommen:

(0,3] (=2C); (3,6] (=4C); (6,12] (= 8C); (12,24] (=16C); (24,48] (=32C).

2.2.13. Transkriptomanalysen

Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem PLANT GENOMICS RESEARCH Institut (UGRV <http://www-urgv.versailles.inra.fr/functional-genomics-arabidopsis.htm>) in Evry, Frankreich, durchgeführt.

Für Transkriptomanalysen der stabil exprimierenden Linien wurde RNA aus einem „Pool“ 10 Tage alter Keimlinge verwendet. Für die Transkriptomanalysen induzierbarer Linien wurde RNA aus einem „Pool“ von Blättern 20 alter unbehandelter Pflanzen, von Pflanzen 24h nach Induktion mit Dexamethason sowie von Pflanzen 24 h nach Behandlung mit Dexamethason und Cycloheximid verwendet.

Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Achim Tresch, Universität Köln. Clusteranalysen wurden mit der Plattform <https://www.genevestigator.com/gv/> durchgeführt. Tabelle 2.12. zeigt die durchgeführten bilateralen Vergleiche.

Bei den stabil exprimierenden Linien *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* wurde die RNA mit RNA des Wildtyps verglichen.

Im Falle der induzierbaren Linien wurde die RNA der unbehandelten transgenen Pflanzen mit der RNA von Dexamethason bzw. Dexamethason und Cycloheximid behandelten Pflanzen verglichen.

Stadium (Boyes et al. 2001)	<i>DRN</i>	<i>DRNL</i>
	Stabil exprimierend	
ˆ1.04	<i>A::D</i> WT	<i>A::DL</i> WT
	induzierbar	
ˆ1.10	<i>A::D-GR (+DEX)</i> <i>A::D-GR (-DEX)</i>	<i>A::DL-GR (+DEX)</i> <i>A::DL-GR (-DEX)</i>
	induzierbar	
ˆ1.10	<i>A::D-GR (+DEX/+CYC)</i> <i>A::D-GR (-DEX)</i>	<i>A::DL-GR (+DEX/+CYC)</i> <i>A::DL-GR (-DEX)</i>

Tabelle 2.12.: Liste der in den Transkriptomanalysen untersuchten RNAs: Angegeben sind die Genotypen und Behandlungen sowie die das Entwicklungsstadium nach (Boyes et al., 2001).

3. Ergebnisse

3.1. Epidermisspezifische Expression von *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE*

3.1.1. Klonierung von *ATML1* Promotor-Konstrukten

Für die ektope Expression von *DRN* und *DRNL* wurde ein 5 KB großes Fragment „upstream“ des Startcodons des *ATML1* Gens vor das offene Leseraster von *DRN* und *DRNL* kloniert (Abb. 3.1. A und B). Dieser Bereich war ausreichend, um *DRN-GFP* (Abb. 3.1. E) spezifisch in der Epidermis auszuprägen (Sessions et al., 1999; Takada and Jurgens, 2007).

Abb. 3.2. zeigt die für einen Transkriptionsfaktor typische kernlokalisierte Expression von *DRN-GFP* in den epidermalen Zellen des Hypokotyls (A) und in Kotyledonen (B).

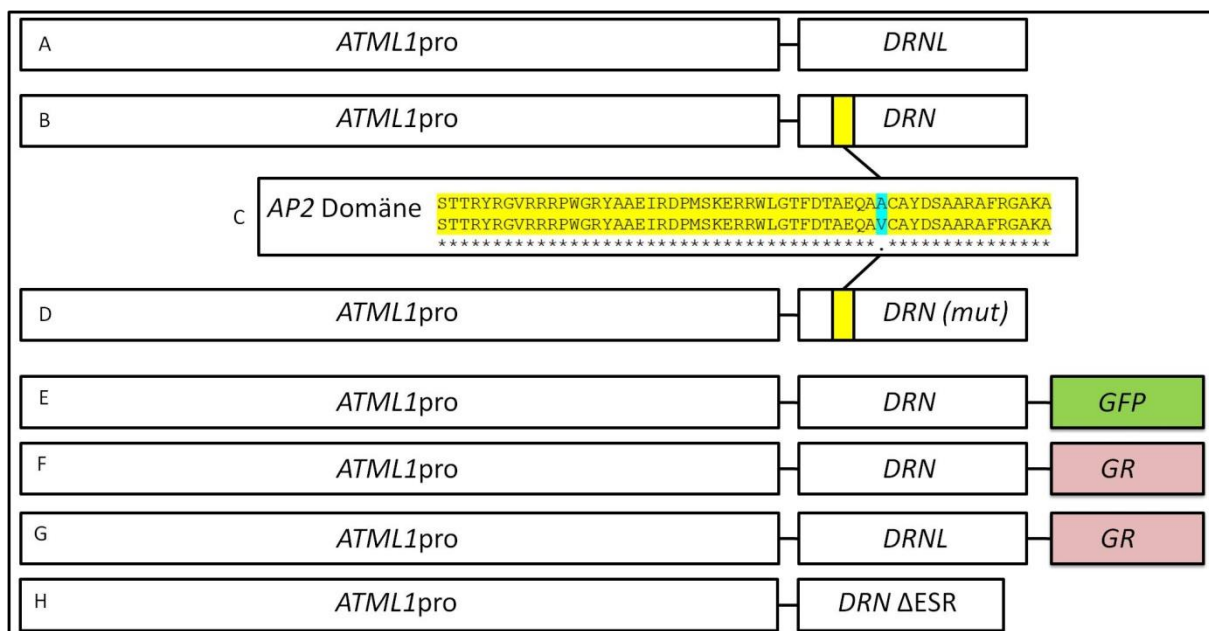


Abbildung 3.1.: Schema der in dieser Arbeit hergestellten Gen-Konstrukte: Dargestellt sind jeweils der Promotor und das offene Leseraster des entsprechenden Gens von (A) *ATML1::DRNL*, (B) *ATML1::DRN*, (D) *ATML1::DRN(mut)*, (E) *ATML1::DRN-GFP*, (F) *ATML1::DRN-GR*, (G) *ATML1::DRNL-GR* und (H) *ATML1::DRNΔESR*. (C) zeigt die Aminosäuresequenz der AP2 Domäne von *DRN* (B) und *DRN(mut)* (D) mit dem Aminosäureaustausch (blau).

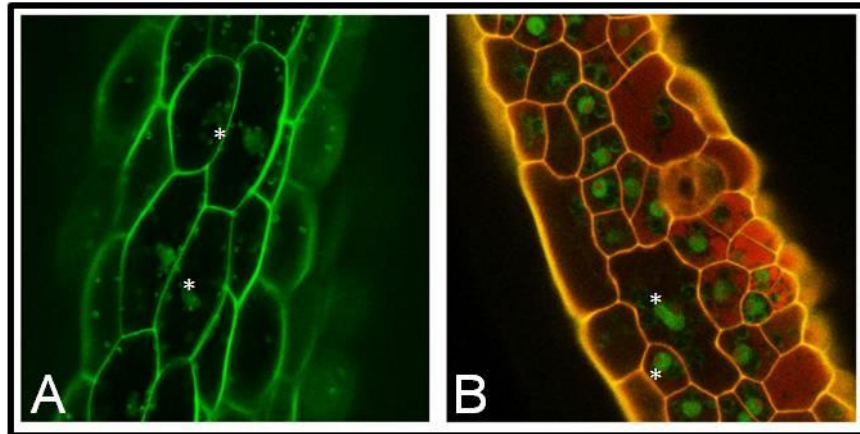


Abbildung 3.2.: Konfokale Bilder von *ATML1::DRN-GFP* der T2 Generation: Expression von *DRN-GFP* in epidermalen Zellen 2 Tage alter Keimlinge im basalen Bereich des Hypokotyls (A) und auf der adaxialen Seite der Keimblätter (B). Sterne markieren das kernlokalisierte GFP Signal. Dargestellt ist eine Aufsicht der Epidermis.

3.1.2. Phänotypische Auswirkungen ectopischer *DRN* und *DRNL* Expression

3.1.2.1. Makroskopische Effekte und der Habitus von *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen

Transgene *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Linien zeigten pleiotrope Phänotypen. So konnten bei 5-10 Tage alten Pflanzen der T2 Generation Hyperplasien im Hypokotyl beobachtet werden (Abb. 3.3.). Diese variierten in ihrer Intensität von schwach, in Form kleiner Auswüchse (B und C), bis hin zu starken tumorartigen Strukturen (D). Die Hyperplasien traten in allen Bereichen des Hypokotyls auf, waren aber stärker im apikalen Bereich des Hypokotyls ausgeprägt (Abb. 3.3. C).

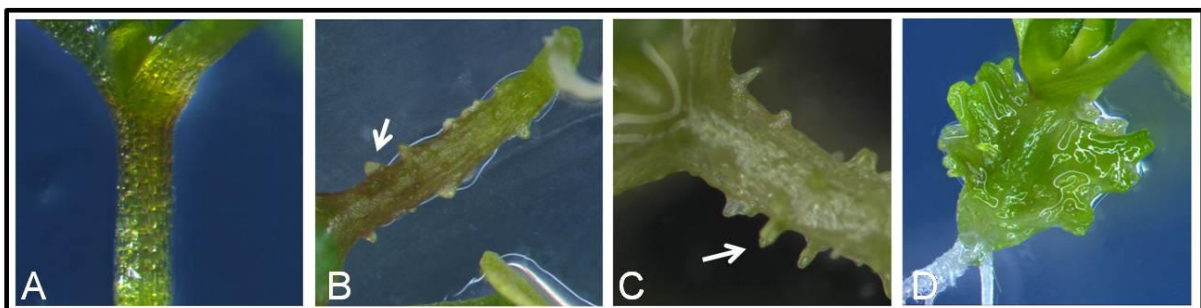


Abbildung 3.3.: Hypokotyl 5-10 Tage alter Keimlinge: Von Wildtyp (A), *ATML1::DRN* (B und D) und *ATML1::DRNL* (C).

Adulte *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen entwickelten, im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.4. A, D und G), längliche, zur Blattunterseite gewölbte und in sich verdrehte Blätter (Abb. 3.4. B, C, E, F, H und I). Auch dieser Phänotyp variierte in der Intensität seiner Ausprägung, wobei die Ausbildung von Hyperplasien mit einem starken Überexpressionsphänotyp im adulten Stadium korrelierte, der sich in Verlust der Apikaldominanz und Sterilität äußerte. (Abb. 3.4. C, F und I).

T2 Pflanzen, die auf Grund ihres Segregationsverhaltens auf Kanamycin-haltigem Medium wahrscheinlich multiple Kopien des Transgens besaßen, zeigten stets einen starken Überexpressionsphänotyp und waren nicht weiter propagierbar. Dies ließ auf eine Abhängigkeit des Phänotyps von der Transkriptmenge schließen.

Alle folgenden Versuche wurden deshalb mit Pflanzen durchgeführt, die aus einer auf Kanamycin 3:1 segregierenden T2 Population stammten und einen schwachen bzw. moderaten Phänotyp zeigten (Abb. 3.4. B, E und H).

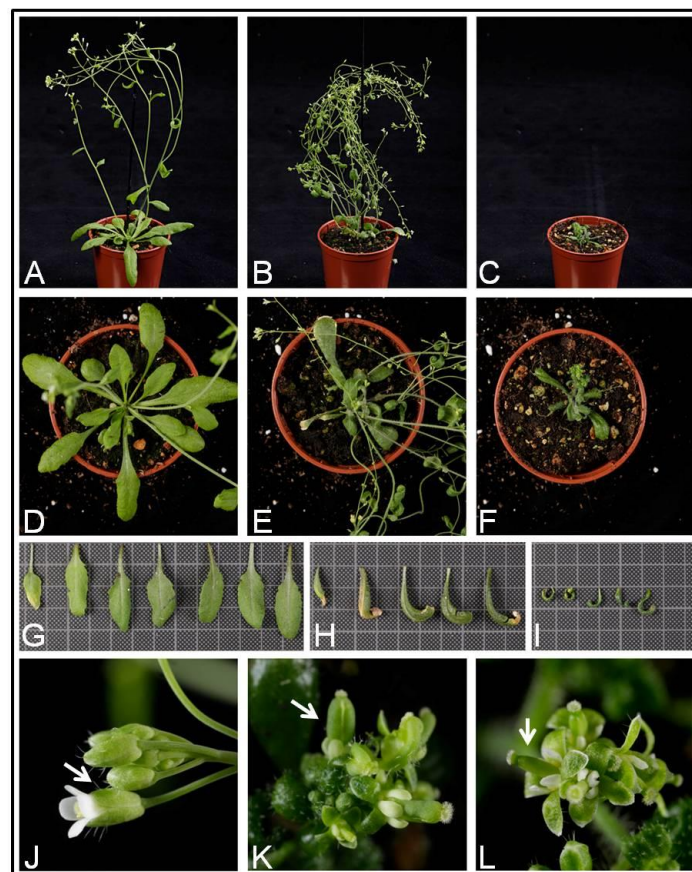


Abbildung 3.4.: Habitus in Seiten- und Aufsicht sowie von isolierten Blättern und Blüten: WT (A, D, G und J), *ATML1::DRN* (B, E, moderat H, stark I und K) und *ATML1::DRNL* (C,F und L).

Die Nachkommen dieser Pflanzen waren ebenfalls in ihrem Wuchs und Fertilität eingeschränkt, jedoch in der Lage Samen zu produzieren. Die Samenproduktion konnte durch manuelle Bestäubung unterstützt werden, was zeigte, dass die eingeschränkte Fertilität bzw. Sterilität im Wesentlichen auf einem heterochronen Wachstum der Stamen und Karpelle beruhte, bei dem die Stamen nicht ausreichendes Längenwachstum zeigten und so nicht in der Lage waren die Karpelle zu bestäuben (Abb. 3.4. K und L).

Ein Unterschied in der phänotypischen Ausprägung zwischen *DRN* und *DRNL* bestand darin, dass *ATML1::DRN* Pflanzen nur dann vollständig steril waren, wenn auch der übrige Teil des Habitus einen starken Überexpressionsphänotyp zeigte (Abb. 3.4. F). *ATML1::DRNL* Pflanzen waren teilweise auch dann steril, wenn der übrige Teil des Habitus nur moderat betroffen war. Dies ist durch die Rolle von *DRNL* während der Staubgefäßentwicklung zu erklären (Nag et al., 2007).

3.1.2.2 Auswirkungen ektopischer Expression auf mikroskopischer Ebene

3.1.2.2.1. Zellteilungsdefekte im Hypokotyl

Um den Aufbau bzw. den Ursprung der Hyperplasien im Hypokotyl besser zu verstehen, wurden WT, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen auf zellulärer Ebene zu frühen Stadien nach der Keimung untersucht.

Die Epidermis des Hypokotyls von *A. thaliana* besteht aus alternierend herausragenden und nicht herausragenden Zellreihen, die im Durchschnitt 18-20 Zellen pro Zellreihe beinhalten (Gendreau et al., 1997). Mit dem Ende der Embryonalentwicklung teilen sich die Zellen des Hypokotyls nicht mehr und lediglich die Zellen der SZR besitzen eine geringe Zellteilungsaktivität, die sich auf den oberen (2/3), apikalen, Teil des Hypokotyls, beschränkt (Berger et al., 1998 und Abb. 3.5. A und D). Die nSZR, die Zellreihe in der sich keine Stomata bilden, ist frei von Zellteilungen. In *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen waren unmittelbar nach der Keimung zusätzliche Zellteilungen zunächst im apikalen Teil der Stomatazellreihe, später auch in der nicht-Stomatazellreihe zu beobachten (Abb. 3.5. B und E). Diese Zellteilungen setzten sich fort, bis jede Zellreihe betroffen war und die ursprünglichen Zellreihen nur noch rudimentär als solche zu erkennen waren (Abb. 3.5. C, F und G).

ATML1::DRN und *ATML1::DRNL* Keimlinge der T2 Generation zeigten nach 3 Tagen eine um den Faktor 2,3 bzw. 2,9 erhöhte Gesamtzellzahl im Hypokotyl (Abb. 3.5. B,E, Abb. 3.8. A und Tabelle 3.1.). Innerhalb von, gemessen an der Antibiotikaresistenz, nicht segregierenden T2 und T3 Populationen zeigten 100% aller Individuen Überproliferation im Hypokotyl. Die Zellteilungsaktivität stagnierte jedoch nach ca. 10 Tagen und nur wenige der Individuen entwickelten Hyperplasien (Abb. 3.5. C und G).

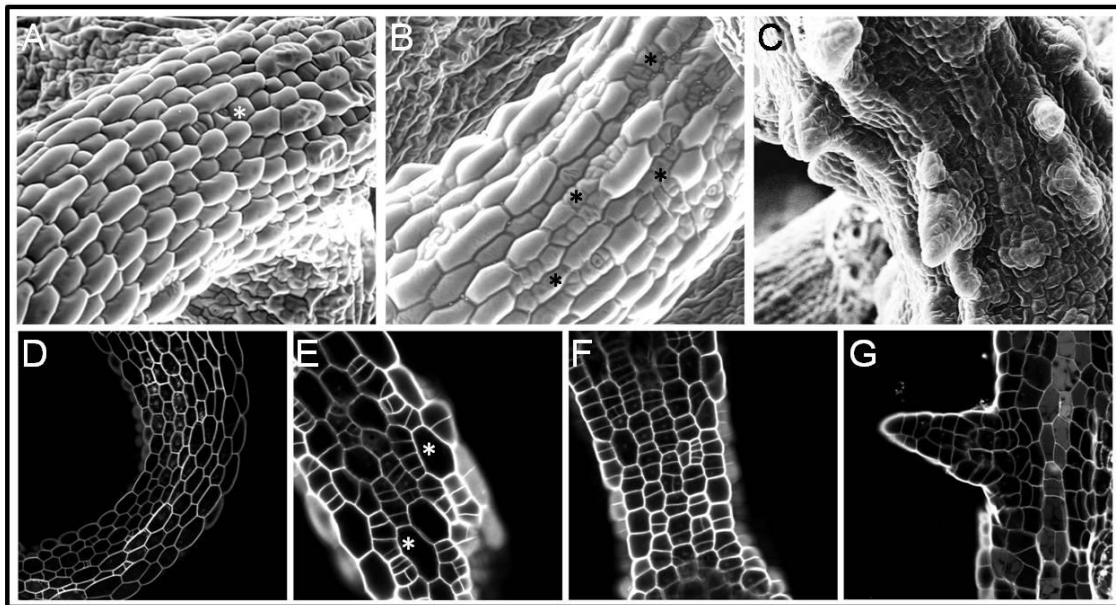


Abbildung 3.5.: Aufnahmen vom Hypokotyl; Rasterelektronenmikroskopisch (A-C) und konfokalmikroskopisch (D-G): 1-2 (A, B, D, E), 4 (F) und 8-10 Tage alter Keimlinge (C und G): WT (A und D) *ATML1::DRN* (B,C,E,G) und *ATML1::DRNL* (F). Sterne markieren kleine Zellen, die Zellteilungen durchlaufen.

Um den Verlauf der Entwicklung des Hypokotyls von *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen genauer zu analysieren, wurden Embryonen aus noch nicht vollständig gereiften Ovulen isoliert. Embryonen im „Walking-Stick-Stage“ von *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* waren nicht von denen des Wildtyps zu unterscheiden (Abb. 3.6.) Dies zeigte das die Zellteilungskompetenz im Hypokotyl, ausgelöst durch die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL*, erst mit der Samenkeimung entstand und das die ektopische Expression keinen erkennbaren Einfluss auf die Histologie des Embryos hatte. Das entwicklungsbiologische Programm der Embryonalentwicklung, verantwortlich für die Musterbildung auf zellulärer Ebene, war daher der ektopischen Expression von *DRN* und *DRNL* übergeordnet.

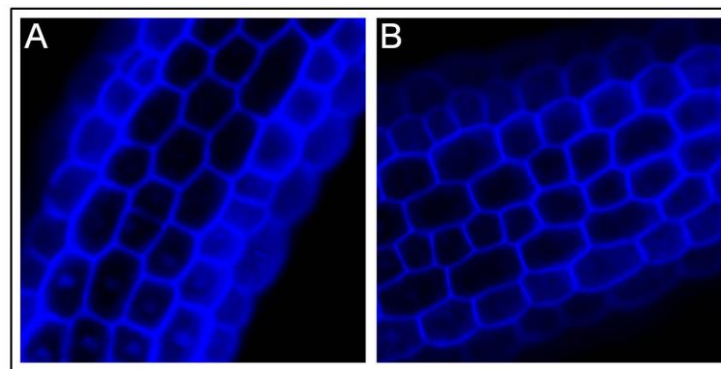


Abbildung 3.6.: Hypokotyl von Embryonen unmittelbar vor der Samenreife; Konfokale Bilder in Aufsicht, Färbung: DAPI: WT (A) und *ATML1::DRN* (B). Die epidermisspezifische Expression von *DRN* und *DRNL* hat keinen erkennbaren Einfluss die Histologie von Embryonen.

3.1.2.2.2. Kernimport und Funktionalität des DRN/DRNL Proteins

DRN und *DRNL* kodieren für putative Transkriptionsfaktoren. Um zu überprüfen, ob der Kernimport essentiell für die Erzeugung der beobachteten Phänotypen ist und diese nicht durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen im Zytoplasma zustande kommen, wurden zwei induzierbare Versionen von *DRN* und *DRNL* kloniert (Abb. 3.1. F und G, Laura Wessels 2011, nicht veröffentlicht). Bei diesen Konstrukten ist das offene Leseraster am C-Terminus mit der hormonbindenden Domäne (HBD) des Glucocorticoidrezeptors (GR) fusioniert.

Dies bewirkt, dass der für Transkriptionsfaktoren typische Kernimport nicht stattfinden kann. Erst in Anwesenheit von Dexamethason kann das Protein in den Kern transportiert werden.

Unbehandelte 14-15 Tage alte Keimlinge transgener Linien, die die induzierbaren Versionen von *DRN* und *DRNL* exprimierten, entwickelten sich wie der Wildtyp (Abb. 3.7. C). 7 Tage nach der Behandlung durch Dexamethason entwickelten *ATML1::DRN-GR* (nicht abgebildet) und *ATML1::DRNL-GR* (Abb.3.7. D) den typischen Blattphänotyp der stabil ektopisch exprimierenden Linien. In Abbildung 3.7. ist dieselbe Pflanze vor (C) und nach (D) Behandlung mit Dexamethason (DEX) abgebildet. Zum Zeitpunkt des Sprühens mit DEX hatten die Pflanzen die ersten 6 Rosettenblätter ausgebildet (C) und die Primordien von Blatt 7 und 8 waren bereits unter dem Binokular zu erkennen. 7 Tage nach der Applikation mit DEX entwickelten sich die Blätter 1-6 normal, die Blätter 8,9 und 10 waren hingegen phänotypisch verändert. Blatt 7 war in der Regel phänotypisch normal und zeigte nur in einzelnen Fällen ein leichtes Eindrehen zur Blattunterseite. Bei Blättern, die später entstanden, verstärkte sich die Intensität des Phänotyps und die Blätter entwickelten zunehmend eine epinastische Form (Abb. 3.7. D Blatt 8,9 und 10).

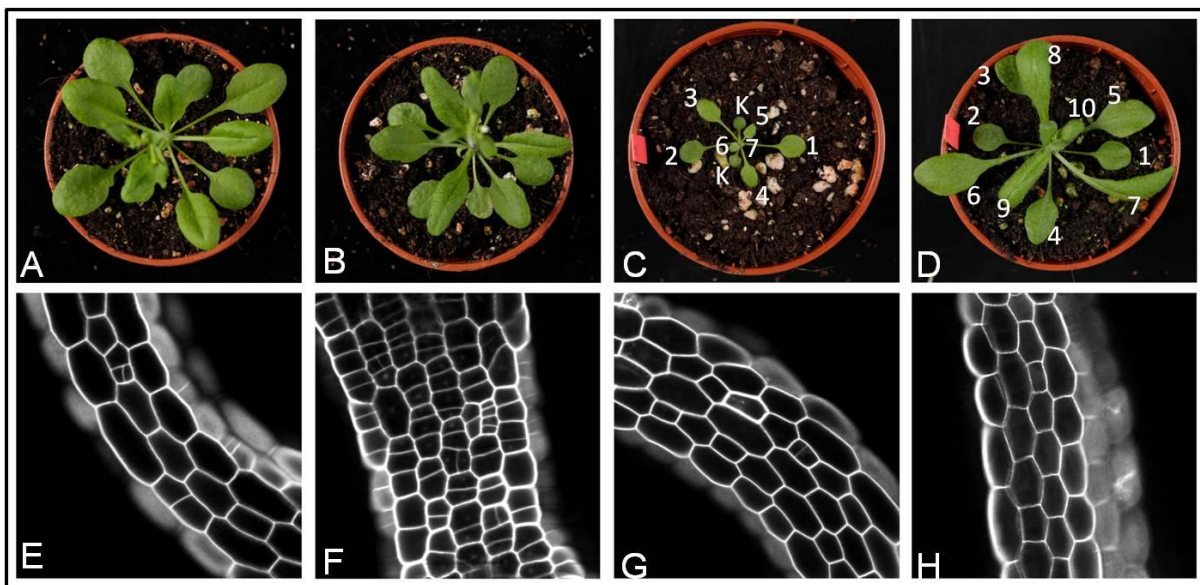


Abbildung 3.7.: Fotografische Aufnahmen des Habitus und konfokale Bilder des Hypokotyls:

WT (A und E). *ATML1::DRN(mut)* (B und G), *ATML1::DRN* (F), *ATML1::DRN Δ ESR* (H) und *ATML1::DRN-GR* (14 Tage C und 21 Tage D). Die Zahlen 1-10 markieren die Rosettenblätter in der Reihenfolge ihrer Entstehung und K die Kotyledonen (C und D).

Dieser Effekt setzte sich bis zur vollständigen Ausbildung der Rosette fort. In der Regel zeigten auch einige der frühen Tragblätter den typischen *ATML1::DRN/DRNL* Phänotyp, jedoch schwächte sich der DEX abhängige Effekt mit der Entwicklung der Infloreszenzen ab und die Pflanzen entwickelten sich im weiteren Verlauf normal.

Zur Kontrolle der DNA-Bindung wurde ein weiteres Konstrukt kloniert (*ATML1::DRN(mut)*, Abb. 3.1. D), welches aus dem *ATML1* Promotor und einer mutierten Version von *DRN* besteht. Diese Version von *DRN* trägt eine Mutation, welche zum Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin in der AP2 Domäne des DRN Proteins führt (Abb. 3.1. C). In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass dieses konservierte Alanin in der AP2-Domäne für die DNA-Bindung notwendig ist (Liu et al., 2006). So konnte unter anderem überprüft werden, ob das konservierte Alanin ebenfalls essentiell für die Funktion von *DRN* ist.

ATML1::DRN(mut) Pflanzen waren nicht von denen des Wildtyps zu unterscheiden. Eine intakte AP2-Domäne ist daher die Voraussetzung für die Erzeugung der zuvor beschriebenen Phänotypen (Abb. 3.7. A und B, E und G).

Als Kontrolle der Transkriptionsfaktoraktivität wurde eine Version von *DRN* exprimiert, bei der das ESR-Motiv deletiert ist (Abb. 3.1. H, Laura Wessels 2011, nicht veröffentlicht). Das ESR-Motiv in DRN und DRNL agiert als Transaktivierungsdomäne (Nomura et al., 2009). Auch *ATML1::DRN Δ ESR* Pflanzen zeigten keinen Überexpressionsphänotyp (Abb. 3.7. H, Habitus nicht abgebildet).

Zusammengefasst zeigten diese Kontrollen, dass die beschriebenen Phänotypen abhängig sind von Kernimport, einer intakten AP2-Domäne sowie Transaktivierung, was wiederum bestätigte dass DRN und DRNL als Transkriptionsfaktoren agieren.

3.1.2.2.3. Stomataanzahl und Verteilung in der Epidermis von Hypokotyl und Kotyledonen

In *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen teilten sich die Zellen zunächst im apikalen Teil des Hypokotyls bis sich die Zellteilungen bis zur Basis hin ausbreiteten. Stomatadifferenzierung im Hypokotyl beginnt 3-4 Tage nach der Keimung und ist an sich vereinzelt teilenden Zellen im apikalen Bereich des Hypokotyls zu erkennen (Berger et al., 1998).

Da die zusätzlichen Zellen in *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen in Form und Größe den Stomatavorläuferzellen ähnelten (Abb. 3.5. A, B und E), wurde überprüft, ob die Entwicklung bzw. die Anzahl der Stomata im Hypokotyl verändert war. Hierzu wurden zunächst die Stomata in der SZR gezählt. Die Zahl der Stomata pro Zellreihe war proportional zur Gesamtzellzahl um den Faktor 3 erhöht (Abb. 3.8. B und Tabelle 3.1.).

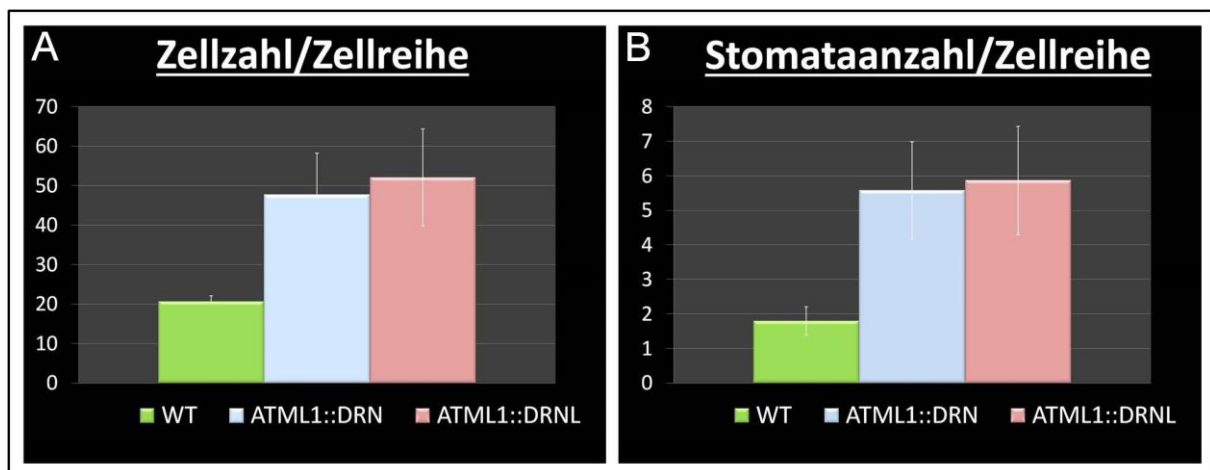


Abbildung 3.8.: Anzahl der Zellen pro Zellreihe und Stomata pro Zellreihe: Vom WT, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	SD	Mittelwert	P-Wert (wt)	Faktor
Zellanzahl/Zellreihe																			
WT	23	20	19	20	21	22	21	19	22	21	23	18	20	19	21	1,5023791	20,6		
A::D	39	62	48	52	34	40	37	59	65	45	41	34	56	60	44	10,559131	47,733333	1,3333E-10	2,3171521
A::DL	63	58	61	42	45	71	58	42	39	35	47	38	59	74	49	12,261826	52,066667	1,29761E-10	2,5275081
Stomataanzahl/Zellreihe																			
WT	2	1,67	1,67	1,67	1,33	2	1,33	2,33	1,33	1,67	2,33	2,67	2	1,67	1,33	0,4140393	1,8		
A::D	4,67	7,67	7	3,67	7	5,33	5,33	6,33	4,33	7	3	4	6	6,67	5,67	1,4055822	5,5777778	9,94455E-11	3,0987654
A::DL	5,33	4,67	6	7,67	7,33	8	4,67	6	5,67	6,67	9	3,67	4,33	4,67	4,33	1,5725825	5,8666667	1,93996E-10	3,2592593

Tabelle 3.1.: Zellanzahl/Zellreihe und Stomataanzahl/Zellreihe: Vom WT, *ATML1::DRN* (A::D) und *ATML1::DRNL* (A::DL).

Aufgrund der veränderten Blattform in *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen, wurde überprüft, ob die zellulären Muster der Epidermis von Blättern und Kotyledonen ähnliche Zellteilungsdefekte wie im Hypokotyl aufwiesen. Signifikante Unterschiede in den Zellzahlen auf Blättern und Kotyledonen waren hier nicht zu beobachten.

Stattdessen waren in *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen Stomatacluster in der Epidermis von Kotyledonen (Abb. 3.9. C und D) zu beobachten, die denen von *tmm-1* (Abb. 3.9. B) ähneln. *TMM* ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der „one cell spacing“ Regel während der Stomataentwicklung (siehe Einleitung).

Innerhalb der ersten 2-4 Tage entstanden vereinzelt Cluster aus 2 nebeneinander liegenden Stomata (Abb. 3.9. C), die sich mit zunehmendem Alter auf bis zu 5-7 Stomata pro Cluster vergrößerten (Abb. 3.9. D).

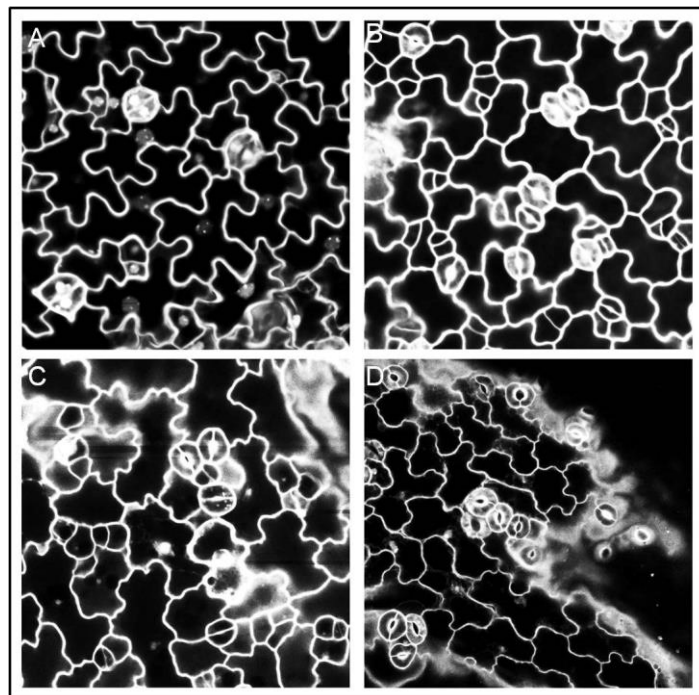


Abbildung 3.9.: Konfokale Bilder der abaxialen Seite von Kotyledonen 3-4 (A-C) und 5-6 (D) Tage alter Keimlinge: WT (A), *tmm-1*(B), *ATML1::DRN* (C) und *ATML1::DRN* (D). Auffällig sind die Stomatacluster im Vergleich zum Wildtyp (C und D).

Diese Resultate zeigen, dass die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* in der Epidermis dazu führt, dass das im Embryo festgelegte zelluläre Muster des Hypokotyls nach der Keimung überschrieben wird und Musterbildungsdefekte in der Epidermis von Kotyledonen und Blättern zur Folge hat. Auffällig war, dass die im Embryo angelegten Zelltypen des Hypokotyls bis zur Keimung unverändert blieben. Erst mit oder unmittelbar nach der Keimung des Samens erlangten die Zellen des Hypokotyls die Kompetenz sich, in Folge der ektopischen Expression von *DRN* und *DRNL*, zu teilen. Die Teilungsaktivität endete nach ca. 10 Tagen und es kam zu einer terminalen Differenzierung.

3.2. *DRN* und *DRN-LIKE* überschreiben zelluläre Muster und Identitäten im Hypokotyl

Die veränderte Stomataanzahl, die auftretenden Stomatacluster in *ATML1::DRN/DRNL* und dass die überzähligen Zellteilungen zuerst in der Zellreihe beobachtet wurden, in der sich Stomata entwickeln, ließ vermuten, dass die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* direkt oder indirekt in die Entwicklung von Stomata eingreift. Stomatacluster findet man in Mutanten von Genen, die in die Stomataentwicklung involviert sind.

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der ektopischen Expression von *DRN* und *DRNL* und Regulatoren der Stomataentwicklung zu untersuchen, wurden *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Linien mit Reporterlinien und Mutanten der Stomatazelllinie (SZL) gekreuzt.

3.2.1 Überzählige Zellen im Hypokotyl exprimieren Marker der Stomatazelllinie

Die Expression von *TMM* kann als genereller und früher Marker für die SZL verwendet werden, da dieses Gen sich durch eine breite Expression in Stomatavorläuferzellen auszeichnet (Nadeau and Sack, 2002).

Im Wildtyp Hypokotyl beschränkte sich die Expression des Fusionsproteins *TMM-GFP* auf diejenigen Zellen, die Zellteilungsaktivität besaßen und wurde nie in benachbarten Zellreihen beobachtet (Abb. 3.10. A). *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen hatten eine erhöhte Anzahl an Zellen mit *TMM-GFP* Expression, die zudem nicht alternierend wie im Wildtyp auftrat, sondern auch in der nicht-Stomatazellreihe (nSZR) und damit ektopisch war (Abb. 3.10. B). Innerhalb der ersten 2-3 Tage exprimierten alle Zellen, die Teilungen durchliefen *TMM-GFP*. Die Expression nahm im weiteren Verlauf der Entwicklung ab, bis sie nach 6-7 Tagen nicht mehr detektierbar war. Dieser Zeitraum der *TMM* Expression entspricht dem Zeitraum der Stomataentwicklung im Wildtyp, in diesem Stomata ihre maximale Dichte von 2.1-2.2 Stomata/Zellreihe nach 7 Tagen erreichen und ihre Entwicklung im Hypokotyl damit abgeschlossen ist (Berger et al., 1998).

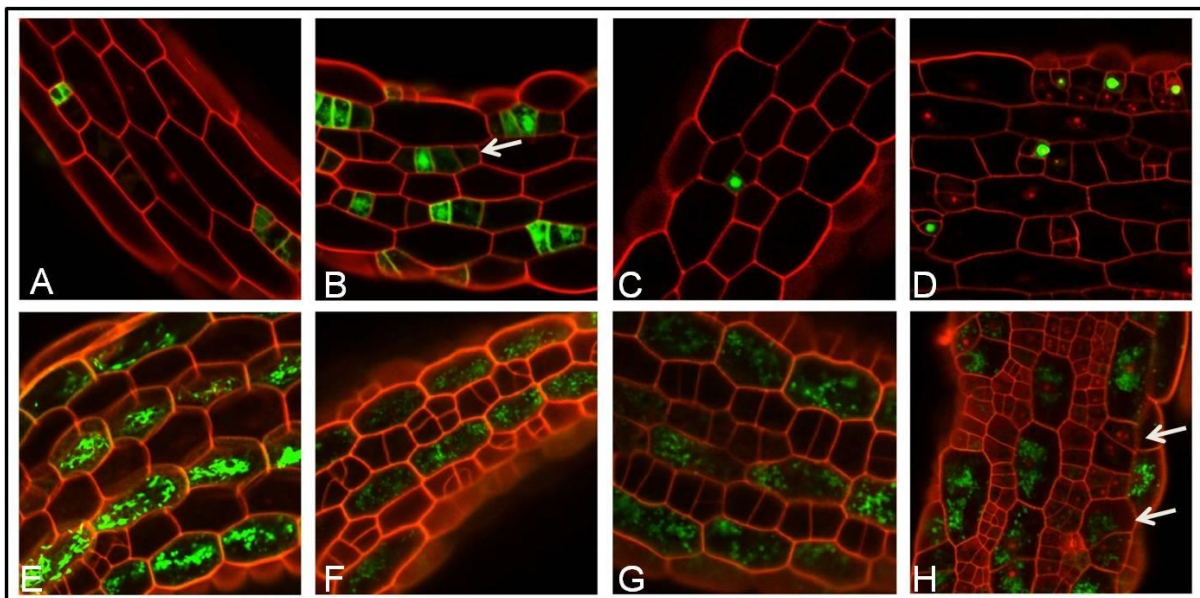


Abbildung 3.10.: Konfokale Bilder des Hypokotyls 2-4 Tage alter Keimlinge. Färbung: GFP (Grün), Propidiumiodid (Rot): Expression von *TMM::TMM-GFP* in WT (A) und *ATML1::DRN* (B), von *MUTE::nucGFP* in WT (C) und *ATML1::DRN* (D) und von *GL2::GFP* in WT (E), in *ATML1::DRN* (F) und *ATML1::DRNL* (G) nach 2 Tagen und *ATML1::DRN* (H) nach 4 Tagen. Pfeile markieren in B diejenigen Zellen, die ektopisch *TMM* exprimieren, und in H diejenigen, die in Folge von Zellteilungen, Verlust an *GL2* Expression zeigten.

Die vermehrte Anzahl von Zellen mit *TMM* Aktivität, ging mit einer erhöhten Anzahl einzelner Zellen einher, die den Meristemoidmarker *MUTE* exprimieren (Abb. 3.10. C und D). Dies zeigte lediglich, dass die erhöhte Anzahl *MUTE* exprimierender Zellen darauf beruhte, dass mehr Zellen in die Stomatazelllinie eintraten, die Entwicklung bzw. Differenzierung von Stomata ansonsten normal verlief.

Auch die Expression von *FAMA* (nicht abgebildet) zeigte lediglich dass die späte Entwicklung normal verlief und dass Differenzierungsprozesse, sobald einmal initiiert, durch die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* nicht weiter beeinflusst wurden.

GLABRA2 (GL2) ist ein Inhibitor der Stomataentwicklung und ist alternierend in der nSZR aktiv und inaktiv in der SZR (Hung et al., 1998). *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* exprimierten *TMM* ektopisch in der nSZR, was bedeutete, dass es zu einer Veränderung der Zellidentität kam. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Expression von *GL2* in *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen möglicherweise verändert war.

In *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* zeigte der *GL2* Promotor zunächst sein typisches Muster und das *GFP*-Signal war wie im Wildtyp nur in den Zellen der nSZR zu beobachten. Abbildung 3.10. zeigt die Expression von *GL2* in WT (E), *ATML1::DRN* (F) und *ATML1::DRNL* (G) in der nSZR. Das Einsetzen ektopischer Zellteilungen in der nSZR, ging mit dem Verlust von *GL2* Expression einher. Mit dem Einsetzen der Zellwandsynthese in einer Zelle der nSZR, war das *GL2-GFP* Signal zunächst noch zu beobachten, bis es in Folge weiterer Zellteilungen verschwand (Abb. 3.10. H).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zellen des Hypokotyls durch ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* die Kompetenz erlangen sich zu teilen und dass zelluläre Identitäten im Hypokotyl verändert beziehungsweise überschrieben werden. Zum einen erhöhte sich die Zellteilungsaktivität in den Zellen der SZR, zum anderen erfolgten ektopische Zellteilungen in der nSZR. Dies spiegelte sich in der Promotoraktivität der Gene *TMM* und *GL2* wieder.

TMM ist in den Zellen der Stomatazelllinie exprimiert, welche sich dynamisch verhalten und Zellteilungsaktivität besitzen. *GL2* ist hingegen in der Zellreihe exprimiert, welche sich statisch verhält und in der keine Zellteilungen zu beobachten sind.

Die ektopische Expression von *TMM* und der schrittweise Verlust an *GL2* Expression in der nSZR ließen darauf schließen, dass sich die Zellidentität der SZR auf die der nSZR überträgt bzw. diese konvertiert wird. Diese Ergebnisse zeigten außerdem deutlich, dass die zellulären Muster und Identitäten sich erst nach der Keimung veränderten, da die Expressionsdomänen von *GL2* und *TMM* zunächst nicht verändert waren.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde durch Kreuzung mit verschiedenen Mutanten überprüft, ob eine genetische Abhängigkeit zwischen der Überexpression von *DRN* und *DRNL* und Schlüsselregulatoren der Stomataentwicklung besteht.

3.2.2. *DRN* und *DRNL* agieren unabhängig von der Genfunktion von Regulatoren der Stomatazelllinie

Die Epidermis von Kotyledonen und Hypokotyl von *spch-3* besteht vollständig aus „Pavement“-Zellen und besitzt keine Zellteilungsaktivität (MacAlister et al., 2007 und Abb. 3.11. B und K). Im genetischen Hintergrund der *spch-3* Mutante (Abb. 3.11. F) führt die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* ebenfalls zu ektopischen Zellteilungen im Hypokotyl. Die Kotyledonen von *ATML1::DRN spch-3* und *ATML1::DRNL spch-3* hingegen gleichen denen der *spch-3* Mutante und zeigen keine Zellteilungsaktivität (3.11. K und L). Ebenso wie in der *spch-3* Mutante war der *ATML1::DRN/DRNL* Phänotyp weiterhin unabhängig von Genen, die direkt an der Stomataentwicklung beteiligt sind. In der Epidermis von Kotyledonen homozygoter *mute* Pflanzen endet die Stomataentwicklung bei im Meristemoidstadium arretierten Zellen, die sich nicht weiterentwickeln (Pillitteri et al., 2007 und Abb. 3.11. A und I).

Auch im *mute* Hintergrund erzeugten *DRN/DRNL* zusätzlichen Zellteilungen in der Epidermis des Hypokotyls (Abb. 3.11. E). Die *tmm* Mutante bildet Stomatacluster in der Epidermis von Kotyledonen, besitzt aber hingegen keine Stomata im Hypokotyl (Abb. 3.11. D). Auch im *tmm* Hintergrund teilten sich die Zellen unter dem Einfluss der ektopischen Expression von *DRN* und *DRNL* (Abb. 3.11. H).

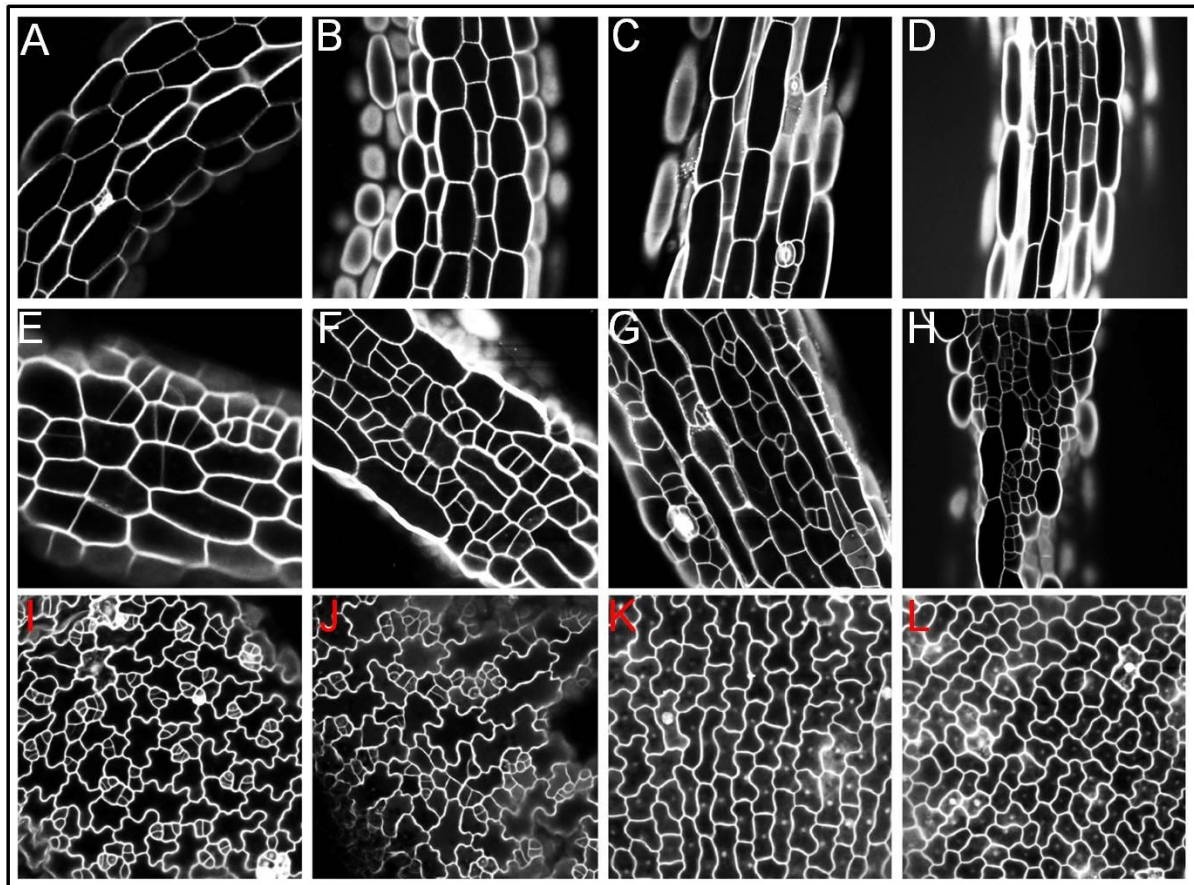


Abbildung 3.11.: Konfokale Bilder des Hypokotyls und der abaxialen Seite von Kotyledonen 2-4 Tage alter Keimlinge. Färbung: Propidiumiodid (Weiß): A-D zeigen das Hypokotyl von *mute* (A), *spch-3* (B), *cycD4;2-1*(C), *tmm-1* (D). E bis H zeigen das Hypokotyl von *mute ATML1::DRN* (E), *spch-3 ATML1::DRN* (F), *cycD4;2-1 ATML1::DRN* (G) und *tmm-1 ATML1::DRN* (H).

I-M zeigen die abaxiale Seite der Kotyledonen (rote Schrift) von *mute* (I), *mute ATML1::DRN* (J), *spch-3* (K) und *spch-3 ATML1::DRN* (L).

Mutationen in *CYCD4;2* führen zu einer reduzierten Anzahl Stomata in der SZR, wohingegen eine Überexpression von *CYCD4* eine Überproliferation sowohl in der SZR als auch in der nSZR zur Folge hat, die denen von *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen stark ähneln (Kono et al., 2007). Auch im Mutantenhintergrund von *CYCD4* war der *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Phänotyp zu beobachten (Abb. 3.11. C und G).

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die Überproliferation im Hypokotyl unabhängig von der Genfunktion vieler Schlüsselregulatoren der Stomataentwicklung verläuft und der Phänotyp von *ATML1::DRN/DRN-LIKE* demnach epistatisch gegenüber den Mutationen in Genen der Stomatazelllinie ist. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass *DRN* und *DRNL* direkt oder indirekt den Zellzyklus positiv beeinflussen. Im Folgenden wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt, um eine mögliche Rolle von *DRN* und *DRNL* während der Zellzykluskontrolle näher zu bestimmen.

3.3. *DRN* und *DRNL* verzögern Differenzierung und fördern die Überschreitung des G1/S-Kontrollpunktes im Zellzyklus

3.3.1. Terminale Differenzierung unterdrückt das durch die ektopische Expression von *DRN* hervorgerufene Zellteilungspotential

Das Wachstum des Hypokotyls während der Keimung erfolgt ausschließlich durch Zellstreckung (Gendreau et al., 1998; Jakoby and Schnittger, 2004). Während dieses Streckungsprozesses durchlaufen die Zellen im Hypokotyl ein bis drei Endozyklen und erreichen abhängig von den Wachstumsbedingungen bei Keimung im Licht einen C(Chromatin)-Gehalt von 8-16C. (Gendreau et al., 1997; Schrader et al., 2013; Yoshizumi et al., 2006). Endozyklen stehen in direkter Konkurrenz zum mitotischen Zellzyklus und die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* bewirkt Zellteilungen in epidermalen Zellen, die normalerweise Endozyklen durchlaufen. Dies ließ zunächst darauf schließen, dass die Expression von *DRN* und *DRNL* den Übergang zwischen G2 und M-Phase positiv beeinflusst.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde der DNA Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls gemessen, wobei der C-Gehalt von Stomata (2C) als Referenz diente, da sie keine Endozyklen durchlaufen.

In 3-4 Tage alten, im Licht aufgezogenen Wildtyp Keimlingen besaßen 45,9% der Zellen einen DNA-Gehalt von 4C, in *ATML1::DRN* hingegen nur 29,3%. In der 16C Fraktion waren die Zellanzahlen in *ATML1::DRN* mit 9,87% im Vergleich Wildtyp (0,9%) hingegen erhöht (Abb. 3.12. A und Tabelle 3.2.). Die Zellanzahlen in den übrigen Fraktionen von 2C, 8C und 32C waren nicht signifikant verändert.

Dies zeigte, dass die Endoreplikation im Hypokotyl von *ATML1::DRN* grundsätzlich nicht unterdrückt wird, sondern sogar ein weiterer Endozyklus (16C) von einer Teilmenge an Zellen durchlaufen wird.

Gleichzeitig waren die Zellen des Hypokotyls mitotisch aktiv, was sich sowohl in den erhöhten absoluten Zellzahlen in *ATML1::DRN* Keimlingen (Abb. 3.8. A), als auch in der erhöhten absoluten Anzahl Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2C (Abb. 3.13.) widerspiegelte.

Sowohl die erhöhte Zellteilungsaktivität, als auch erhöhte Ploidiestufen zeigten, dass *DRN* und *DRNL* im Hypokotyl generell einen stimulierenden Effekt auf mitotische Zellzyklen, wie auch Endozyklen haben. Die Messung des DNA-Gehaltes von Hypokotylzellen unreifer Embryonen ergab zudem, dass diese, wie im Wildtyp, einen C-Gehalt von 2C besaßen und die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* auch hier keinen Einfluss hatte.

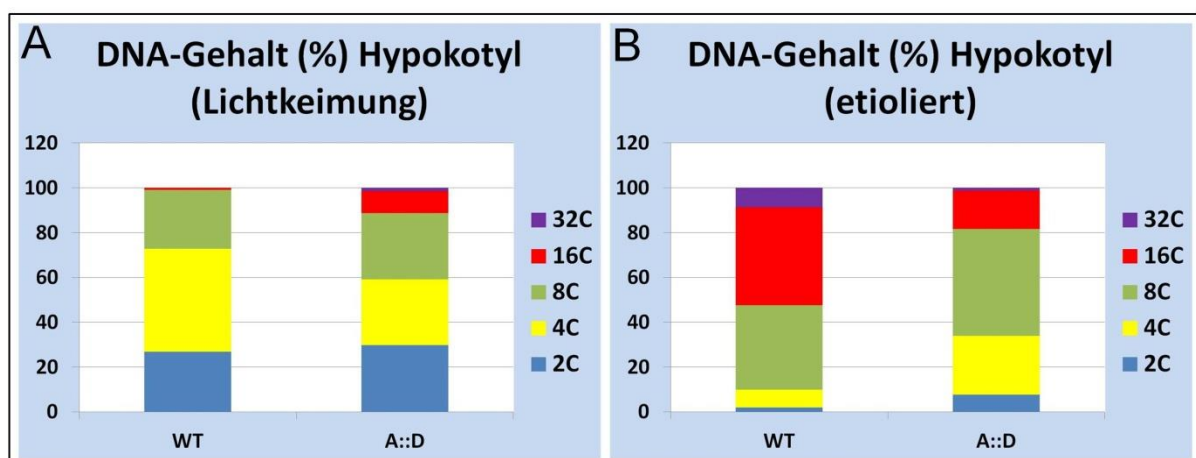


Abbildung 3.12.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse (in % der Gesamtzellzahl) von WT und *ATML1::DRN* (A::D): Im Licht keimte (A) und etiolierte Pflanzen (B). 2C steht für den einfachen Chromosomensatz.

DNA-Gehalt Hypocotyl			Licht					Etioliert				
Hintergrund			2C	4C	8C	16C	32C	2C	4C	8C	16C	32C
WT	n=13	Mittelwert	5.5	9.5	5.5	0.2	0	0.38462	1.61538	7.53846	8.92308	1.76923
		STDEV	2.4608	3.17105	4.06202	0.63246	0	1.1209	1.38675	4.09503	4.29072	2.0064
		%	26.8249	45.9313	26.3347	0.90909	0	1.92308	8.04196	37.5325	43.7995	8.70296
A::D	n=16	Mittelwert	10.375	10.625	10.75	3.75	0.5	1.9375	6.6875	12.0625	4.375	0.3125
		STDEV	4.30739	5.37022	5.36523	2.96407	0.92582	1.28938	3.57246	3.04344	2.70493	0.60208
		%	29.7189	29.372	29.6737	9.87506	1.36029	7.619371	26.34574	47.63945	17.20863	1.186813
		P-WERT%	0.64731	0.03302	0.68976	0.00212	0.10586	0.00746	0.0002	0.11436	0.00011	0.00657

Tabelle 3.2.: DNA-Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls: Von WT und *ATML1::DRN* (A::D) von im Licht gekeimten und etiolierten Pflanzen mit Mittelwert, Standardabweichung, Anteil an der gemessenen Gesamtzellzahl (%) und P-Werten (P>0,05 rot; P< 0,05 grün).

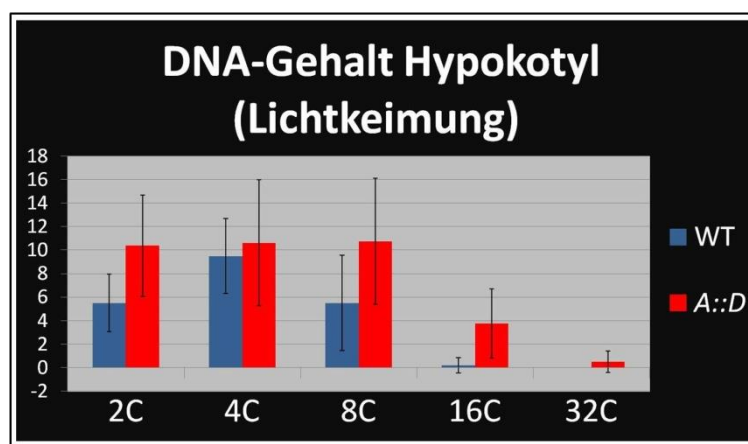


Abbildung 3.13.: Anzahl (absolut) epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse von WT und *ATML1::DRN* (A::D): 2C steht für den einfachen Chromosomensatz.

Während der Skotomorphogenese erreichen die Zellen des Hypokotyls die bis zu 100fache Zelllänge von in Licht gekeimten Pflanzen und einen DNA-Gehalt von bis zu 32C (Gendreau et al., 1997; Schrader et al., 2013; Yoshizumi et al., 2006).

Deswegen wurde im folgenden Experiment untersucht wie sich die durch Etiolierung erzeugte Zellstreckung auf das durch *DRN* hervorgerufene Zellteilungspotential auswirkt und eine künstliche Konkurrenzsituation zwischen mitotischen Zellzyklen und Endozyklen geschaffen.

Im Dunklen aufgezogene 4-5 Tage alte *ATML1::DRN* Keimlinge besaßen weniger Zellen pro Zellreihe im Hypokotyl als im Licht aufgezogene *ATML1::DRN* Keimlinge, aber signifikant mehr Zellen pro Zellreihe als der Wildtyp. (Tabelle 3.3 und Abb. 3.14.). In etiolierten Wildtyp Keimlingen besaßen 1,92% und 8,04% der Zellen einen DNA-Gehalt von jeweils 2C und 4C (Tabelle 3.2. und Abb. 3.12. B). In *ATML1::DRN* Keimlingen hingegen war die Anzahl der Zellen für diese Fraktionen mit 7,6% (2C)

und 26,3% (4C) signifikant erhöht (Tabelle 3.2. und Abb. 3.12. B). Die Anzahl der Zellen in den Fraktionen 16C und 32C hingegen war in *ATML1::DRN* Keimlingen mit jeweils 17,2% (16C) und 1,1% (32C) im Vergleich zum Wildtyp mit 43,79% (16C) und 8,70% (32C) signifikant reduziert. In der 8C Fraktion war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Abb. 3.12. B und Tabelle 3.2.).

Dies zeigte, dass die durch die Etiolierung hervorgerufene Zellstreckung und die damit einhergehende Endoreplikation in der Lage waren, das durch *DRN* hervorgerufenen Zellteilungspotential zu unterdrücken. Auf der anderen Seite war die Endoreplikation verzögert, da in *ATML1::DRN* Keimlingen die Epidermiszellen zunächst noch über großes Teilungspotential verfügten, bis sie von mitotischen Zellzyklen auf Endozyklen umschalteten.

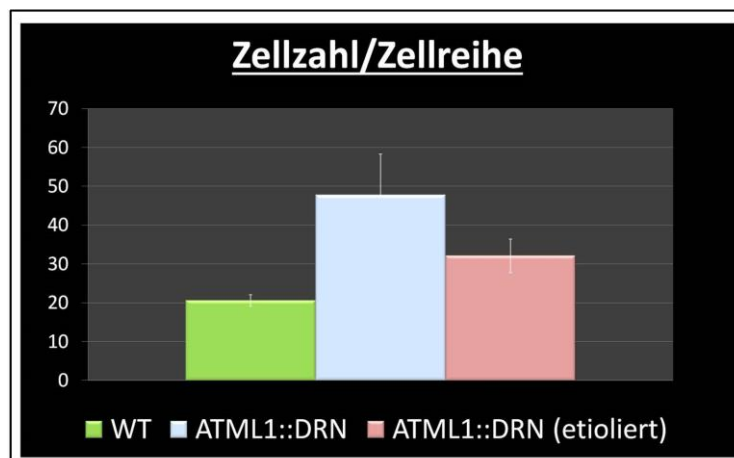


Abbildung 3.14.: Anzahl der Zellen pro Zellreihe: WT, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN* etioliert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	SD	Mittelwert	P-Wert (wt)	Faktor
Zellanzahl/Zellreihe																			
WT	23	20	19	20	21	22	21	19	22	21	23	18	20	19	21	1,5023791	20,6		
A:: <i>D</i>	39	62	48	52	34	40	37	59	65	45	41	34	56	60	44	10,559131	47,733333	1,3333E-10	2,3171521
A:: <i>D</i> ET	38	33	35	36	29	25	31	26	29	33	35	35	30	39	27	4,3336996	32,066667	1,95336E-10	0,6717877

Tabelle 3.3.: Zellanzahl/Zellreihe und Stomataanzahl/Zellreihe: WT, *ATML1::DRN* (A::*D*) und *ATML1::DRN* etioliert (A::*D* et).

3.3.2. Kernimport von DRN und DRNL führt zu Überproliferation in der Stomatazelllinie und fördert Endoreplikation in epidermalen Grundzellen

Der Kernimport von DRN und DRNL ist essentiell für das Erzeugen der *ATML1::DRN/DRNL* Überexpressionsphänotypen im Blatt (Abb. 3.7. C und D). Im Folgenden wurde untersucht, welche phänotypischen Aspekte der stabilen *ATML1::DRN/DRNL* Linien sich durch Induktion bzw. Kernimport erzeugen ließen. Hierzu keimten Samen von *ATML1::DRN-GR* und *ATML1::DRNL-GR* auf Platten mit normalen MS-Medium und auf Platten, welche 25 µM Dexamethason beinhalteten. 2-3 Tage alte Keimlinge, die auf Dexamethason aufgezogen wurden, glichen dem WT (ohne Abbildung) und zeigten keine zusätzlichen Zellteilungen im Hypokotyl. Ab dem vierten Tag, mit Einsetzen der Stomataentwicklung, ließen sich überzählige Zellteilungen in der Stomatazellreihe (SZR) beobachten, die in den unbehandelten Keimlingen fehlten. (Abb. 3.15. A und C). Die Entwicklung der nicht-Stomatazellreihe hingegen verlief in Hinblick auf die Histologie normal. Auch in den induzierten Linien ging die Überproliferation in der SZR mit einer erhöhten Anzahl Zellen einher, die den Marker der Stomatazelllinie *TMM* exprimierten (Abb. 3.15. B und D).

Dieses Experiment zeigte, dass sich mit den DEX-induzierbaren transgenen Linien ein Teilaspekt des zuvor beobachteten Phänotyp im Hypokotyl der stabil exprimierenden *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Linien erzeugen lässt. Zusätzliche Zellteilungen wurden nur in der Stomatazellreihe beobachtet, in der die Zellen teilweise noch Zellteilungskompetenz besitzen und in die Stomataentwicklung eintreten.

Des Weiteren zeigte dieser Versuch welches Zeitfenster betroffen war, in dem die Entwicklung des Hypokotyls durch *DRN* und *DRNL* beeinflusst werden konnte. Zum einen hatte die stabile ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* keine Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung, da weder zusätzliche Zellteilungen beobachtet wurden (Abb. 3.6.), noch die DNA-Gehalte der Hypokotylzellen verändert waren. Andererseits war die Induktion mit DEX im Rahmen der Keimung zu spät um Zellteilungen in der nSZR auszulösen.

Daher macht es einen Unterschied, ob DRN oder DRNL schon vor der Keimung im Kern vorlagen oder erst sekundär infolge von DEX Applikation in den Kern gelangten. Auf der anderen Seite bleibt die ektopische Expression von *DRN* oder *DRNL* während der Embryonalentwicklung ohne Folge.

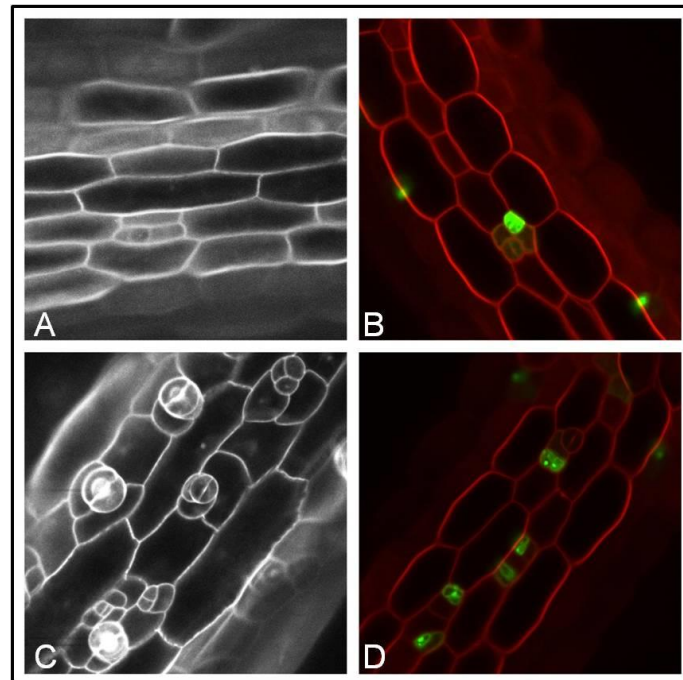


Abbildung 3.15.: Konfokale Bilder des Hypokotyls 3-5 Tage alter Keimlinge. Färbung: Propidiumiodid (weiß/rot) und GFP (grün): *ATML1::DRN-GR* (A) DEX- und (C) DEX+, Expression von *TMM-GFP* im Hintergrund von *ATML1::DRN-GR* (B) DEX- und (D) DEX+.

Da in den induzierbaren Linien sich nur die Zellen in der SZR noch teilten und in den stabil exprimierenden DNA-Gehalte gemessen wurden, welche höher waren als die des Wildtyps, wurde überprüft ob sich die Induktion auf den DNA-Gehalt der Zellen auswirkt. Hierzu wurde der DNA-Gehalt in Zellen von *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Keimlingen im etiolierten und im Licht gekeimten Zustand jeweils mit und ohne Dexamethason gemessen. Dabei wurden nur Zellen untersucht, die nicht an der Stomataentwicklung beteiligt waren und keine Zellteilungen durchliefen.

Die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* ohne Induktion/Kernimport hatte keinen Einfluss auf den DNA-Gehalt, ebenso wie Dexamethason keinen messbaren Effekt auf den DNA-Gehalt von Zellen des Wildtyps hatte (Abb. 3.16. A, C und Tabelle 3.4.).

Epidermale Zellen von im Licht gekeimten und etiolierten *ATML1::DRN-GR* und *ATML1::DRNL-GR* Pflanzen durchliefen in Folge der Induktion mit DEX einen zusätzlichen Endozyklus. Im Licht gekeimte Pflanzen besaßen einen signifikant höheren Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 16C, etiolierte Keimlinge einen erhöhten Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 32C und eine signifikante Verminderung in den Fraktionen 4C und 8C (Abb. 3.16. B, D und Tabelle 3.4.).

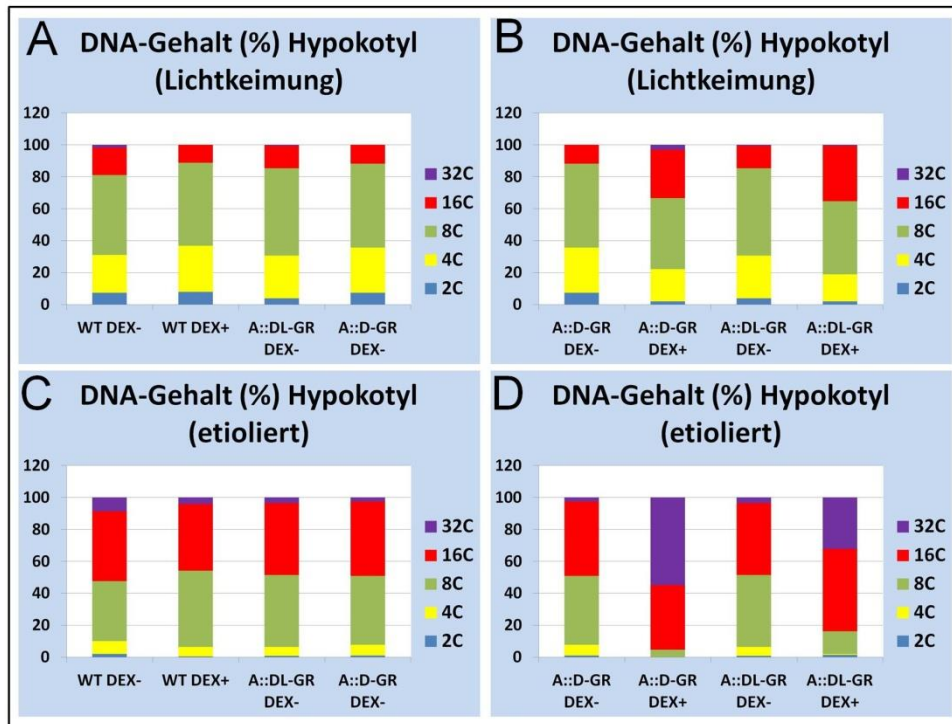


Abbildung 3.16.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse (in % der Gesamtzellzahl) von WT, *ATML1::DRN-GR* und *ATML1::DRNL-GR* 4-5 Tage alter Keimlinge: Im Licht gekeimte A und C. Etiolierte B und D.

DNA-Gehalt Hypocotyl				Licht					Etioliert				
Hintergrund	DEX			2C	4C	8C	16C	32C	2C	4C	8C	16C	32C
WT/Dunkel	n=13 Minus	Mittelwert		1,55556	5	10,3333	3,44444	0,33333	0,38462	1,61538	7,53846	8,92308	1,76923
		STDEV		2,18581	3,39116	3,5	3,43188	0,70711	1,1209	1,38675	4,09503	4,29072	2,0064
		%		7,52688	24,1935	50	16,6667	1,6129	1,92308	8,04196	37,5325	43,7995	8,70296
		P-WERTplus		0,83696	0,45576	0,70075	0,30729	0,0592	0,40937	0,39966	0,22128	0,79841	0,15741
WT/Dunkel	n=11 Plus	Mittelwert		1,70588	6,29412	10,9412	2,29412	0	0,09091	1,18182	9,63636	8,45455	0,81818
		STDEV		1,49016	4,46885	3,92859	2,20127	0	0,30151	1,07872	3,77552	3,20511	0,75076
		%		8,03324	29,6399	51,5235	10,8033	0	0,45455	5,84416	47,7922	41,8615	4,04762
		P-WERTplus		0,4447	0,18745	0,25543	0,00846	0,97159	0,64091	0,01087	0,00074	0,42244	0,00025
<i>A::DL-GR</i>	n=8 Minus	Mittelwert		0,75	5,25	10,75	2,75	0,125	0,18182	1,18182	9,54545	9,54545	0,72727
		STDEV		1,16496	2,71241	2,05287	2,86606	0,35355	0,40452	0,98165	3,75136	3,75136	0,78625
		%		3,84868	26,7434	54,8026	13,9474	0,65789	0,84612	5,52932	45,002	45,1791	3,44353
		P-WERTplus		0,4447	0,18745	0,25543	0,00846	0,97159	0,64091	0,01087	0,00074	0,42244	0,00025
<i>A::DL-GR</i>	n=11 Plus	Mittelwert		0,33333	3,11111	9	7,33333	0,11111	0,25	0,125	2,625	9,625	6
		STDEV		0,70711	2,75882	3,53553	2,73861	0,33333	0,46291	0,35355	2,50357	2,92465	3,8545
		%		1,875	17,0724	45,8553	34,5724	0,625	1,31579	0,65789	14,1813	51,6813	32,1637
		P-WERTplus		0,4447	0,18745	0,25543	0,00846	0,97159	0,64091	0,01087	0,00074	0,42244	0,00025
<i>A::D-GR</i>	n=10 Minus	Mittelwert		1,52941	6	10,8235	2,35294	0	0,2	1,4	8,9	9,6	0,5
		STDEV		1,66274	3,77492	3,45028	2,11959	0	0,42164	1,57762	3,54181	3,89301	0,70711
		%		7,2256	28,4005	52,6354	11,7385	0	0,97619	6,78571	43,0238	46,7619	2,45238
		P-WERTplus		0,01464	0,15371	0,17337	0,00014	0,01817	0,11439	0,00562	2,5E-07	0,48863	3,4E-06
<i>A::D-GR</i>	n=12 Plus	Mittelwert		0,4	4,06667	8,93333	6,06667	0,6	0	0	1	8,75	11,5
		STDEV		0,50709	3,05817	2,96327	2,73774	0,98561	0	0	1,20605	4,86406	5,12569
		%		1,98942	20,0966	44,5581	30,3175	3,03843	0	0	4,60427	40,5549	54,8408
		P-WERTplus		0,4447	0,18745	0,25543	0,00846	0,97159	0,64091	0,01087	0,00074	0,42244	0,00025

Tabelle 3.4.: DNA-Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls: von WT, *ATML1::DRN-GR* (*A::D-GR*) und *ATML1::DRNL-GR* (*A::DL-GR*) von im Licht gekeimten und etiolierten Pflanzen mit Mittelwert, Standardabweichung, Anteil an der gemessenen Gesamtzellzahl (%) und P-Werten (P>0,05 rot; P< 0,05 grün).

Ebenso wie die epidermalen des Hypokotyls durchlaufen auch die „Pavement“-Zellen des Blattes Endozyklen. Auch in Blättern von *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* durchliefen die Zellen einen weiteren Endozyklus, was ebenso in einer größeren Anzahl Zellen mit 16C und weniger Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4C resultierte (Abb. 3.17. und Tabelle 3.5.)

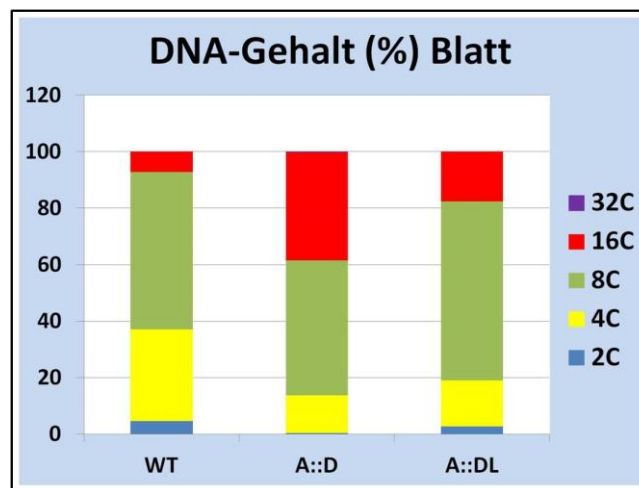


Abbildung 3.17.: Anzahl epidermaler Zellen der abaxialen Seite von Blättern in der jeweiligen C-Klasse (in % der Gesamtzellzahl): Vom Wildtyp, von *ATML1::DRN* (*A::D*) und *ATML1::DRNL* (*A::DL*).

Hintergrund				2C	4C	8C	16C	32C
WT Blatt	n=	12	Mittelwert	1,07692	8	14,3077	2	0
			STDEV	1,75412	6,44205	6,369	1,73205	0
			%	4,60256	32,5	55,6667	7,23077	0
			P-WERTwt	0,07692	3,38462	12,0769	9,61538	0,07692
<i>A::D</i> Blatt	n=	13	Mittelwert	0,27735	3,04243	2,98501	4,44482	0,27735
			STDEV	0,30769	13,3373	47,8343	38,213	0,30769
			%	0,04219	0,02564	0,33875	8,8E-06	0,34745
			P-WERTwt	0,69231	4,07692	15,9231	4,46154	0
<i>A::DL</i> Blatt	n=	13	Mittelwert	1,1094	2,46514	2,84199	3,33205	0
			STDEV	2,72189	16,2012	63,3728	17,7041	0
			%	0,42952	0,04804	0,34642	0,02112	
			P-WERTwt					

Tabelle 3.5.: DNA-Gehalt epidermaler Zellen von der abaxialen Seite von Blättern: Vom Wildtyps, von *ATML1::DRN-GR* und *ATML1::DRNL* (*A::DL*) mit Mittelwert, Standardabweichung, Anteil an der gemessenen Gesamtzellzahl (%) und P-Werten (P>0,05 rot; P< 0,05 grün).

Diese Ergebnisse bestätigten die zuvor gemachten Beobachtungen, dass *DRN* und *DRNL* einen generellen Beitrag zum Übergang von der G1- zur S-Phase innerhalb des Zellzyklus lieferten und eine fördernde Wirkung auf sowohl mitotische Zellzyklen als auch Endozyklen hatten. Der vorherrschende Phänotyp äußerte sich zunächst in Überproliferation epidermaler Zellen im Hypokotyl. Die Zellteilungsaktivität dauerte so lange an, bis ein Differenzierungsprozess einsetzte, der sich beispielsweise in der

Ausbildung von Stomata oder Zellstreckung manifestierte. Aufgrund der Konkurrenz zwischen Endozyklen und mitotischen Zellzyklen und da Zellen nur jeweils eines der beiden Zellzyklusprogramme durchlaufen, lag der Schluss nahe, das *DRN* und *DRNL* den Übergang des G1/S-Kontrollpunktes fördern, da nur dieser Teil des Zellzyklus beiden Prozessen gemeinsam ist und auf gleichen bzw. ähnlichen Kontrollmechanismen beruht (De Veylder et al., 2002).

3.4. Potentielle Zielgene von *DRN* und *DRNL*

Um Aufschluss über potentielle Zielgene von *DRN/DRNL* zu bekommen, anhand derer sich die beobachteten Phänotypen erklären ließen, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt.

Zunächst wurde das Transkriptom stabil exprimierender *ATML1::DRN/DRNL* Linien mit dem des Wildtyps verglichen. Dieser Versuch lieferte Erkenntnisse über das Transkriptom im stationären Zustand, bei dem *DRN* und *DRNL* ektopisch in der Epidermis aktiv waren. Im zweiten Ansatz wurde die Induzierbarkeit der *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Pflanzen genutzt und die Veränderungen des Transkriptoms in Abhängigkeit des Kernimports von *DRN* und *DRNL* untersucht. Dadurch war es möglich, die Antwort auf Transkriptomebene innerhalb eines bestimmten Zeitraums zu analysieren.

Weiterhin wurde das Transkriptom von Pflanzen analysiert, die gleichzeitig mit Dexamethason und Cycloheximid behandelt wurden. Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese, wodurch Gene, die durch *DRN/DRNL* indirekt beeinflusst wurden, im Transkriptom dieser Pflanzen nicht mehr differentiell exprimiert sein sollten. Auf diese Weise ließ sich die Anzahl potentieller Zielgene weiter eingrenzen.

3.4.1. Transkriptomanalysen von *ATML1::DRN/DRNL* und *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR*

Aus dem Vergleich der Transkriptome von Wildtyp mit *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* ergab sich eine Anzahl von jeweils 6227 und 6313 differentiell exprimierten Genen, von denen ungefähr die Hälfte in beiden Fällen jeweils hoch bzw. herunter reguliert war. Näherungsweise waren 2/3 der Gene in

ATML1::DRN/DRNL gemeinsam differentiell exprimiert (Abb. 3.18. A und B). Als signifikant differentiell exprimiert galten dabei diejenigen Gene, die die Signifikanzschwelle von $\log_2 > 0,5$ überschritten.

Dies zeigte deutlich, dass sich die Ähnlichkeit der Phänotypen von *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Pflanzen auch auf Ebene der differentiell exprimierten Gene ausprägte. Dadurch wurde die Annahme unterstützt, dass die durch *DRN* und *DRNL* hervorgerufenen Phänotypen auf ähnlicher bzw. gleicher Funktion beider Gene beruhten und im Folgenden diejenigen Gene genauer untersucht, die durch *DRN/DRNL* gleichermaßen beeinflusst wurden.

Die hohe Anzahl der differentiell exprimierten Gene erlaubte keine direkte Aussage über mögliche primäre Zielgene von *DRN* und *DRNL*, weshalb die Population an Genen eingegrenzt werden musste.

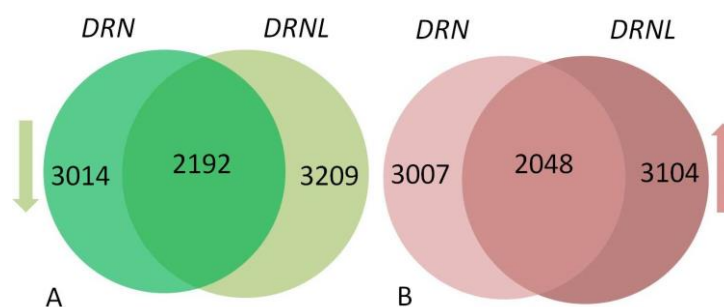


Abbildung 3.18.: Differentiell exprimierte Gene in *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL*: Herunter reguliert (A) und hoch reguliert (B).

Der Kernimport von *DRN* und *DRNL* führte zu einer Anzahl von jeweils 1732 und 2365 differentiell exprimierten Genen (Abb. 3.19.). Von diesen waren in *ATML1::DRN-GR* und *DRNL-GR* jeweils 507 bzw. 1273 herunter (A) und 1255 bzw. 1092 hoch reguliert (B). Unter den gemeinsam differentiell exprimierten Genen waren jeweils 100 Gene herunter und 282 hoch reguliert.

Von den gemeinsam differentiell exprimierten Genen blieben im Transkriptom der Cycloheximid behandelten Pflanzen noch 79 herunter und 255 hoch reguliert.

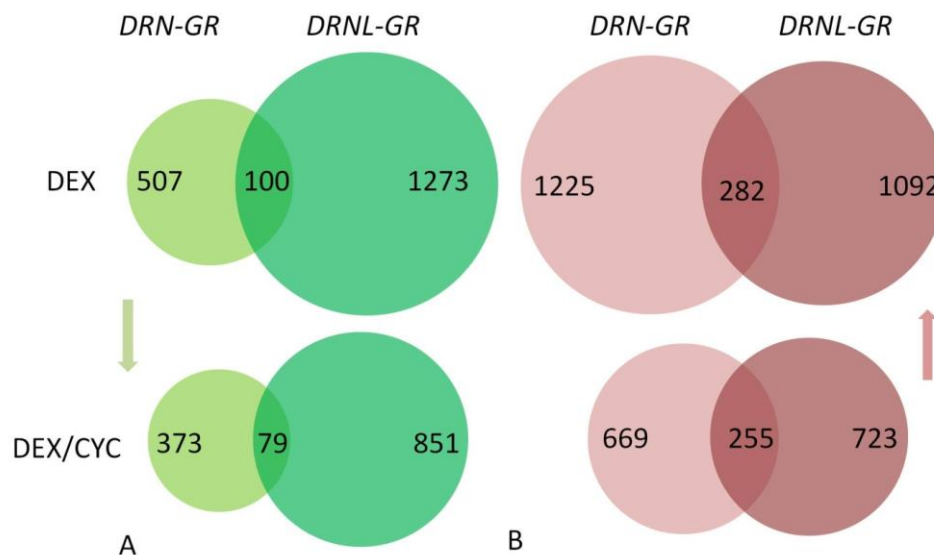


Abbildung 3.19.: Differenziell exprimierte Gene in *ATML1::DRN-GR* und *ATML1::DRNL-GR*: Herunter reguliert (A) und hoch reguliert (B) Die Genidentifikationsnummern dieser Gene sind im Anhang aufgelistet.

3.4.2. S-Phase spezifische Gene sind in *ATML1::DRN/DRNL* und *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Pflanzen differenziell exprimiert

Übereinstimmend mit den zuvor beobachteten Phänotypen bildeten die gemeinsam differenziell exprimierten Gene in *ATML1::DRN/DRNL* und *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* signifikante Schnittmengen mit differenziell exprimierten Genen aus Transkriptomanalysen, die im Rahmen von Studien des G1/S Übergangs durchgeführt wurden.

Beispielsweise ergaben sich Cluster mit differenziell exprimierten Genen in Zellkulturen, die mit Aphidicholin oder Saccharoseentzug aus dem Medium in der S-Phase synchronisiert wurden (Menges and Murray, 2002). Aphidicholin hemmt die DNA-Polymerase α und δ wodurch die Zellen am G1/S Kontrollpunkt bzw. in der frühen S-Phase angehalten werden können (Sala et al., 1980). In diesem Zustand befinden sich bis zu 90% Prozent der Zellen in S-Phase (Sorrell et al., 2001) und besitzen ein hierfür spezifisches Transkriptom.

Eine interessante Schnittmenge ergab sich aus dem Vergleich mit Transkriptomanalysen, die zur Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors *E2Fa-DPa* durchgeführt wurden (Vandepoele et al., 2005).

Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen *35S::E2Fa-DPa* und *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen und da *E2Fa-DPa* eine Schlüsselrolle beim Übergang

zwischen G1- und S-Phase einnimmt (siehe Einleitung), wurde sich im Folgenden auf die Gene konzentriert, welche eine Schnittmenge mit differentiell exprimierten Genen aus den *E2Fa-DPa* Transkriptomanalysen sowie S-Phase Zellkulturen bildeten.

Für das bessere Verständnis sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Zielgenanalysen von *E2F* in zwei Versuchsansätzen erfolgten. Zum einen lagen Daten aus dem Vergleich von *35S::E2Fa* Pflanzen mit dem Wildtyp vor, zum anderen Daten, die aus der Co-Überexpression von *E2Fa* und *DPa* resultierten (<https://www.genevestigator.com/gv/>). Nur die Co-Überexpression von *E2Fa* und *DPa* erzeugt einen starken Überexpressionsphänotyp und führt zur vermehrten Aktivierung S-Phase spezifischer Gene (De Veylder et al., 2002; Vandepoele et al., 2005).

Abbildung 3.20. zeigt am Beispiel der stabil exprimierenden *ATML1::DRN/DRNL* Linien die Vorgehensweise, mit der die Anzahl potentieller Zielgene von *DRN* und *DRNL* eingegrenzt wurde.

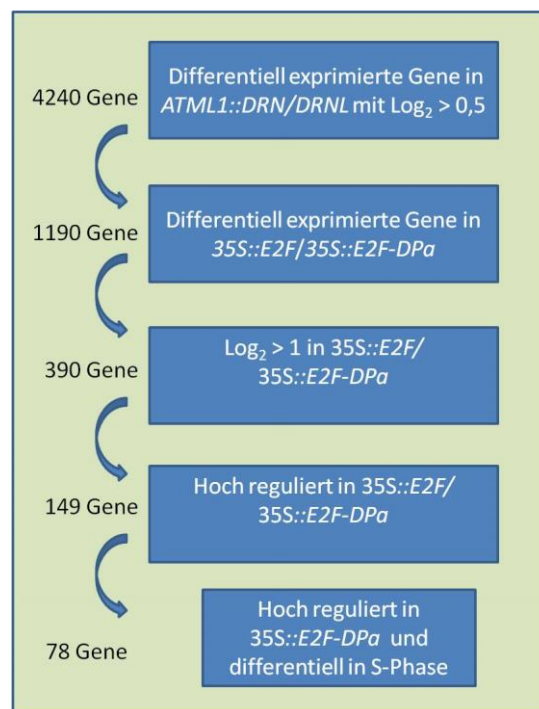


Abbildung 3.20.: Vorgehensweise zur Eingrenzung potentieller Zielgene durch den Vergleich mit *E2Fa* Transkriptomanalysen.

Von 4240 in *ATML1::DRN/DRNL* im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimierten Genen waren im Transkriptom von *35S::E2Fa/35S::E2Fa-DPa* Pflanzen ebenfalls 1190 (ca. 30%) differentiell exprimiert (Abb. 3.20.). Davon waren in *ATML1::DRN/DRNL* 543 hoch (Abb. 3.21. B) und 647 (A) herunter reguliert. Weiterhin wurden nur die Gene selektiert, die in der *35S::E2Fa-DPa* Analyse mindestens um das 2fache ($\log_2 > 1$) hoch bzw. herunter reguliert waren, da in dieser Fraktion, wie durch Vandepoele et al. (2005) gezeigt wurde, vermehrt S-Phase Gene zu finden waren. Dies resultierte in einer Zahl von 390 differentiell exprimierten Genen (Abb. 3.20.), die sich wiederum wie folgt aufteilen:

Von den in *ATML1::DRN/DRNL* 647 reprimierten Genen waren in *35S::E2Fa-DPa* ebenfalls 179 herunter und 32 hoch reguliert (Abb. 3.21. A). Von den in *ATML1::DRN/DRNL* 543 hoch regulierten waren in *35S::E2Fa-DPa* 117 hoch und 62 herunter reguliert (Abb. 3.21. B).

Durch Vandepoele et al. (2005) wurde gezeigt, dass Gene welche bei Eintritt und während der S-Phase exprimiert werden, nur in der Fraktion der durch *E2Fa-DPa* hochregulierten Gene zu finden waren und die Fraktion der herunter regulierten keine Zellzyklus relevanten Gene beinhaltet. Aus diesem Grund und da *E2Fa* ein Transkriptioneller Aktivator ist (Mariconti et al., 2002; Rossignol et al., 2002), wurden zunächst diejenigen Gene genauer untersucht, die in *35S::E2Fa-DPa* hoch reguliert waren. Dies resultierte in einer Zahl von 149 Genen (32 (A) und 117 (B) aus Abb. 3.21.).

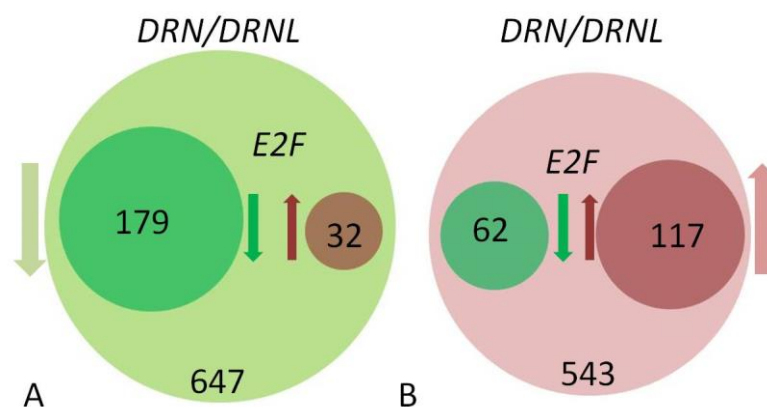


Abbildung 3.21.: Gemeinsam differentiell exprimierte Gene in *35S::E2Fa-DPa* und *ATML1::DRN/DRNL*: In *ATML1::DRN/DRNL* herunter regulierte (A) und hoch regulierte (B). Innere Kreise mit dunkler Färbung zeigen die Gene an, welche in *35S::E2Fa-DPa* mindestens um das zweifache ($\log_2 > 1$) differentiell exprimiert sind.

Abbildung 3.22. zeigt eine Clusteranalyse der 149 in *35S::E2Fa-DPa* hochregulierten Gene im Vergleich mit Transkriptomanalysen von S-Phase Zellkulturen (A), *35S::E2Fa* (B) und *35S::E2Fa-DPa* (C). Die Cluster zeigen hier an, ob Gene in der jeweiligen Analyse differentiell exprimiert waren, unabhängig davon, ob hoch oder herunter reguliert.

Gene, die sowohl in *35S::E2Fa* als auch in *35S::E2Fa-DPa* hochreguliert waren, bildeten keine, oder schwächer ausgeprägte Cluster mit S-Phase Zellkulturen (Abb. 3.22. B, C, grün markiert).

Auffällig waren hingegen die Cluster, in denen die Gene in *35S::E2Fa-DPa* im Gegensatz zu *35S::E2Fa* verstärkt oder ausschließlich hoch reguliert waren und wiederum stärker ausgeprägte Cluster mit Genen aus S-Phase Zellkulturen bildeten (Abb. 3.22. A und C, rote Markierung und Pfeile). Diese Cluster beinhalteten Gene, die nur oder stärker durch die Co-Überexpression von *E2Fa* und *DPa* hochreguliert werden und potentielle direkte Zielgene von *E2Fa* darstellen (Tabelle 3.6.).

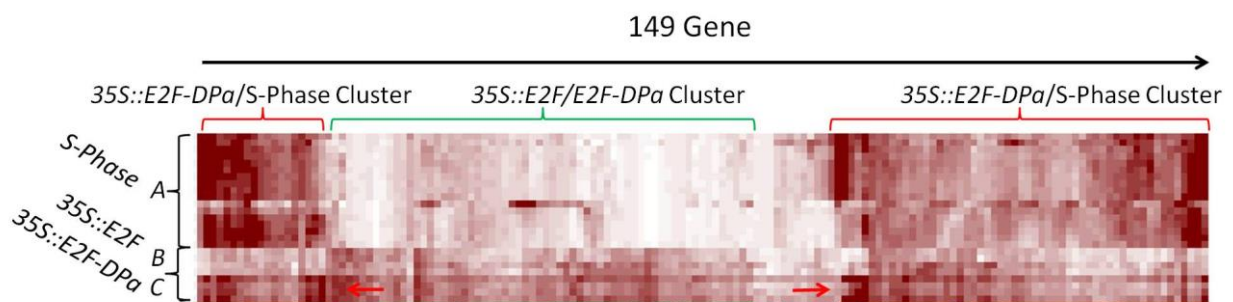


Abbildung 3.22.: Clusteranalyse der 149 in *ATML1::DRN/DRNL* differentiell exprimierten und in *35S::E2Fa* hoch regulierten Gene: Vergleich mit differentiell exprimierten Genen aus S-Phase Zellkulturen (A), *35S::E2Fa* (B) und *35S::E2Fa-DP* (C). Pfeile weisen auf die spezifisch in *35S::E2F-DPa* hoch regulierten Gene hin. Pixel zeigen die differentielle Expression des jeweiligen Gens im Vergleichsarray an. Die Pixelintensität ist repräsentativ für das Expressionspotential jedes einzelnen Gens.

Dunkelste Farben repräsentieren die höchste, in der Datenbank zur Verfügung stehende, gemessene Expression (<https://www.genevestigator.com/userdocs/manual/intro.html>).

Mit den Transkriptomdaten aus den induzierbaren Linien wurde die gleiche Strategie zur Eingrenzung potentieller Zielgene verfolgt wie mit *ATML1::DRN/DRNL* Linien und zunächst die Übereinstimmung mit den in *35S::E2Fa-DPa* hochregulierten Genen überprüft (Abb. 3.20.). Dies resultierte in 79 *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Pflanzen differentiell exprimierten Genen, die in *35S::E2Fa-DPa* hochreguliert waren (Abb. 3.23.).

Sowohl unter den Genen, die spezifisch für *DRN-GR* oder *DRNL-GR* differentiell exprimiert waren, als auch unter denen, die gleichermaßen von *DRN-GR* und *DRNL-GR* abhängig waren, befanden sich ebenfalls S-Phase spezifische Gene, die potentielle *E2Fa* Zielgene darstellten (Abbildung 3.23. und Tabelle. 3.6.).

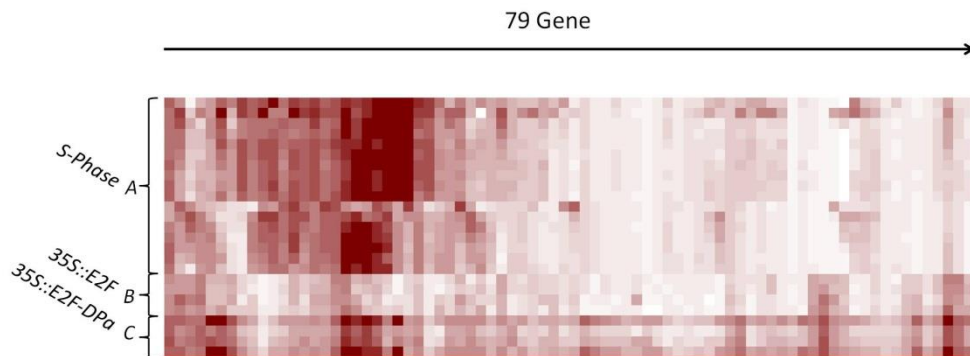


Abbildung 3.23.: Clusteranalyse der 79 in *ATML1::DRN-GR* oder *ATML1::DRNL-GR* differentiell exprimierten und in *35S::E2Fa-DPa* hoch regulierten Gene (rot markiert): Vergleich mit differentiell exprimierten Genen aus S-Phase Zellkulturen (A), *35S::E2Fa* (B) und *35S::E2Fa-DP* (C). Pixel zeigen die differentielle Expression des jeweiligen Gens im Vergleichsarray an. Die Pixelintensität ist repräsentativ für das Expressionspotential jedes einzelnen Gens.

Dunkelste Farben repräsentieren die höchste, in der Datenbank zur Verfügung stehende, gemessene Expression (<https://www.genevestigator.com/userdocs/manual/intro.html>).

Insgesamt ergab diese Analyse, dass in den Transkriptomen der stabil exprimierenden und der induzierbaren *ATML1::DRN/DRNL* Linien Gene differentiell exprimiert waren, die mit Funktionen wie DNA Replikation, DNA-Reparatur, Modifikation der Chromatinstruktur sowie Transkriptionsfaktoren assoziiert werden konnten und zuvor als potentielle *E2Fa* Zielgene identifiziert wurden (Chaboute et al., 2000; Vandepoele et al., 2005).

Tabelle. 3.6. zeigt die Auswahl von Genen, die in *35S::E2Fa-DPa* mindestens um den Faktor 2 hoch reguliert waren, die eindeutig mit der S-Phase korrelieren in mindestens in einer der transgenen Situationen der *ATML1::DRN/DRNL* oder *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Linien differentiell exprimiert waren.

Gen-Nummer	Name	Funktion	DRN	DRNL	DRN-GR	DRNL-GR
AT1G13330	AHP2 Homologue	Chromatinstruktur	0.58	0.53	0.98591	1.5817
AT4G14365	C3HC4-type RING finger	Transkriptionsfaktor	0.75	1.2	1.07154	2.64452
AT3G11000	DCD	Meristem und Karpellentwicklung	0.57	1.27	0.69864	0.60121
AT1G05490	CHR31	Chromatinstruktur	-0.7	-0.6	-0.59266	-0.96336
AT4G14770	ATTCX2	DNA Replikation/Meristem	-0.1	-0.2	-0.3949	-0.97274
AT1G77470	RFC3/EMB2810	DNA Replikation			-0.74379	-1.14325
AT5G48820	KRP3	Endoreplikation/Zellzyklusarrest	-0.4	-0.1	-0.20856	-0.82731
AT3G22760	SOL1	Stomata/Zellzyklus	-0.3	-0.5	-0.63516	-0.51725
AT5G66750	Chromatin remodeling 1	Chromatinstruktur	-0.5	-0.6	-0.02012	-0.21492
AT1G79890	Helicase-related protein	DNA-Replikation	-0.7	-0.8	-0.30605	-0.16078
AT4G25540	MSH3	DNA-Reparatur	-0.4	-0.5	-0.38894	-0.14999
AT1G27880	DEAD/DEAH box RNA helicase	DNA Replikation	-0.2	-0.6	-0.62293	-0.1068
AT3G60660	Unbekannt	DNA-Replikation	-0.5	-0.4	-0.34234	-0.04022
AT5G03700	PAN domain-containing protein	Peptidtransport	0.64	0.75	0.10614	-0.20693
AT2G46200	Unbekannt	Unbekannt	0.5	0.53	-0.2012	0.10929
AT2G29680	CDC6a	Origin Faktor	0.87	0.56	-0.15841	-0.26761
AT3G12530	PSF2	DNA Replikation	0.5	0.4	-0.18838	-0.61625
AT1G78770	APC6	Endoreplikation/DNA Methylierung	0.47	-0.1	-0.24534	-0.6774
AT5G14250	Proteasome Component	G2/M	0.47	0.73	-0.34505	-1.01882
AT5G41880	POLA3	DNA Replikation	0.11	0.16	-0.43953	-0.9574
AT2G07690	MCM5	Replikationsursprung	0.36	0.11	-0.59882	-1.01687
AT1G54690	GAMMA H2AX	DNA-Bindung (Histon)	-0.1	0.04	-0.43034	0.78383
AT5G10400	Histone super family	DNA-Bindung (Histon)	0	-0.1	-0.0014	0.72166
AT5G16690	ORC3	DNA Replikation/Replikationsursprung	0.2	-0.1	0.67899	-0.62146
AT2G42120	POLD2	Replikation	-0.09	-0.12	0.26433	0.79944
AT5G59910	Histone super family	DNA-Bindung (Histon)	-0.4	-0.2	0.09087	0.61907
AT5G44740	UMUC-like DNA repair protein	DNA-Reparatur	-0.5	-0.4	0.04808	0.19524
AT3G54750	Unknown	DNA Replikation/Methylierung	-0.2	-0.2	-0.03392	1.18551
AT3G53650	Histone super family	DNA-Bindung (Histon)	-0.3	-0.4	-0.19855	0.61842
AT1G69770	DMT6	Chromatinstruktur	-0.5	-0.7	-0.28565	0.22029
AT5G62410	CPE	Chromatinstruktur	-0.4	-0.4	-0.29401	0.12599

Tabelle 3.6.: In 35S::E2Fa-DPa hoch regulierte S-Phase Gene: Davon in *ATML1::DRN/DRNL* und *ATNL1::DRN-GR/DRN-GR* hoch reguliert (rot) und herunter reguliert (grün). Hellere Farben zeigen die Gene an, deren differentielle Expression unterhalb der Signifikanzschwelle liegt.

Es zeigte sich, dass viele dieser S-Phase Gene zwar in den einzelnen *ATML1::DRN/DRNL* Linien differentiell exprimiert waren, dies jedoch nicht durchgehend und verschieden voneinander reguliert. Auffällig war hier, dass die meisten der Gene, die keine regulatorische Funktion innerhalb des Zellzyklus besitzen, sondern in Prozesse wie DNA Replikation, DNA-Reparatur und Modifikation der Chromatinstruktur involviert sind, reprimiert waren.

Nach dem Vergleich von stabilen und induzierbaren Linien blieben 4 Gene übrig, die in allen transgenen Situationen gleich reguliert waren (Tabelle 3.6.). Davon waren 3 hoch reguliert, eines herunter, alle aber in *35S::E2Fa-DPa* hochreguliert. Zwei Gene, *AHP2* und *CHR31*, sind involviert in Chromatinmodifikation und stellen typische S-Phase Gene dar.

Zwei andere Gene fielen aufgrund ihrer Funktion auf. Eines davon besitzt eine sogenannte DCD (Development and Cell Death) Domäne, ist in Karpell- und Meristementwicklung involviert und spielt eine Rolle bei der Blütenentwicklung.

XBAT34, ein Transkriptionsfaktor, spielt eine Rolle während der Regulation des programmierten Zelltodes.

Eine Datenbankanalyse ergab, dass alle diese Gene in sich dynamisch verhaltenden, sich teilenden Zellpopulationen, wie dem Infloreszenzmeristem und in sich entwickelnden Blüten und Blättern, exprimiert sind.

Insgesamt bestätigten die Transkriptomdaten der stabilen und induzierbaren Linien die vorher beschriebenen Phänotypen dadurch, dass sie signifikante Schnittmengen mit den Transkriptomen transgener Linien oder Zellkulturen aufwiesen, die in direktem Zusammenhang mit dem G1/S-Übergang stehen.

3.4.3. *ATML1::DRN/DRNL* und *35S::E2Fa/E2Fa-DPa* Pflanzen erzeugen eine ähnliche Sekundärantwort des Transkriptoms

Die in *35S::E2Fa/E2Fa-DPa* reprimierten Gene konnten nicht mit einer Rolle während des Zellzyklus assoziiert werden (Vandepoele et al., 2005). Trotzdem lieferte der Vergleich dieser Gene mit den Transkriptomanalysen aus S-Phase Zellkulturen und *ATML1::DRN/DRNL* interessante Informationen zur Interpretation der Phänotypen von *ATML1::DRN/DRNL* und *35S::E2Fa-DPa*. Mehr als 50% der Gene (Abb. 3.21.), die in *35S::E2Fa/E2Fa-DPa* und *ATML1::DRN/DRNL* reprimiert waren, waren in den S-Phase Zellkulturen nicht differentiell exprimiert (Abb. 3.24.).

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass diese Gene wahrscheinlich keine Funktion beim G1/S Übergang oder innerhalb der S-Phase haben und vermutlich im Rahmen einer Stressantwort differentiell exprimiert wurden.

Dass das Transkriptom in *35S::E2F-DPa* und *AMTL1::DRN/DRNL* Pflanzen auf ähnliche Weise antwortet, wird zudem dadurch unterstützt, dass insgesamt die Mehrzahl der gemeinsam differentiell exprimierten Gene, in die gleiche Richtung reguliert war (Abb. 3.21.).

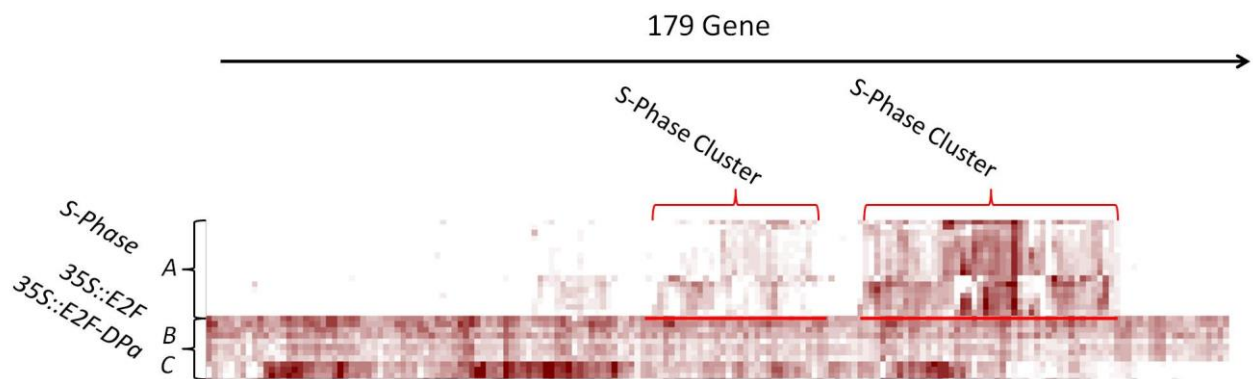


Abbildung 3.24.: Clusteranalyse der 179 in *35S::E2Fa/35SE2Fa-DPa* und *ATML1::DRN/DRNL* herunter regulierte Gene: Vergleich mit differentiell exprimierten Genen aus S-Phase Zellkulturen (A), *35S::E2Fa* (B), und *35S::E2Fa-DP* (C). Pixel zeigen die differentielle Expression des jeweiligen Gens im Vergleichsarray an. Die Pixelintensität ist repräsentativ für das Expressionspotential jedes einzelnen Gens. Dunkelste Farben repräsentieren die höchste, in der Datenbank zur Verfügung stehende, gemessene Expression (<https://www.genevestigator.com/userdocs/manual/intro.html>).

4. Diskussion

Die epidermisspezifische Expression von *DRN* und *DRNL* erwies sich als geeignet, um beide Gene außerhalb ihrer, auf wenige Zellen beschränkten Expressionsdomäne, zu exprimieren. Anders als bei der Expression von *DRN* und *DRNL* unter der Kontrolle des 35S Promotors (Banno et al., 2001; Marsch-Martinez et al., 2006), tolerierten die Pflanzen diese Form der Überexpression.

Die durch die Überexpression erzeugten Phänotypen lieferten in Kombination mit klassischen genetischen Experimenten, Expressions- und Transkriptomanalysen weitere Informationen, die auf die Gen-Funktion von *DRN* und *DRNL* in ihrer natürlichen Expressionsdomäne, dem Meristem, schließen lassen.

Die hier beschriebenen Phänotypen wurden, bis auf wenige Ausnahmen, gleichermaßen bei *DRN* und *DRNL* Überexpressionslinien beobachtet und genutzt um die Gemeinsamkeiten beider Gene herauszuarbeiten und vor dem Hintergrund zu diskutieren, dass beide Gene eine ähnliche Funktion haben.

4.1. DRN und DRNL agieren als Transkriptionsfaktoren

Durch die induzierbaren Linien *ATML1::DRN-GR* und *ATML1::DRNL-GR* wurde zunächst gezeigt, dass DRN bzw. DRNL nukleär lokalisiert sein müssen, um einen Phänotyp zu erzeugen. Die einzelnen phänotypischen Ausprägungen der stabil exprimierenden Linien, waren bei den induzierbaren Linien erst nach Behandlung mit Dexamethason zu beobachten (Abb. 3.7. C und D, Abb. 3.15., Abb. 3.16 und Tabelle 3.4). So konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die beobachteten Phänotypen nicht durch dominant negative Effekte, wie sie durch Titration transkriptioneller Co-Faktoren („Squelching“) hervorgerufen werden können, erzeugt wurden (Berger et al., 1990; Brent and Ptashne, 1985).

DNA-Bindung ist eine weitere für einen Transkriptionsfaktor typische Eigenschaft. Liu et al. (2006) zeigten in *Brassica napus*, dass das konservierte Ala37 in der ERF/AP2-Domäne essentiell für die DNA-Bindung von AP2 Transkriptionsfaktoren ist. Das *bcm-1* Allel ist eine Mutation, welche zu einem Austausch dieses konservierten Ala37 in der AP2-Domäne von DRNL führt (Nag et al., 2007).

Als Kontrolle der DNA-Bindung von DRN, wurde deshalb eine Version von *DRN* kloniert und unter Kontrolle des *ATML1* Promotors ausgeprägt, die genau diese Mutation in der AP2 Domäne trägt. Transgene Pflanzen mit diesem Konstrukt entwickelten keinen Überexpressionsphänotyp, was bestätigte, dass das Ala37 bzw. eine intakte AP2-Domäne essentiell für das Erzeugen der *ATML1::DRN* Phänotypen nötig ist und diese wahrscheinlich von der DNA-Bindung des DRN Proteins abhängig sind (Abb. 3.7. B und G).

Eine weitere Kontrolle diente der Überprüfung der transkriptionellen Aktivierung. Das sogenannte ESR-Motiv in DRN und DRNL agiert als Transaktivierungsdomäne. Eine Deletion des ESR-Motivs führt zu einem Verlust der Sprossregeneration in *in vitro* Kulturen von *35S::DRN* Pflanzen (Nomura et al., 2009).

Transgene Linien, die *DRNΔESR* exprimierten entwickelten ebenfalls keinen Überexpressionsphänotyp (Abb. 3.7. H).

Zusammengenommen deuteten die Notwendigkeit des Kernimports, der DNA-Bindung und der transkriptionellen Aktivierung darauf hin, dass die durch die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* erzeugten Phänotypen, höchstwahrscheinlich auf ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren beruhten.

4.2. *DRN* und *DRNL* verändern zelluläre Muster in der Epidermis

4.2.1. *DRN* und *DRNL* erzeugen Zellteilungspotential und verändern Zellidentitäten im Hypokotyl

Das Hypokotyl ist im Wildtyp frei von jeglicher Zellteilung bis auf einige Zellen der Stomatazellreihe (SZR) im apikalen Teil des Hypokotyls, die an der Stomataentwicklung beteiligt sind (Berger et al., 1998; Gendreau et al., 1997). *ATML1::DRN/DRNL* Keimlinge der T2 Generation entwickelten Hyperplasien im Hypokotyl, die ihren Ursprung in massiver Überproliferation epidermaler Zellen hatten. Diese traten bevorzugt im apikalen Teil auf, waren aber auch im basalen Teil des Hypokotyls zu beobachten (Abb. 3.3).

Genau diese Zellen in der SZR begannen sich in *ATML1::DRN/DRNL* innerhalb der ersten 24h vermehrt zu teilen, bis sie auf die nicht-Stomatazellreihe (nSZR) übergriffen und sich zur Basis hin ausbreiteten (Abb. 3.5.). Dies führte zu der

Annahme, dass sich diejenigen Zellen zunächst vermehrt teilten, die ohnehin über Zellteilungspotential verfügten, wodurch die Proliferation an diesen Stellen stärker war und es zur Bildung von Auswüchsen kam.

DRN und *DRNL* waren zudem in der Lage die im Embryo festgelegten zellulären Muster zu überschreiben und Zellidentitäten zu verändern. Dies zeigte sich darin, dass die Expressionsdomänen von *TMM* und *GL2* verändert waren. In *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen exprimierten mehr Zellen als im WT den Marker der Stomatazelllinie *TMM*. Dabei war das GFP Signal nicht nur in der SZR zu detektieren, sondern auch in der nSZR und war damit ektopisch (Abb. 3.10. A und B). Da *TMM* Expression in der nSZR beobachtet wurde und *GL2* die Bildung von Stomata in der nSZR hemmt (Berger et al., 1998; Hung et al., 1998), wurde die Expression von *GL2* in *ATML1::DRN/DRNL* analysiert.

Die Expression von *GL2* war in *ATML1::DRN/DRNL* zunächst nicht verändert und zeigte ihr typisches alternierendes Muster, bis die einsetzenden Zellteilungen in der nSZR zu einem schrittweisen Verlust von *GL2* Expression führten.

Die *gl2* Mutation führt zu ektopischen Stomata in der nSZR (Berger et al., 1998), weshalb eine mögliche Erklärung darin besteht, dass *GLABRA2* durch *DRN/DRNL* gehemmt wird und es in Folge dessen zur Überproliferation und Bildung ektopischer Stomata in der nSZR kommt. Der von Berger et al. (1998) beschriebene Phänotyp von *gl2* besitzt jedoch in seiner Ausprägung nicht die Intensität, wie der von *DRN/DRNL* erzeugte Phänotyp. Zudem ist die Anzahl der Stomata in der SZR in *gl2* nicht verändert. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass der durch *DRN* und *DRNL* erzeugte Phänotyp alleine auf der Repression von *GL2* beruht. *GL2* war zudem in den Transkriptomanalysen nicht differentiell exprimiert

Eine weitere Erklärung ist, dass durch die zusätzlichen Zellteilungen im Hypokotyl die Zell-Zell Kommunikation gestört wird und dies zum Verlust von *GL2* und zur ektopischen Expression von *TMM* führt. Die Änderung der Identität einer Zelle könnte die Identität von Nachbarzellen beeinflussen. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass die Überproliferation zuerst in der SZR beginnt, wo einige Zellen Teilungskompetenz besitzen, und sich danach in der nSZR fortpflanzt.

Die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* veränderte nicht nur die Zellidentität. Dadurch dass *DRN* und *DRNL* Teilungen von Zellen hervorriefen, die sich normalerweise nicht teilen, waren sie in der Lage das Zellzyklus Programm in den epidermalen Zellen des Hypokotyls zu überschreiben.

4.2.2. Die von *DRN* und *DRNL* erzeugten Phänotypen sind abhängig vom Differenzierungsstatus der Zellen

In der Epidermis des Hypokotyls von *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen war sowohl die Gesamtzellzahl stark erhöht, als auch proportional dazu die Stomataanzahl (Abb. 3.8.). Ca. 10 Tage nach der Keimung kamen die Zellteilungen in der Hypokotylepidermis zum Erliegen und die Bildung von Stomata zeigte, dass die Zellen die Kompetenz zur Differenzierung besaßen und diese anscheinend nicht mehr durch *DRN* oder *DRNL* beeinflusst wurde.

Expressionsanalysen von Markern der Stomatazelllinie zeigten zudem, dass sich späte Zellschicksale durch die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* nicht beeinflussen ließen. In *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen zeigten mehr einzelne Zellen *MUTE* Promotoraktivität, was auf die erhöhte Gesamtzellzahl zurückzuführen war und proportional zu dieser auch mehr Zellen in die Stomatazelllinie eintraten (Abb. 3.10. C und D). Zellen die *MUTE* exprimierten traten zudem nicht in Clustern auf, was darauf hindeutete, dass auch die stomatare Musterbildung normal verlief.

Die Analyse der induzierbaren Linien zeigte, dass sich infolge des Kernimports von *DRN* oder *DRNL* nur die Zellen vermehrt teilten, die auch im Wildtyp Teilungskompetenz aufwiesen (Abb.3.15.). Die Zellen der nSZR hingegen besaßen nicht mehr die Kompetenz sich zu teilen. Dies bedeutete, dass *DRN* und *DRNL* schon vor der Keimung im Kern lokalisiert sein mussten, und der Zeitpunkt der Induktion bzw. des Kernimports zu spät war, um Zellteilungen in der nSZR auszulösen. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich die Zellen, durch die mit der Keimung einsetzende Zellstreckung und der damit einhergehenden Endoreplikation, begannen zu differenzieren und deshalb nicht mehr teilungsfähig waren. Dies wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass etiolierte Keimlinge von stabilen *ATML1::DRN/DRNL* Linien weniger zusätzliche Zellen pro Zellreihe besaßen, als im Licht gekeimte, aber immer noch mehr Zellen als der WT (Abb. 3.14.). Hier teilten sich die Zellen noch, bis die einsetzende Zellstreckung, hervorgerufen durch die Dunkelkeimung, das Zellteilungspotential von *DRN* und *DRNL* unterdrückte.

Die Messungen des DNA-Gehalts zeigten, dass mit einsetzender Differenzierung die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* erhöhte Endoreplikationsraten zur Folge hat. Dies könnte als mögliches „Ausweichen“ interpretiert werden, bei dem

Endozyklen gefördert werden, da die fortschreitende Differenzierung der Zellen keine Zellteilungen mehr zulässt. Der Differenzierungsstatus scheint demnach eine entscheidende Rolle dabei zu spielen, in welcher Form die Anwesenheit von *DRN* oder *DRNL* in epidermalen Zellen des Hypokotyls ausgelesen wird.

Interessanterweise waren die Embryonen von *ATML1::DRN/DRNL* von Zellteilungen nicht betroffen (Abb.3.6.) und zeigten auch keine Veränderungen in ihrem DNA-Gehalt (ohne Abbildung). Erst mit der Keimung erlangten die Zellen des Hypokotyls die Kompetenz sich in Folge der Expression von *DRN/DRNL* zu teilen. Dies zeigte unter anderem, dass die Kontrolle des Zellzyklus bzw. die Musterbildungsprozesse während der Embryonalentwicklung, der Expression von *DRN/DRNL* übergeordnet sind. Dies stimmt mit Befunden aus früheren Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass die Zellen des Embryos am Ende der Embryonalentwicklung in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind und weder weitere Zellteilungen noch Endozyklen durchlaufen können (Barroco et al., 2005; Gendreau et al., 1998; Sliwinska et al., 2009). Die Kompetenz, die *DRN* und *DRNL* benötigen, um Zellteilungen in der Epidermis des Hypokotyls zu fördern, scheint demnach darin zu bestehen, dass das Entwicklungsprogramm der Zelle grundsätzlich den Eintritt in den Zellzyklus ermöglichen muss.

4.2.3. *DRN* und *DRNL* agieren unabhängig von Schlüsselregulatoren der Stomataentwicklung

Die vermehrten Zellteilungen in der Stomatazellreihe und Stomatacluster in der Epidermis von Kotyledonen und Blättern zeigten, dass *DRN* und *DRNL* die Stomataentwicklung direkt oder indirekt beeinflussen.

Funktionsverlustmutanten von *TMM*, *SPCH* und *MUTE* bilden keine Stomata im Hypokotyl aus (MacAlister et al., 2007; Nadeau and Sack, 2002; Pillitteri et al., 2007). Eine Mutation in *CYCD4;2* führt zu einer reduzierten Anzahl von Zellen und Stomata in der SZR (Kono et al., 2007).

Kreuzungen von *DRN/DRNL* mit diesen Mutanten ergab, dass der durch *DRN* und *DRNL* erzeugte Phänotyp im Hypokotyl unabhängig von der Funktion dieser Gene ist.

Dadurch das *DRN/DRNL* als Transkriptionsfaktoren agieren, *TMM* an der Zell-Zell Kommunikation beteiligt ist und sie nicht in einer genetischen Abhängigkeit

zueinander stehen, ist weitgehend auszuschließen, dass beide Gene eine Funktion innerhalb desselben regulatorischen Netzwerks haben.

Auch besteht keine genetische Interaktion zwischen *MUTE* und *DRN* bzw. *DRNL*. Zwar wäre es möglich, dass *MUTE* und *DRN/DRNL* als Transkriptionsfaktoren die gleichen Zielgene beeinflussen, da *MUTE* aber einen Differenzierungsprozess kontrolliert, *DRN* und *DRNL* hingegen Zellteilungen fördern, ist dies auch eher unwahrscheinlich.

Die *spch-3* Mutante zeigt hingegen keine Zellteilungen in der Epidermis von Hypokotyl und Kotyledonen und die gesteigerte Aktivität von *SPCH* führt zu Überproliferation sowie mehr Zellen, die in die Stomataentwicklung eintreten und Cluster bilden (Lampard et al., 2008). Diese Mutation hatte ebenfalls keinen Einfluss auf den von *DRN* und *DRNL* erzeugten Phänotyp. Die Zellen des Hypokotyls teilten sich in *spch-3* ebenfalls unter dem Einfluss von *DRN* und *DRNL*, jedoch kam es nicht zur Ausbildung von Stomata.

Das von *DRN* und *DRNL* erzeugte Zellteilungspotential war demnach unabhängig von *SPCH*. Hier wäre es möglich, dass *DRN/DRNL* in der Epidermis „downstream“ von *SPCH* agieren und nur ein Teilaspekt des *spch-3* Phänotyps, nämlich Zellteilung, durch *DRN/DRNL* gerettet wird. Der Eintritt in die Stomatazelllinie aber benötigte immer noch die vollständige Funktion von *SPCH*. Dies würde damit übereinstimmen, dass *SPCH* in seiner natürlichen Funktion zwei Aufgaben, nämlich die Differenzierung der protodermalen Zelle zur Meristemoidmutterzelle und die anschließende asymmetrische Zellteilung, übernimmt (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007).

Interessanterweise hatten *DRN/DRNL* keinerlei Einfluss auf die epidermalen Zellen der Kotyledonen von *spch-3* und erzeugten hier keine zusätzlichen Zellteilungen.

Die Mutante von *TMM* ist ein Beispiel dafür, dass Stomataentwicklung in Stamm und Hypokotyl anderen Kontrollmechanismen unterliegt, als in Kotyledonen und Blättern (Geisler et al., 1998; Nadeau and Sack, 2002; Shpak et al., 2005). Ähnlich dazu scheint die Kompetenz, die *DRN* und *DRNL* benötigen, um Zellteilungen zu fördern, im Hypokotyl eine andere zu sein als in den Kotyledonen, wo die Aktivität von *SPCH* benötigt wird.

Aufgrund dessen, dass die natürliche Expressionsdomäne von *SPCH* und *DRN/DRNL* zeitlich klar voneinander getrennt ist, *SPCH* und *DRN/DRNL* zwar in epidermalen Zellen aktiv sind, jedoch zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien, ist

es auch in diesem Fall wahrscheinlich, dass die drei Gene unabhängig von ihrer jeweiligen Funktion agieren. Da *SPCH* Einfluss auf den Zellzyklus nimmt und bei gesteigerter Aktivität ähnliche Phänotypen erzeugt wie *DRN* bzw. *DRNL*, wäre es möglich dass sie ein überschneidendes Set an Zielgenen bedienen.

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass *DRN* und *DRNL* unabhängig von Genfunktionen der Stomatazelllinie in die Zellzykluskontrolle eingreifen und diese stören.

Die Kreuzung mit der *cycD4;2-1* Mutante ergab ebenfalls, dass keine genetische Abhängigkeit zwischen *DRN/DRNL* und *CYCD4;2* besteht.

Dies bedeutete einerseits, dass *CYCD4;2* als direktes Zielgen von *DRN* und *DRNL* nicht mehr in Frage kam, zum anderen, dass beide Gene wahrscheinlich „downstream“ oder parallel von Cyclinen oder CDKs agierten.

4.2.4. Der Blattphänotyp von *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN* Überexpressionslinien

Die Blätter in *ATML1::DRN/DRNL* zeigten starke Veränderungen in ihrer Form, dadurch dass sie sich verdreht und eingerollt waren (Abb. 3.4.). Obwohl die Vermutung nahe lag, dass ähnlich wie im Hypokotyl, überzählige Zellteilungen für die Veränderungen der Blattform verantwortlich waren, wurden im Blatt keine signifikanten Veränderungen der Zellanzahl in der Epidermis gemessen.

Der einzige Hinweis, dass die zelluläre Musterbildung in Blättern von *AMTL::DRN/DRNL* Pflanzen gestört war, blieb die Bildung von Stomataclustern. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich die ektopische Expression von *DRN/DRNL* positiv auf die Zellstreckung auswirkt. Ein Hinweis hierfür ist, dass die epidermalen Zellen von Blättern in *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen erhöhte Endoreplikationsraten aufwiesen, die normalerweise im Rahmen von Zellstreckungsprozessen auftreten. Jedoch wäre hier eine Veränderung der Zellanzahl zu erwarten.

Wie zuvor beschrieben hatten Differenzierungsprozesse im Hypokotyl einen entscheidenden Einfluss auf den von *DRN/DRNL* erzeugten Phänotyp. Dies verhielt sich ähnlich im Blatt, was sich darin zeigte, dass Blätter, deren Primordien unter dem Binokular schon deutlich zu erkennen waren und die mit Dexmethason besprüht wurden, keine Veränderung der Blattform aufwiesen (Abb. 3.7.). Erst Blätter, die danach entstanden, entwickelten den typischen *ATML1::DRN/DRNL* Phänotyp.

Interessanterweise zeigten auch Tragblätter von Infloreszenzen Blattveränderungen, obwohl diese zum Zeitpunkt des Kernimports von DRN und DRNL noch nicht gebildet waren (Abb.3.7. C und D). Dies bedeutet, dass die gesteigerte Aktivität von *DRN* und *DRNL* in meristematischen Zellen Auswirkungen auf Zellen hat, die sowohl räumlich als auch zeitlich von der Expression bzw. Aktivität von *DRN/DRNL* entfernt waren. Was dies für die mögliche Funktion beider Gene bedeutet, wird im Abschnitt 4.5. diskutiert.

4.3. *DRN* und *DRNL* fördern die Überschreitung des G1/S Kontrollpunktes im Zell-Zyklus

Überproliferation epidermaler Zellen war sowohl in der Stomatazellreihe zu beobachten, in der im Wildtyp die Zellen geringe Teilungsaktivität aufweisen, wie auch in der nSZR, wo die Zellen normalerweise Endozyklen durchlaufen und sich nicht teilen. Hier lag zunächst der Schluss nahe, dass die ektopische Expression von *DRN/DRNL* gezielt die Mitose fördert und Endozyklen unterdrücken kann.

Die Messung des DNA-Gehalts in lichtgekeimten *ATML1::DRN* Keimlingen ergab eine signifikant höhere Anzahl an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2C, was auf die erhöhte Zellteilungsaktivität zurückzuführen war. Diese Verteilung für die einzelnen C-Fractionen ergab sich aus dem direkten Vergleich der absoluten Zellzahlen pro Fraktion mit dem Wildtyp. Hier war auffällig, dass es ebenso eine erhöhte Anzahl Zellen mit einem DNA-Gehalt von 8C und 16C gab (Abb. 3.13.). Dies konnte zunächst mit der erhöhten Gesamtanzahl an Zellen in *ATML1::DRN* Keimlingen erklärt werden.

Verglich man aber die Zellzahlen für die einzelnen C-Fractionen relativ zur gemessenen Gesamtanzahl Zellen, zeigte sich, dass verhältnismäßig mehr Zellen einen DNA-Gehalt von 16C besaßen als der Wildtyp. (Abb. 3.12.). Demnach war Endoreplikation in *ATML1::DRN* nicht grundsätzlich gehemmt, sondern die Zellen durchliefen vermehrt Endozyklen.

Die induzierbaren Linien *AMTL1::DRN/DRNL-GR* zeigten nach Induktion nur Zellteilung in der Stomatazellreihe. Messung des DNA-Gehalts in Zellen, die sich nicht teilten, ergab, dass in Folge des Kernimports von DRN und DRNL die epidermalen Zellen des Hypokotyls einen weiteren Endozyklus durchliefen. Sowohl

bei im Licht gekeimten, als auch bei etiolierten Keimlingen verschoben sich die DNA-Gehalte um einen weiteren Endozyklus (Abb. 3.16.).

Der durch *DRN/DRNL* hervorgerufene Phänotyp im Hypokotyl ließ sich dadurch in zwei Aspekte unterteilen. In den stabil exprimierenden Linien förderten *DRN* und *DRNL* zunächst Zellteilungen in der Epidermis. Mit einsetzender Differenzierung aber, durchliefen im Verhältnis mehr Zellen Endozyklen. Dies wurde durch die induzierbaren Linien bestätigt, bei der sich nur die Zellen mit Zellteilungspotential in der SZR vermehrt teilten, die anderen aber weitere Endozyklen durchliefen (Abb. 3.15. und 3.16.)

Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass *DRN* und *DRNL*, abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle, den G1/S Übergang begünstigen. Sobald Differenzierung, beispielsweise in Form von Zellstreckung einsetzte, wurde die Überschreitung des G2/M Übergangs unterdrückt und die Zellen teilten sich nicht mehr. Der stimulierende Effekt auf den G1/S-Übergang blieb dabei erhalten, was sich in erhöhten Endoreplikationsraten widerspiegelte. Die Stimulierende Wirkung von *DRN* und *DRNL* auf den G1/S Übergang war auch in der Epidermis von Blättern zu beobachten, wo sich zwar keine Unterschiede in der Zellanzahl messen ließen, jedoch signifikant erhöhte Endoreplikationsraten zu verzeichnen waren.

4.4. Transkriptomanalysen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen beruhten auf Informationen aus vergangenen Studien in denen gezeigt wurde, dass die Überexpression von *DRN* oder *DRNL* die Sprossregeneration aus Kalluskulturen beschleunigt. (Banno et al., 2001; Ikeda et al., 2006). Zudem erzeugte die ektopische Expression beider Gene nahezu den gleichen Phänotyp was darauf hindeutete, dass beide Gene eine ähnliche Funktion haben und damit in den Transkriptomdaten biologische Replikate darstellen. Gleichzeitig zur Anfertigung dieser Arbeit wurden die Transkriptomdaten mit statistischen Methoden validiert, jedoch lagen die Ergebnisse dieser Untersuchung bei Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor.

4.4.1. S-Phase spezifische Gene sind in Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* differentiell exprimiert

Die Auswertung der Transkriptomdaten der stabil und induzierbar exprimierenden *ATML1::DRN/DRNL* bzw. *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Linien zeigte, dass die epidermisspezifische Expression von *DRN* oder *DRNL*, die differentielle Expression von Genen zur Folge hat, die eine Schnittmenge mit differentiell exprimierten Genen aus Transkriptomanalysen bildeten, die für Studien des Zellzyklus und des G1-S Übergangs durchgeführt wurden (Borghi et al., 2010; Menges et al., 2002; Vandepoele et al., 2005).

Aus dem Vergleich der Transkriptome von *ATML1::DRN/DRNL* und *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* Pflanzen mit differentiell exprimierten Genen aus S-Phase Zellkulturen sowie in *35S::E2Fa-DPa* Pflanzen hochregulierten Genen ergab sich jeweils eine Zahl von 149 bzw. 79 Genen (Abb. 3.22. und 3.23.). Unter diesen befanden sich insgesamt 31 Gene, die eindeutig mit der S-Phase assoziiert werden konnten, potentielle *E2Fa-DPa* Zielgene darstellten und mindestens in einer der transgenen *AMTL1* Linien differentiell exprimiert waren (Tabelle 3.6.). Hier ist nicht auszuschließen, dass sich unter diesen 149 bzw. 79 Genen weitere befinden, die eine S-Phase spezifische Funktion besitzen, die aber bislang nicht beschrieben wurden.

4.4.2. Die Überexpression von *E2Fa* und *DRN/DRNL* erzeugt eine ähnliche Sekundärantwort des Transkriptoms

Die zuvor beschriebene phänotypische Ähnlichkeit von *ATML1::DRN/DRNL* und *35S::E2F-DPa* Pflanzen spiegelte sich auch darin wieder, dass die Mehrzahl der Gene, die sowohl in *ATML1::DRN/DRNL* als auch in *E2Fa-DPa* Pflanzen gemeinsam differentiell exprimiert waren, auch jeweils in die gleiche Richtung reguliert waren (Abb. 3.21.). Die Mehrzahl der herunter regulierten Gene war zudem in S-Phase Zellkulturen nicht differentiell exprimiert, was zeigt, dass diese Gene keine Relevanz während der S-Phase haben und vermutlich in Folge einer Stressantwort differentiell exprimiert werden (Abb. 3.24.). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass das Transkriptom in beiden transgenen Situationen, unabhängig davon ob *E2Fa* und *DRN/DRNL* gleiche Zielgene bedienen, auf ähnliche Weise antwortet.

4.4.3. Potentielle Zielgene von *DRN* und *DRNL*

Die gemeinsam differentiell exprimierten Gene in den stabilen Linien, waren ungefähr zu gleichen Teilen hoch bzw. herunter reguliert (Abb. 3.18.) Bei den induzierbaren Linien, waren im Falle von *DRN* mehr Gene hoch, im Fall von *DRNL* mehr Gene herunter reguliert (Abb. 3.19.) Unter den gemeinsam differentiell exprimierten Genen waren jedoch fast dreimal so viele Gene gemeinsam hoch reguliert, wie herunter. Dies deutete darauf hin, dass *DRN* und *DRNL* wahrscheinlich transkriptionelle Aktivatoren sind (Abb. 3.19.).

Gene, die keine regulatorische Funktion innerhalb des Zellzyklus besitzen und ausschließlich an der Strukturveränderung, Replikation und Reparatur von DNA beteiligt sind, waren herunter reguliert oder nicht einheitlich in der jeweiligen transgenen Situation exprimiert. Ihre Repression bzw. nicht einheitliche Expression in *ATML1::DRN/DRNL* und *ATML1::DRN-GR/DRNL-GR* lässt sich dadurch erklären, dass sich das Transkriptom der stabil exprimierenden im Gegensatz zu den induzierbaren Linien in einem stationären bzw. Gleichgewichtszustand befindet und sich auf die ektopische Expression von *DRN* und *DRNL* eingestellt hat. Demnach stellen diese Gene wahrscheinlich keine potentiellen Zielgene von *DRN* und *DRNL* dar.

Unter den Genen mit regulatorischer Funktion innerhalb des Zellzyklus befanden sich Einige, durch deren Funktion, die von *DRN* und *DRNL* erzeugten Phänotypen zu erklären sind.

CDC6 (*CELL DIVISION CONTROL 6*) war in den stabil exprimierenden *ATML1::DRN/DRNL* Linien hoch reguliert und ist ein sogenannter „licensing“ Faktor. *CDC6* ist an der Initiierung der DNA-Replikation beteiligt und fördert abhängig vom Zelltyp Proliferation und Endoreplikation (Castellano Mdel et al., 2004). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Überexpression von *E2Fa* ebenso wie die von *DRN/DRNL* zu Überproliferation im Hypokotyl und zu erhöhten Endoreplikationsraten führt (de Jager et al., 2001; De Veylder et al., 2002).

SOL1 (*TSO1-LIKE*) und *ATTCX2* sind, wie ihr Homolog *TSO1*, involviert in die Kontrolle von Zellexpansion und Zellproliferation während der Blütenbildung und zeigen eine hohe Promotoraktivität im Sprossapex und in Blüten (Andersen et al., 2007; Hauser et al., 2000; Liu et al., 1997). *SOL1* war in den *ATML1* Linien in 3 Fällen, *ATTCX2* war hingegen nur in einem Fall herunter reguliert.

COP9 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 13, COP13) kodiert für eine Untereinheit des *COP 9* Signalosoms (*CSM*). *COP9* ist ein in Eukaryoten konservierter multimerer Proteinkomplex (Schwechheimer, 2004; Wei et al., 2008). In *Schizosaccharomyces pombe* fördert *COP9* den Eintritt in die S-Phase (Mundt et al., 1999). In *Arabidopsis* führen Mutationen in *CSN*-Untereinheiten zu einem Wachstumsstopp von Keimlingen, der auf in der G2-Phase arretierte Zellen und Fehlexpression G2/M-Phase spezifischer Gene zurückzuführen ist (Dohmann et al., 2008). *COP9* war in den stabil exprimierenden Linien signifikant hoch, in den induzierbaren hingegen nicht-signifikant herunter reguliert.

Von den 31 S-Phase Genen waren 4 in allen *ATML1* Linien gemeinsam differentiell exprimiert. Eines davon, involviert in die Veränderung der Chromatinstruktur, war herunter, die übrigen 3 waren hoch reguliert.

AHP2 kodiert für ein HOP2 Homolog und ist an der Separation homologer Chromosomen beteiligt.

XBAT34 (*XB3 ORTHOLOG 4*) gehört zu der *XB3*-Familie für die in *Nicotiana benthamiana* gezeigt wurde, dass Mitglieder dieser Familie an der Induktion des programmierten Zelltodes beteiligt sind (Huang et al., 2013). Publikationen über diese Gen-Familie lieferten jedoch keine weiteren Informationen über die exakte Funktion von *XBAT34*.

Ein weiteres hochreguliertes Gen, *AT3G11000*, welches bisher noch nicht genau beschrieben worden ist, besitzt eine sogenannte DCD-Domäne (*DEVELOPMENT AND CELL DEATH*) und ist in Abhängigkeit von *AGAMOUS* hoch reguliert (Gomez-Mena et al., 2005). Für *AGAMOUS* konnte gezeigt werden, dass es Meristemaktivität begrenzt und die Bildung von Stamen und Karpellen fördert (Bowman and Meyerowitz, 1991; Mizukami and Ma, 1997).

AGAMOUS selber ist in *ATML1::DRN/DRNL* herunter reguliert.

Neben der Eigenschaft, dass diese Gene die zuvor beschriebenen Phänotypen erklären können, sind sie alle im Sprossapex und in sich teilenden Geweben exprimiert. Demnach haben sie überlappende Expressionsdomänen mit *DRN* und *DRNL*, was sie zusätzlich als potentielle Zielgene interessant macht.

Gene die für CDKs und Cycline kodieren, waren in den jeweiligen Transkriptomen nur in Einzelfällen und nie durchgängig differentiell exprimiert, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass *DRN* und *DRNL* auf diesem Wege in den Zellzyklus eingreifen. Durch Ikeda et al. (2006) wurde zwar gezeigt, dass *CYCD1;1* in

Abhängigkeit von *DRNL* hoch reguliert wird und ein direktes Zielgen darstellt, jedoch konnte dies in keiner der Transkriptomanalysen in dieser Arbeit bestätigt werden.

Im Transkriptom von *DRN/DRNL* waren *E2Fa* und *RBR* ebenfalls nicht differentiell exprimiert, und kamen deshalb als Zielgene nicht in Frage, womit es unwahrscheinlich ist, dass *DRN* und *DRNL* über die Transkriptionskontrolle von *E2Fa* oder *RBR* agieren. Über *DPa* kann an dieser Stelle keine Aussage gemacht werden, da hierzu keine Expressionsdaten vorlagen. Weiterhin sind *DRN* und *DRNL* nicht als potentielle Zielgene von *E2Fa* identifiziert worden (Vandepoele et al., 2005).

Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen *DRN/DRNL* und *E2Fa* ist, dass *DRN* und *DRNL* normalerweise in einer kleinen Zellpopulation exprimiert sind. *E2F* ist aufgrund seiner generellen Rolle im Zellzyklus in Zellen exprimiert, die Zellteilungen oder Endozyklen durchlaufen (De Veylder et al., 2002). Damit besitzen *DRN* und *DRNL* höchstwahrscheinlich eine andere bzw. weitaus speziellere Funktion als *E2F*.

Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass *35S::E2Fa-DPa* Pflanzen nur Überproliferation in der Stomatazellreihe zeigten (De Veylder et al., 2002). Das fördern von ektopischen Zellteilungen in der nicht-Stomatazellreihe ist damit spezifisch für *DRN* und *DRNL*. Demnach scheinen *DRN* und *DRNL*, anders als *E2Fa*, nicht nur den G1/S-Übergang zu fördern, sondern sind zusätzlich in der Lage Zellidentitäten zu verändern.

Sowohl den phänotypischen Unterschieden von *35S::E2Fa-DPa* und *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen als auch den Unterschieden auf Transkriptomebene könnten möglicherweise auch quantitative Effekte zu Grunde liegen, da *DRN* und *DRNL* unter der Kontrolle des *ATML1* Promotors epidermisspezifisch, *E2F* und *DPa* hingegen unter der Kontrolle des *35S* Promotors ausgeprägt wurden. Diese Überexpression von *E2F* ist zudem nicht auf gleiche Weise ektopisch, wie die von *DRN/DRNL*. Im Hypokotyl ist *E2F* lediglich lokal überexprimiert, da der *E2F* Promotor natürlicherweise in den epidermalen Zellen des Hypokotyls aktiv ist (De Veylder et al., 2002).

Ein interessanter Befund und Hinweis, dass *DRN/DRNL* möglicherweise indirekt in das *RBR/E2F* Netzwerk integriert sind, war, dass *E2Fd/DEL2* in den stabil exprimierenden Linien signifikant hochreguliert war. *E2Fd/DEL2* ist ein untypischer Transkriptionsfaktor der *E2F/DP* Familie und unterscheidet sich von *E2Fa/E2Fb/E2Fc* in seinem Aufbau (siehe Einleitung). Sozzani et al. 2010 zeigten, dass *E2Fd/DEL2* eine Funktion während der Kontrolle von Proliferation und

Differenzierung hat und in Folge seiner Überexpression *E2Fa*, *E2Fb* und *E2FE/DEL1* hoch reguliert werden.

Hier müssten Kreuzungen durchgeführt werden, um mögliche genetische Interaktionen nachzuweisen oder auszuschließen.

Zusammengefasst zeigten die Transkriptomdaten den deutlichen Zusammenhang zwischen erhöhten Zellteilungs- und Endoreplikationsraten und differentieller Genexpression S-Phase spezifischer Gene in *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen. Dies zeigte sich in der Ähnlichkeit zu Transkriptionsanalysen von S-Phase Zellkulturen und *35S::E2Fa-DPa* Pflanzen und ließ auf eine Rolle für *DRN* und *DRNL* beim G1/S Übergang schließen. Zudem deuteten die Daten darauf hin, dass *DRN* und *DRNL* unabhängig bzw. parallel von CDKs, Cyclinen, *RBR* und *E2Fa* innerhalb des regulatorischen Netzwerks des Zellzyklus agieren, indem sie möglicherweise Gene, wie zum Beispiel *CDC6*, *COP9*, *AT3G11000* oder auch *E2Fd/DEL2* regulieren.

Um letztendlich echte Zielgene von *DRN* und *DRNL* zu identifizieren, müssen weitere experimentelle Ansätze verfolgt werden.

Parallel zu dieser Arbeit wurden ChIP-Seq Experimente durchgeführt, um physikalische Bindungsstellen von *DRN* zu identifizieren. Diese Ergebnisse lagen bei Anfertigung dieser Arbeit noch nicht vor. Zusammen mit den Transkriptomdaten aus dieser Arbeit und RT-PCR Experimenten wird es möglich sein, Zielgene von *DRN* (*DRNL*) zu identifizieren.

4.5. Die Rolle von *DRN* und *DRNL* im Infloreszenz- und Blütenmeristem

Die hier dargestellten Ergebnisse beruhen auf einer epidermisspezifischen Expression von *DRN* und *DRNL*. Dieser experimentelle Ansatz wurde verfolgt um beide Gene außerhalb ihrer natürlichen, auf eine kleine Population von Zellen beschränkten Expressionsdomäne, zu exprimieren.

In der Epidermis erzeugten *DRN* und *DRNL* zusätzliche Zellteilungen und zwar sowohl in Zellen die grundsätzlich Zellteilungskompetenz besaßen, als auch in Zellen die sich normalerweise nicht teilen, jedoch noch nicht differenziert waren. *DRN* und *DRNL* förderten gleichermaßen Mitosen und Endozyklen bis mit einsetzender Differenzierung das erzeugte Zellteilungspotential verloren ging und die Zellen nur noch Endozyklen durchliefen.

Im Meristem ist *DRN* in der zentralen Stammzellzone exprimiert und *DRNL* in den Gründerzellen der Blütenorgane an der Peripherie des Meristems (Chandler et al., 2011b). In der zentralen Stammzellzone besitzen die Zellen Teilungspotential, weisen aber geringe Zellteilungsraten auf. In Richtung der Peripherie zeigen Zellen zunehmende Zellteilungsaktivität, die im äußeren Bereich der zentralen Stammzellzone bereits größer ist als im Zentrum. In den peripheren Bereichen des Meristems sind die Zellteilungsraten am höchsten (Besnard et al., 2011; Laufs et al., 1998). *DRN* und *DRNL* sind demnach in einem Gewebe aktiv, in dem die Zellen undifferenziert sind und Zellteilungspotential besitzen und nach aktuellem Wissenstand keine Endozyklen durchlaufen (Besnard et al., 2011; Laufs et al., 1998). Dies legt den Schluss nahe, dass die erhöhten Endoreplikationsraten im Hypokotyl das Resultat aus der Aktivität von *DRN* und *DRNL* und einem konkurrierenden Differenzierungsprogramm sind. Hierdurch wird ein interessanter Aspekt der Funktion von *DRN* und *DRNL* deutlich. Beide Gene scheinen im Sprossapex Zellteilungen zu fördern, indem sie sowohl den G2/M als auch den G1/S-Übergang stimulieren. Die übermäßige Zellproliferation im Hypokotyl deutet darauf hin, dass *DRN* und *DRNL* den G2/M Übergang begünstigen. Die Förderung des G1/S Übergangs in Form von erhöhten Endoreplikationsraten scheint letztendlich eine Restfunktion von *DRN* und *DRNL* zu sein, die offensichtlich wird, wenn Zellen, die eines der beiden Gene exprimieren, in einen Differenzierungsprozess eingetreten sind.

Dass *DRN* und *DRNL* eine stimulierende Wirkung auf Zellproliferation haben, geht auch aus früheren Studien hervor. Zunächst beschleunigt die Überexpression von *DRN/DRNL* die Sprossregeneration aus Kalluskulturen (Banno et al., 2001; Ikeda et al., 2006). Weiterhin hat die lokale Überexpression von *DRN*, wie im Falle von *drn-D*, ein vergrößertes Meristem zur Folge (Kirch et al., 2003).

In der *bcm-1 (drnl-2)* Mutante werden die Primordien der Blütenorgane angelegt, sind aber nicht in der Lage auszuwachsen, was auf verminderte Zellteilungsraten zurückzuführen sein könnte (Nag et al., 2007).

Die Ergebnisse deuten weiterhin darauf hin, dass die Förderung von Zellteilungen unabhängig von Auxin geschieht. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass die Expression von *DRN* und *DRNL* räumlich und zeitlich von der Aktivität des *DR5* Promotors abweicht (Chandler et al., 2011b). Dies stimmt weiterhin mit der Beobachtung überein, dass Auxin „Upstream“ des durch CDK/Cyclin kontrollierten Netzwerkes agiert (Inze and De Veylder, 2006), die Transkriptomdaten aber darauf

schließen lassen, dass *DRN* und *DRNL* parallel bzw. unabhängig von CDKs und Cyclinen den Zellzyklus zu beeinflussen.

Innerhalb des Meristems besitzen alle Zellen Teilungspotential. Für die Bildung von Organen muss sich jedoch eine Subpopulation von Zellen vermehrt teilen.

Überträgt man die Beobachtungen aus dieser Arbeit auf das Meristem, könnten *DRN* und *DRNL* somit zwei Faktoren innerhalb der Organogenese darstellen, die dafür verantwortlich sind, dass kleine Populationen von Zellen zur Peripherie hin zusätzliche Teilungskompetenz gewinnen, die das lokale Auswachsen von Organen fördert. Für *DRNL* würde dies bedeuten, dass es die Proliferation von Gründerzellen fördert, die sich später zu den Blütenorganen entwickeln.

Eine weitere Beobachtung, die auf eine interessante Funktion von *DRN/DRNL* schließen lässt, war, dass sich in den induzierbaren *ATML1* Linien, der Blattphänotyp bis in die Infloreszenzen fortsetzte, obwohl diese zum Zeitpunkt der Induktion noch nicht gebildet waren (Abb. 3.7. C und D). Dies bedeutet, dass sich die Überexpression von *DRN/DRNL* in meristematischen Zellen auf Zellen auswirkt, die sowohl zeitlich, als auch räumlich von der Aktivität von *DRN* und *DRNL* getrennt sind. Die letzten Blätter, die in diesem Fall phänotypisch verändert waren, lagen zum Zeitpunkt der Induktion, wenn überhaupt als inzipiente Primordien vor. Dies würde den *bcm-1(drn1-2)* Phänotyp erklären, bei dem sich morphologische erkennbare Stamenprimordien entwickeln, die aber nicht mehr in der Lage sind auszuwachsen (Nag et al., 2007). Die Expression von *DRNL* geht wahrscheinlich der Bildung von Primordien voran (Chandler et al., 2011b), weshalb auch hier eine räumliche und zeitliche Trennung zwischen Wachstumsstop und der Expressionsdomäne von *DRNL* besteht. Dass die Auswirkungen von *DRN* und *DRNL* Aktivität weiter als ihre Expressionsdomäne reichen, würde auch erklären, warum beide Gene im Sprossapex redundant agieren, obwohl sich ihre Expressionsdomänen nicht überschneiden. Durch Expressionsanalysen mit Fusionsproteinen wurde gezeigt, dass *DRN* und *DRNL* zell-autonom agieren und nicht in andere Zellen wandern (Cole et al., 2009). Demnach bleibt es offen wie genau *DRN* und *DRNL* Zellen beeinflussen, die räumlich und zeitlich von ihrer Aktivität getrennt sind.

4.6. Ausblick

Die Transkriptomdaten wurden vor dem Hintergrund ausgewertet, dass *DRN* und *DRNL* die gleiche Funktion besitzen und somit in der Analyse als biologische Replikate fungieren. Um mögliche Unterschiede zwischen *DRN* und *DRNL* auf Ebene der differentiell exprimierten Gene herauszuarbeiten, müssten die Transkriptomanalysen reproduziert werden, damit dieser Vergleich zwischen *DRN* und *DRNL* statistische Relevanz bekommt.

Die in dieser Arbeit identifizierten potentielle Zielgene von *DRN/DRNL* müssen im Folgenden durch quantitative Real-Time-PCR validiert werden. Hierzu müssen in Abhängigkeit des Kernimports von *DRN* und *DRNL* verschiedene Experimente durchgeführt werden. Optimal ist es hier zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Entwicklungsstadien RNA zu isolieren um mögliche Änderungen im Transkriptom in einem bestimmten Zeitraum in die Auswertung mit einzubeziehen.

Des Weiteren müssen die Daten aus der CHIP-Seq Analyse von *DRN* (Philipp Salentin 2013, unveröffentlicht), mit den Transkriptomanalysen abgeglichen werden um zu überprüfen, welche Promotoren der differentiell exprimierten Gene durch das *DRN* Protein gebunden werden. Die so identifizierten Gene, bieten die Möglichkeit zu weiteren Experimenten. Um eine direkte Abhängigkeit von *DRN/DRNL* bestätigen, muss die Promotoraktivität dieser potentiellen Zielgene im Wildtyp und im Hintergrund von *DRN/DRNL* Mutanten analysiert werden. Des Weiteren sollten Kreuzungen mit Mutanten dieser Gene und *DRN/DRNL*, aber auch mit anderen Genen, aus dem regulatorischen Netzwerk um *DRN* und *DRNL* durchgeführt werden. Dies würde Aufschluss darüber geben, wo sich Zielgene im Netzwerk um *DRN* und *DRNL* integrieren und ob es möglicherweise Rückkopplungsmechanismen mit *DRN* und *DRNL* gibt.

Ein phänotypischer Aspekt, der in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, war die Blattveränderungen in *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen. Hierzu würden sich Time-lapse Experimente eignen, bei denen die Entwicklung der Epidermis in einem bestimmten Zeitraum verfolgt wird. Dies würde möglicherweise Aufschluss über die Vorgänge geben, welche für die veränderte Blattform verantwortlich sind. Für dieses Experiment stehen transgene Linien zur Verfügung, die ein *YFP* „getagtes“ Zellwandprotein (29-1) exprimieren.

Langfristig gesehen, wäre es interessant herauszufinden, wie *DRN* und *DRNL* in der Lage sind über ihre Expressionsdomäne hinaus, andere Zellen bzw. das Wachstum von Organen zu beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Die zwei AP2 Transkriptionsfaktoren *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE* kontrollieren redundant die Embryonalentwicklung und die Organogenese am Sproßapex. Um weitere Informationen über beide Gene zu sammeln, wurde der experimentelle Ansatz einer epidermisspezifischen Überexpression verfolgt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Gene Zellteilungen und Hyperplasien in epidermalen Zellen des Hypokotyls hervorrufen, wenn sie unter der Kontrolle des *ATML1* Promotors epidermisspezifisch ausgeprägt werden. Dieser Phänotyp beruhte höchstwahrscheinlich auf ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren, was durch verschiedene Kontrollexperimente bestätigt wurde.

Die Embryonalentwicklung transgener Linien verlief normal und die Überproliferation im Hypokotyl setzte erst nach der Keimung in der Stomatazellreihe ein, bis sie sich in der nicht-Stomatazellreihe fortsetzte. Adulte *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen waren zudem stark in ihrem Wachstum eingeschränkt, was sich in Verlust der Apikaldominanz, veränderten Blattformen und teilweise in Sterilität äußerte.

In der Epidermis von Blättern und Kotyledonen bildeten sich Stomatacluster, was zeigte, dass auch hier die zellulären Muster verändert waren.

Die überproliferierenden Zellen im Hypokotyl von *ATML1::DRN/DRNL* exprimierten den Marker der Stomatazelllinie *TMM*, was zusammen mit den Stomatacluster in Kotyledonen und Blättern zu der Vermutung führte, dass *DRN* und *DRNL* in die Stomataentwicklung eingreifen bzw. diese beeinflussen. Kreuzungen mit Mutanten von Schlüsselregulatoren der Stomatazelllinie widerlegten diese Annahme und deuteten darauf hin, dass *DRN* und *DRNL* unabhängig von der Funktion dieser Gene agieren. Weiterhin zeigte sich, dass beide Gene in der Lage waren Zellidentitäten zu konvertieren, was sich darin äußerte, dass die ektopische Expression von *TMM* in der nSZR mit einem Verlust an *GL2* Expression einherging.

Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass *DRN* und *DRNL* an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind.

Da *DRN* und *DRNL* Zellteilungen in Zellen hervorrufen, die sich normalerweise nicht teilen, wurde vermutet, dass *DRN* und *DRNL* Mitosen fördern und Endoreplikation hemmen. Die Messung des DNA-Gehaltes von epidermalen Zellen des Hypokotyls, ergab, dass nach einsetzender Differenzierung die Zellen vermehrt Endozyklen

durchliefen. Sobald ein Differenzierungsprozess einsetzte, teilten sich die Zellen nicht mehr und das Fördern des G1/S-Übergangs blieb als Restfunktion erhalten, was sich in den erhöhten Endoreplikationsraten widerspiegelte.

Dunkelkeimungsexperimente bestätigten, dass das durch *DRN* und *DRNL* hervorgerufene Zellteilungspotential durch Differenzierung in Form von Zellstreckung unterdrückt werden konnte. Im Dunkeln gekeimte *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen besaßen weniger Zellen pro Zellreihe als im Licht gekeimte, besaßen aber immer noch mehr Zellen im Hypokotyl als Wildtyp Keimlinge. Demnach förderten *DRN* und *DRNL* abhängig vom Entwicklungsstadium Zellteilungen oder Endoreplikation.

Der G1/S-Übergang ist in beiden Zellzyklusprogrammen auf gleiche Weise reguliert. Aus diesem Grunde wurde vermutet, dass *DRN* und *DRNL* gezielt den G1-S-Übergang fördern

Der Transkriptionsfaktor *E2Fa* aktiviert zusammen mit seinem Dimerisierungspartner *DPa* S-Phase spezifische Gene. Co-Überexpression von *E2Fa* und *DPa* führt ähnlich wie in *ATML1::DRN/DRNL* Pflanzen zu Überproliferation im Hypokotyl und erhöhten Endoreplikationsraten.

Differentiell exprimierte Gene in *ATML1::DRN/DRNL* Transkriptomanalysen bildeten eine Schnittmenge mit differentiell exprimierten Genen aus Transkriptomanalysen, die zur Identifizierung von Zielgenen von *E2Fa-DPa* durchgeführt wurden, sowie mit differentiell exprimierten Genen in S-Phase Zellkulturen. Innerhalb dieser Population von gemeinsam differentiell exprimierten Genen fanden sich einige, die eine Schlüsselfunktion während der S-Phase besitzen.

Hierdurch wurde gezeigt, dass der zuvor beobachtete Phänotyp, die Förderung des G1/S-Übergangs, auf Transkriptomebene bestätigt werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen auf die mögliche Funktion von *DRN* und *DRNL* in Meristem schließen, bei der sie in einer kleinen Population von Zellen zusätzliches Teilungspotential erzeugen, welches für das Auswachsen von Organen notwendig sein könnte.

Literatur

Andersen, S.U., Algreen-Petersen, R.G., Hoedl, M., Jurkiewicz, A., Cvitanich, C., Braunschweig, U., Schauser, L., Oh, S.A., Twell, D., Jensen, E.O., 2007. The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc in vitro and TSO1 is required for both male and female fertility in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 58, 3657-3670.

Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., Helin, K., 2004. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *The EMBO journal* 23, 4709-4716.

Banno, H., Ikeda, Y., Niu, Q.W., Chua, N.H., 2001. Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *The Plant cell* 13, 2609-2618.

Barroco, R.M., Van Poucke, K., Bergervoet, J.H., De Veylder, L., Groot, S.P., Inze, D., Engler, G., 2005. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant physiology* 137, 127-140.

Beemster, G.T., Vercruyse, S., De Veylder, L., Kuiper, M., Inze, D., 2006. The *Arabidopsis* leaf as a model system for investigating the role of cell cycle regulation in organ growth. *Journal of plant research* 119, 43-50.

Benkova, E., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Dubrovsky, J.G., 2009. A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends in plant science* 14, 189-193.

Berger, F., Linstead, P., Dolan, L., Haseloff, J., 1998. Stomata patterning on the hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* is controlled by genes involved in the control of root epidermis patterning. *Developmental biology* 194, 226-234.

Berger, S.L., Cress, W.D., Cress, A., Triezenberg, S.J., Guarente, L., 1990. Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61, 1199-1208.

Berleth, T., Jurgens, G., 1993. The Role of the *Monopteros* Gene in Organizing the Basal Body Region of the *Arabidopsis* Embryo. *Development* 118, 575-587.

Bertani, G., 1951. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 62, 293-300.

Besnard, F., Vernoux, T., Hamant, O., 2011. Organogenesis from stem cells in planta: multiple feedback loops integrating molecular and mechanical signals. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 2885-2906.

Blais, A., Dynlacht, B.D., 2004. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Current opinion in genetics & development* 14, 527-532.

Borghi, L., Gutzat, R., Futterer, J., Laizet, Y., Hennig, L., Grisse, W., 2010. *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *The Plant cell* 22, 1792-1811.

- Boudolf, V., Barroco, R., Engler Jde, A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D., De Veylder, L., 2004a. B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 16, 945-955.
- Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Van Leene, J., Van Den Daele, H., Maes, S., Van Isterdael, G., Russinova, E., Kondorosi, E., Witters, E., De Jaeger, G., Inze, D., De Veylder, L., 2009. CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant physiology* 150, 1482-1493.
- Boudolf, V., Rombauts, S., Naudts, M., Inze, D., De Veylder, L., 2001. Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 52, 1381-1382.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inze, D., De Veylder, L., 2004b. The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 16, 2683-2692.
- Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M., 1991. Genetic control of pattern formation during flower development in *Arabidopsis*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 45, 89-115.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Gorlach, J., 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant cell* 13, 1499-1510.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., Simon, R., 2000. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289, 617-619.
- Brent, R., Ptashne, M., 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43, 729-736.
- Breyne, P., Dreesen, R., Vandepoele, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., Rombauts, S., Raes, J., Cannoot, B., Engler, G., Inze, D., Zabeau, M., 2002. Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14825-14830.
- Breyne, P., Zabeau, M., 2001. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current opinion in plant biology* 4, 136-142.
- Castellano Mdel, M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A., Gutierrez, C., 2004. DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *The Plant cell* 16, 2380-2393.
- Chabouté, M.E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G., Chaubet-Gigot, N., 2000. Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *The Plant cell* 12, 1987-1999.
- Chandler, J.W., 2011. Founder cell specification. *Trends in plant science* 16, 607-613.

- Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., Grewe, B., Werr, W., 2007. The AP2 transcription factors DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* 134, 1653-1662.
- Chandler, J.W., Cole, M., Jacobs, B., Comelli, P., Werr, W., 2011a. Genetic integration of DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE reveals hierarchical interactions in auxin signalling and patterning of the Arabidopsis apical embryo. *Plant molecular biology* 75, 223-236.
- Chandler, J.W., Jacobs, B., Cole, M., Comelli, P., Werr, W., 2011b. DORNROSCHEN-LIKE expression marks Arabidopsis floral organ founder cells and precedes auxin response maxima. *Plant molecular biology* 76, 171-185.
- Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16, 735-743.
- Cole, M., Chandler, J., Weijers, D., Jacobs, B., Comelli, P., Werr, W., 2009. DORNROSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the Arabidopsis embryo. *Development* 136, 1643-1651.
- de Jager, S.M., Menges, M., Bauer, U.M., Murra, J.A., 2001. Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant molecular biology* 47, 555-568.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacquard, A., Engler, G., Inze, D., 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *The EMBO journal* 21, 1360-1368.
- De Veylder, L., Larkin, J.C., Schnittger, A., 2011. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in plant science* 16, 624-634.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., Gutierrez, C., 2002. Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *The Plant cell* 14, 3057-3071.
- Di Cristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I., Morelli, G., 1996. The Arabidopsis Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 10, 393-402.
- Dohmann, E.M., Levesque, M.P., De Veylder, L., Reichardt, I., Jurgens, G., Schmid, M., Schwechheimer, C., 2008. The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development* 135, 2013-2022.
- Egelkrout, E.M., Mariconti, L., Settlege, S.B., Cella, R., Robertson, D., Hanley-Bowdoin, L., 2002. Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *The Plant cell* 14, 3225-3236.

- Egelkrou, E.M., Robertson, D., Hanley-Bowdoin, L., 2001. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *The Plant cell* 13, 1437-1452.
- Ferreira, P.C., Hemerly, A.S., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inze, D., 1991. The Arabidopsis functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *The Plant cell* 3, 531-540.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., Meyerowitz, E.M., 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jurgens, G., 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426, 147-153.
- Fuerst, R.A., Soni, R., Murray, J.A., Lindsey, K., 1996. Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of Arabidopsis thaliana. *Plant physiology* 112, 1023-1033.
- Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K., 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282, 2226-2230.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* 50, 151-158.
- Geisler, M., Yang, M., Sack, F.D., 1998. Divergent regulation of stomatal initiation and patterning in organ and suborgan regions of the Arabidopsis mutants too many mouths and four lips. *Planta* 205, 522-530.
- Gendreau, E., Höfte, H., Grandjean, O., Brown, S., Traas, J., 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the Arabidopsis thaliana hypocotyl. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 13, 221-230.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., Hofte, H., 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology* 114, 295-305.
- Gomez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M.M., Angenent, G.C., Sablowski, R., 2005. Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* 132, 429-438.
- Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y., Traas, J., 2004. In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. *The Plant cell* 16, 74-87.
- Hauser, B.A., He, J.Q., Park, S.O., Gasser, C.S., 2000. TSO1 is a novel protein that modulates cytokinesis and cell expansion in Arabidopsis. *Development* 127, 2219-2226.
- Hemerly, A., Engler Jde, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inze, D., Ferreira, P., 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *The EMBO journal* 14, 3925-3936.

- Hirayama, T., Imajuku, Y., Anai, T., Matsui, M., Oka, A., 1991. Identification of two cell-cycle-controlling cdc2 gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 105, 159-165.
- Hu, Y., Bao, F., Li, J., 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24, 693-701.
- Huang, X., Liu, X., Chen, X., Snyder, A., Song, W.Y., 2013. Members of the XB3 family from diverse plant species induce programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS one* 8, e63868.
- Hung, C.Y., Lin, Y., Zhang, M., Pollock, S., Marks, M.D., Schiefelbein, J., 1998. A common position-dependent mechanism controls cell-type patterning and GLABRA2 regulation in the root and hypocotyl epidermis of *Arabidopsis*. *Plant physiology* 117, 73-84.
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q.W., Howell, S.H., Chua, N.H., 2006. The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant & cell physiology* 47, 1443-1456.
- Imai, K.K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A., Aoyama, T., 2006. The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in *Arabidopsis* endoreduplication. *The Plant cell* 18, 382-396.
- Inze, D., De Veylder, L., 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual review of genetics* 40, 77-105.
- Jakoby, M., Schnittger, A., 2004. Cell cycle and differentiation. *Current opinion in plant biology* 7, 661-669.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M., Renaudin, J.P., 2000. CDK-related protein kinases in plants. *Plant molecular biology* 43, 607-620.
- Joubes, J., De Schutter, K., Verkest, A., Inze, D., De Veylder, L., 2004. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37, 889-896.
- Kagan, M.L., Sachs, T., 1991. Development of immature stomata: evidence for epigenetic selection of a spacing pattern. *Developmental biology* 146, 100-105.
- Kirch, T., Simon, R., Grunewald, M., Werr, W., 2003. The DORNROSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 gene of *Arabidopsis* acts in the control of meristem cell fate and lateral organ development. *The Plant cell* 15, 694-705.
- Koncz, C., Schell, J., 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molec Gen Genet* 204, 383-396.

- Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H., Sakagami, Y., 2006. A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* 313, 845-848.
- Kono, A., Umeda-Hara, C., Adachi, S., Nagata, N., Konomi, M., Nakagawa, T., Uchimiya, H., Umeda, M., 2007. The Arabidopsis D-type cyclin CYCD4 controls cell division in the stomatal lineage of the hypocotyl epidermis. *The Plant cell* 19, 1265-1277.
- Kosugi, S., Ohashi, Y., 2002a. E2Ls, E2F-like repressors of Arabidopsis that bind to E2F sites in a monomeric form. *The Journal of biological chemistry* 277, 16553-16558.
- Kosugi, S., Ohashi, Y., 2002b. Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant physiology* 128, 833-843.
- Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L.P., Gaamouche, T., Maes, S., Vanstraelen, M., Kondorosi, E., La Thangue, N.B., Govaerts, W., Inze, D., De Veylder, L., 2008. Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14721-14726.
- Lampard, G.R., Macalister, C.A., Bergmann, D.C., 2008. Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322, 1113-1116.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K., Traas, J., 1998. Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *The Plant cell* 10, 1375-1390.
- Lee, H.O., Davidson, J.M., Duronio, R.J., 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & development* 23, 2461-2477.
- Liu, C.M., Xu, Z.H., Chua, N.H., 1993. Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. *The Plant cell* 5, 621-630.
- Liu, Y., Zhao, T.J., Liu, J.M., Liu, W.Q., Liu, Q., Yan, Y.B., Zhou, H.M., 2006. The conserved Ala37 in the ERF/AP2 domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box. *FEBS letters* 580, 1303-1308.
- Liu, Z., Running, M.P., Meyerowitz, E.M., 1997. TSO1 functions in cell division during Arabidopsis flower development. *Development* 124, 665-672.
- MacAlister, C.A., Ohashi-Ito, K., Bergmann, D.C., 2007. Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445, 537-540.
- Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., Inze, D., 2000. Characterization of two distinct DP-related genes from Arabidopsis thaliana. *FEBS letters* 486, 79-87.

- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bako, L., Inze, D., Bogre, L., 2005. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *The Plant cell* 17, 2527-2541.
- Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C., Dudits, D., 1997. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *The Plant cell* 9, 223-235.
- Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., Albani, D., 2002. The E2F family of transcription factors from Arabidopsis thaliana. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *The Journal of biological chemistry* 277, 9911-9919.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Becker, J.D., Dixit, S., Bergervoet, J.H., Karaba, A., de Folter, S., Pereira, A., 2006. BOLITA, an Arabidopsis AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant molecular biology* 62, 825-843.
- Matsuo, N., Banno, H., 2008. The Arabidopsis transcription factor ESR1 induces in vitro shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 46, 1045-1050.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., Laux, T., 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95, 805-815.
- Meijer, M., Murray, J.A.H., 2000. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant molecular biology* 43, 621-633.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., Murray, J.A., 2002. Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* 277, 41987-42002.
- Menges, M., Murray, J.A., 2002. Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 30, 203-212.
- Meszaros, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Pettko-Szandtner, A., Peres, A., Magyar, Z., Horvath, G.V., Bako, L., Feher, A., Dudits, D., 2000. Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant molecular biology* 43, 595-605.
- Mironov, V.V., De Veylder, L., Van Montagu, M., Inze, D., 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *The Plant cell* 11, 509-522.
- Mizukami, Y., Ma, H., 1997. Determination of Arabidopsis floral meristem identity by AGAMOUS. *The Plant cell* 9, 393-408.
- Mundt, K.E., Porte, J., Murray, J.M., Brikos, C., Christensen, P.U., Caspari, T., Hagan, I.M., Millar, J.B., Simanis, V., Hofmann, K., Carr, A.M., 1999. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Current biology : CB* 9, 1427-1430.

- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nadeau, J.A., Sack, F.D., 2002. Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science* 296, 1697-1700.
- Nag, A., Yang, Y., Jack, T., 2007. DORNROSCHEN-LIKE, an AP2 gene, is necessary for stamen emergence in Arabidopsis. *Plant molecular biology* 65, 219-232.
- Nomura, Y., Matsuo, N., Banno, H., 2009. A domain containing the ESR motif in ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 functions as a transactivation domain. *Plant Biotechnology* 26, 395–401.
- Nordman, J., Orr-Weaver, T.L., 2012. Regulation of DNA replication during development. *Development* 139, 455-464.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A., 2002. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357, 749-760.
- Ohashi-Ito, K., Bergmann, D.C., 2006. Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant cell* 18, 2493-2505.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., Jofuku, K.D., 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7076-7081.
- Peterson, K.M., Rychel, A.L., Torii, K.U., 2010. Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *The Plant cell* 22, 296-306.
- Pillitteri, L.J., Sloan, D.B., Bogenschutz, N.L., Torii, K.U., 2007. Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* 445, 501-505.
- Pillitteri, L.J., Torii, K.U., 2012. Mechanisms of stomatal development. *Annual review of plant biology* 63, 591-614.
- Porceddu, A., De Veylder, L., Hayles, J., Van Montagu, M., Inze, D., Mironov, V., 1999. Mutational analysis of two Arabidopsis thaliana cyclin-dependent kinases in fission yeast. *FEBS letters* 446, 182-188.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, D., Mironov, V., 2001. A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *The Journal of biological chemistry* 276, 36354-36360.
- Potuschak, T., Doerner, P., 2001. Cell cycle controls: genome-wide analysis in Arabidopsis. *Current opinion in plant biology* 4, 501-506.

- Ramirez-Parra, E., Frundt, C., Gutierrez, C., 2003. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 33, 801-811.
- Ramirez-Parra, E., Lopez-Matas, M.A., Frundt, C., Gutierrez, C., 2004. Role of an atypical E2F transcription factor in the control of Arabidopsis cell growth and differentiation. *The Plant cell* 16, 2350-2363.
- Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., Kuhlemeier, C., 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426, 255-260.
- Rerie, W.G., Feldmann, K.A., Marks, M.D., 1994. The GLABRA2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in Arabidopsis. *Genes & development* 8, 1388-1399.
- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M., 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological chemistry* 379, 633-646.
- Rieu, I., Laux, T., 2009. Signaling pathways maintaining stem cells at the plant shoot apex. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 1083-1088.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A., Murray, J.A., 1999. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* 283, 1541-1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M., Murray, J.A., 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Molecular and cellular biology* 20, 4513-4521.
- Rosignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D., Bergounioux, C., 2002. AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics* 266, 995-1003.
- Roudier, F., Fedorova, E., Gyorgyey, J., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, A., Kondorosi, E., 2000. Cell cycle function of a Medicago sativa A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 23, 73-83.
- Sabelli, P.A., Dante, R.A., Leiva-Neto, J.T., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., Larkins, B.A., 2005. RBR3, a member of the retinoblastoma-related family from maize, is regulated by the RBR1/E2F pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13005-13012.
- Sala, F., Parisi, B., Burrioni, D., Amileni, A.R., Pedrali-Noy, G., Spadari, S., 1980. Specific and reversible inhibition by aphidicolin in the alpha-like DNA polymerase of plant cells. *FEBS letters* 117, 93-98.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory, NY. .

- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., Laux, T., 2000. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100, 635-644.
- Schrader, A., Welter, B., Hulskamp, M., Hoecker, U., Uhrig, J.F., 2013. MIDGET connects COP1-dependent development with endoreduplication in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75, 67-79.
- Schwechheimer, C., 2004. The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochimica et biophysica acta* 1695, 45-54.
- Sessions, A., Weigel, D., Yanofsky, M.F., 1999. The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 20, 259-263.
- Shpak, E.D., McAbee, J.M., Pillitteri, L.J., Torii, K.U., 2005. Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science* 309, 290-293.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W., Bewley, J.D., 2009. Germination of Arabidopsis thaliana seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of experimental botany* 60, 3587-3594.
- Sorrell, D.A., Menges, M., Healy, J.M., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A., Doonan, J.H., Sekine, M., Murray, J.A., 2001. Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant physiology* 126, 1214-1223.
- Sozzani, R., Maggio, C., Giordo, R., Umana, E., Ascencio-Ibanez, J.T., Hanley-Bowdoin, L., Bergounioux, C., Cella, R., Albani, D., 2010. The E2FD/DEL2 factor is a component of a regulatory network controlling cell proliferation and development in Arabidopsis. *Plant molecular biology* 72, 381-395.
- Stevens, C., La Thangue, N.B., 2004. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA repair* 3, 1071-1079.
- Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R., Bergounioux, C., 2002a. Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 32978-32984.
- Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R., Bergounioux, C., 2002b. Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32978-32984.
- Takada, S., Jurgens, G., 2007. Transcriptional regulation of epidermal cell fate in the Arabidopsis embryo. *Development* 134, 1141-1150.
- Thompson, C.J., Mowva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J., 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO journal* 6, 2519-2523.

- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G., Jones, J.D., 1999. Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *The Plant cell* 11, 1841-1852.
- Überlacker, B., Werr, W., 1996. Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Mol Breeding* 2, 293-295.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., Inze, D., 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant cell* 14, 903-916.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inze, D., De Veylder, L., 2005. Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant physiology* 139, 316-328.
- Vanneste, S., Coppens, F., Lee, E., Donner, T.J., Xie, Z., Van Isterdael, G., Dhondt, S., De Winter, F., De Rybel, B., Vuylsteke, M., De Veylder, L., Friml, J., Inze, D., Grotewold, E., Scarpella, E., Sack, F., Beemster, G.T., Beeckman, T., 2011. Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in Arabidopsis. *The EMBO journal* 30, 3430-3441.
- Wei, N., Serino, G., Deng, X.W., 2008. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends in biochemical sciences* 33, 592-600.
- Yoshizumi, T., Tsumoto, Y., Takiguchi, T., Nagata, N., Yamamoto, Y.Y., Kawashima, M., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Yamamoto, N., Matsui, M., 2006. Increased level of polyplody1, a conserved repressor of CYCLINA2 transcription, controls endoreduplication in Arabidopsis. *The Plant cell* 18, 2452-2468.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Werr dafür bedanken, dass er mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit anzufertigen, sondern auch für angeregte Diskussionen jederzeit zur Verfügung stand und Offenheit meinen Ideen gegenüber gezeigt hat.

Dr. Judith Nardmann und Dr. John Chandler danke ich für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen und die stetige Diskussionsbereitschaft in Hinblick auf fachliche Dinge.

Dorothea Glowa und insbesondere Dr. Judith Nardmann danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktive Kritik.

Heike Shahbodaghi-Rückert, Petra Comelli und Melanie Cole danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Beantwortung technischer Fragen.

Der ganzen AG Werr danke ich dafür, dass ich mich seit Beginn meiner Arbeitszeit in diesem Arbeitsumfeld sehr wohl fühlen konnte. Die vielen Gespräche über lustige und private Dinge gestalteten die Zeit im Institut sehr angenehm.

Meiner Familie, vielen Freunden sowie dem Monkeybizness Soundsystem danke ich für die moralische Unterstützung und das Aufrechterhalten meiner Motivation, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Anhang

A.1. Sequenzen

A.1.1. Das offene Leseraster von *DRN*

Hier ist das offene Leseraster und die Aminosäuresequenz von *DRN* mit der AP2-Domäne (grün) und dem ESR-Motiv (pink) dargestellt.

```

ATGGAAAAAGCCTTGAGAACTTCACCGAATCTACCCACTCACCAGACCCTAATCCTCTC
M E K A L R N F T E S T H S P D P N P L
ACAAAATTCTTCACTGAACCTACAGCCTCACCTGTTAGCCGCAACCGCAAACGTCTTCA
T K F F T E P T A S P V S R N R K L S S
AAAGATACTACTGTAACCATCGCCGGAGCTGGCAGCAGCACGACGAGGTACCGCGGCGTA
K D T T V T I A G A G S S T T R Y R G V
CGCCGGAGGCCGTGGGGACGATACGCGCGGAGATACGTGACCCAATGTCGAAGGAGAGA
R R R P W G R Y A A E I R D P M S K E R
CGTTGGCTCGGAACATTTGACACGGCGGAACAAGCCGCTTGTGCTTACGACTCTGCGGCT
R W L G T F D T A E Q A A C A Y D S A A
CGTGCCTTTCGTGGAGCAAAGGCTCGTACTAATTTTACTTATCCGACAGCTGTCATTATG
R A F R G A K A R T N F T Y P T A V I M
CCTGAACCAAGGTTTTCTTTTTCCAACAAGAAATCTTCGCCGTCTGCTCGTTGTCCTCTT
P E P R F S F S N K K S S P S A R C P L
CCTTCTCTACCGTTAGATTCTCTACCCAAAACCTTTTACGGTGCACCGGCAGCGCAGAGG
P S L P L D S S T Q N F Y G A P A A Q R
ATCTATAATACACAGTCTATCTTCTTACGCGACGCCTCGTGTTCCTCTCGTAAAACGACT
I Y N T Q S I F L R D A S C S S R K T T
CCGTATAATAACTCTTTCAACGGCTCATCATCTTCTTACTCAGCATCGAAAACGGCATGC
P Y N N S F N G S S S S Y S A S K T A C
GTTTCTTATTCCGAAAACGAAAACAACGAGTCGTTTTTCCCGGAAGAATCTTCTGATACT
V S Y S E N E N N E S F F P E E S S D T
GGTCTATTACAAGAGGTCGTTCAAGAGTTCTTGAAGAAAAATCGCGGCGTTCCTCCTTCT
G L L Q E V V Q E F L K K N R G V P P S
CCACCAACACCACCGCCGGTACTAGCCATCATGACAACTCTGGTTATTTCTCTAATCTC
P P T P P P V T S H H D N S G Y F S N L
ACTATATACTCTGAAAATATGGTTCAAGAGACTAAGGAGACTTTGTCGTCGAAACTAGAT
T I Y S E N M V Q E T K E T L S S K L D
CGCTACGGGAATTTTCAAGCTAATGACGACGGCGTAAGAGCCGTCGCAGACGGTGGTTTA
R Y G N F Q A N D D G V R A V A D G G L
TCGTTGGGATCAAACGAGTGGGGGTATCAAGAAATGTTGATGTACGGAACCTCAGTTAGGC
S L G S N E W G Y Q E M L M Y G T Q L G
TGTACTTGCCGAAGATCGTGGGGATAG
C T C R R S W G

```

A.1.2. Das offene Leseraster von *DRNL*

Hier ist das offene Leseraster und die Aminosäuresequenz von *DRNL* mit der AP2-Domäne (grün) und dem ESR-Motiv (pink) dargestellt.

```

ATGGAAGAAGCAATCATGAGACTCGAAGGTGCCGAGCACAGAGAAACCAACATCCATTCT
M E E A I M R L E G A E H R E T N I H S
TTGAAAAGAAAGCCATCAAGAACTTCCTCGACAGCTCCTGGCTCTCCCGGAGGAGTAACT
L K R K P S R T S S T A P G S P G G V T
ACCGCAAAGCTGCCTCCGGCGCCGGCGCTTCCGGTGTCTCTACGATAAGGTACCGAGGC
T A K A A S G A G A S G V S T I R Y R G
GTGAGGCGTAGGCCATGGGGTCGTTACGCAGCTGAAATACGGGACCCATTGTCCAAGGAG
V R R R P W G R Y A A E I R D P L S K E
AGACGATGGCTCGGAACATTTGACACGGCCGAGGAAGCAGCTTGCGCATATGACTGCGCC
R R W L G T F D T A E E A A C A Y D C A
GCTCGAGCCATGCGTGGTCTTAAAGCTCGAACCAACTTCGTCTACCCAATGCCTTCTCTC
A R A M R G L K A R T N F V Y P M P S L
GACTCTTATCACCACCGTATTTTCTCGTCTCCTCCAATGAATATGTTCTTCTACGAGAC
D S Y H H R I F S S P P M N M F L L R D
GTGTTAAACTCTCAGTCTCTTTCTCCGTTAACCACTTTCGCTTACCCGCCTTGTAATCTT
V L N S Q S L S P L T T F A Y P P C N L
TCTAACGTAAACGACGTTGTTACGAGTCCTTCACTAACGTCAACGATGTCTGTGAAGAT
S N V N D V V H E S F T N V N D V C E D
CTCTCGCCTAAAGCTAAGAGGTCAAGTACCATTGAGAACGAGAGCCTGATATCAAATATC
L S P K A K R S S T I E N E S L I S N I
TTTGAACCAGAACCAGCTAGTTCTGGTCTTCTTCAAGAAATTGTTCAAGGCTTCTTACCA
F E P E P A S S G L L Q E I V Q G F L P
AAACCTATCTCTCAACATGCTTCTATACTCCAAGAGCAACCAACAGTCGGTTGGTGTGTT
K P I S Q H A S I P P K S N Q Q S V G V
TTCCCGACGATGCCAGAGAGCGGTTTTTCAGACAGATGTTTCGTTTAGCTGACTTCCATGTC
F P T M P E S G F Q T D V R L A D F H V
GAAGGAAACGGATTCCGGTCAGGTTAAATATCATGGAGAGTTAGGTTGGGCTGATCATGAG
E G N G F G Q V K Y H G E L G W A D H E
AATGGGTTTTGATTCAGCTAAGATGCAGCAGAACGGAAATGGTGGAATGTTTTATCAGTAT
N G F D S A K M Q Q N G N G G M F Y Q Y
TGCTTTCATGATGATTATTAG
C F H D D Y

```


A.1.3. 5KB „upstream“ Bereich von *ATML1*

GGCGCGCCTTCGAAAATAAAGCTTAGTTCCTATTTGACATATTAACCTTTTTAGTTTTACA
TTGATTCTGAACTGTACCCAATTTTTTTAAAGCTTATCAAAGAAAAACAAGAACAAAACGA
TGCATAGTTTCTAAAATGTGCTAAAATTCAGAACTGAAACATGATTCATTGTCTGAACTT
TGTTTCAAATTAAGTAAAATAATCATTCACTGGACCAAAACAATAAATAAATAAATAAATCGA
ATTTCTGAATTTGGAAATGGTTTTTGGTTTTTAATTTTAAACAAAACAAAACGAAATTTG
AAGGCAATAAATGAGTTAGTTGGTAGGCAGAAGTCACTCGTCCCACTAGCTATTATTATTA
GAAGAAACGTCCCCACAACCTCCAAGGCGTTTCAGTTCCTTTAATTTACTGAATTACCCTCCT
CATATCTATAAAAAATCACCTCTTGTACCAATGCCCATTTACACATCCTGTCGTTTATTTT
TAGACTAAGTGGACTACATGTCGGTTATTTGATTTCGCACCATGCGTATTTGGATTATCGCTA
ACACACCCCTTCAAACAATACGCTTAACTCGTATTACAAAATTTCAAGTGATGAATTATCTA
TGTATAAGATATAGATAGGAACAACCTAAGCATCGAGAAATTTGTATATAAATCAACTAGACT
TATATATATTTTCGATACAGAATTTATACGTATTATATCAAATTAATTAGTAATTGTTTCCTC
TACGTGAGTTTAATTAACAATGATAAGCTACATTGAGTGTATCAGTTCTAAAACCTTTATAGT
ATGCTACAATCAATTTTTCTAAGTAACAACCTTCAAGCAAGGAATCACACACACACAGTGGTA
CATAATAAAGTGTATTTAATATCATATGATCAGCATCATTAACGGAATAAGTTAAGTAATT
CGTCATCCATACTACTAAGTCATATTTAAATCATAATCAAACCTTAAAAGCCGATTAGAAAGA
GAGCAAATATATCTAAAAATTCACGAGGAAGACGACAAATGCAAGGAAACACAGCTAGTATT
ATTAAGTAAATAGATATTGGATGAATGACTGCATAATATATATCACATTAAGTGGACAT
AAATTTGCATATGTGTAATGTACCTCTCCACAATTAATCGCGGACCATTTATTTTACTATTA
CAAGTCAAGTAACTTTATATTGTTGATCCATAATTCTTTTTCGAACATAAAATCATATACTTA
GGCCATTTTCAACTGTCAAACCTCGAATCCGAGAACCATAATTTACCATTTTCCAAAAATGA
TGAGTGTGACCAAAATGGGGTACTACTGTCTAATCAGGAACTTGTGAACAAAATTTTCAACCT
TTTCCAAATAAGACGAGTGTCAACCAACTTTTTTCCAAACCAAGAGATATTGGGTTGCTACACA
AATACTTAATAGCCATTGCATATTTATGCATATGCAAATGCAGGGTCGTGGCGTCAGAAAGA
AACATAGGACCCTCAACATATTTAATATTTTGGGAGCTATATTTGACTATTTTATATTAGAA
AATAATAATAAAAAAGTGTGGTTTTATATCAAATTTGTAATTTACGAAAACTTATGCTTTT
GCGCAATGATTTTTGTAAAGTATCTACTATGTTTAGTGTTTACATTGATTAGTAGGCTGCCG
TTTTTTTTCTTGTGTATTATGTACTATATATGAATATGAACATTTGTAAAAGTGAATCTTGT
CATTTTCTTGTGAAAACATATATAGTATGTGCAAACAAAGCATAGGTTAATCCAATACCAC
ACAAATAACACGTCAGGTAAATCCAATAATAAATCGTATGTGCATGTATGTGTATTCATGTA
TGTTACATGAATGTCTGAATCAGTCAGTGTACGTATATGATGTAGGTGATGTAAATCTTAAT
GTATGAGCTGTTTCTTGGACCATGGTCCACAATGGATATTGCTCCCCAACTACATTAGTCAA
TCGACTGGCCAAATTTTAAATTAAGATAATTAATCCAACTACCATTAAATATACTTTGACC
TTTTTTCTATTCATTTTTAGATATTATTGGAACCTTACGTAGTTTACATGCATCTCATCCCTT
TCTTTTGTCTCCTTGAAGTGGGTCCAATCACAAAAATGATCTTATATTTTGTATTTTGTAT
TTTAAAACTCATAATTATATAGGTTCAAAAATTTAATTAACATCAGTGTATACTATAATTA
CTACTCTAGCCAACAAGATAAATTCATTTTGCATCAGCCAAAAGATAAAAAATTTGGTTAA
AACTATTGGATTAGCTTTTTAGTATTTAATATTTTATGTACTGATTAAATACGAATTTAGAAA
TCTAGGATATAAGTGAAGGTGTATAATAAGGGAGGGGTGGACCATTAATAGCGATGTGCAAT
TAAAAATTATGATTAAGAATCTAGGAAATTTGTAGATTGCTTAGTTATTTTTATGGCGATCG
TCGTGTCAATGTCATGGATTTTGAACCTTAAATTAATCTCTTAAATTAGCACCTACCTTTG
AATTTTATAGAATCTTTTTATTTTATATGTTTAAATTTTATAGAATCTAACTAGCTTATTTT
AGATTAAATTGTTTAGTTACTTTTTATAACAGTATAAATGTATAATGAGGACCTAAGAATGTA
GTCCTGTAATGTTCTTGGTATTCTACTTAATCTCATCACCATCAACCATCAAAGAAGCTA
GTACTAATAAAACCTGCAGGTATTTCGAATAATAATTAAGCTCAAACACTATACTAATTTATG
GAGGATTATATATTCAATGAATTAGGAACCTCATGATGGACATTATTGACTGATATAATGTG
TATACTAATTGTGAGTATTTAAAAACCATACAAAGCATTATATGTCCACATATATTGGACA
CACATGCAATCAATGTTCAATATGCTCCACACACAGAAATAAAAAACTCTTTCTGATCATA
TGATACATCATACATATACTAAAAAATCTAAATGAACTATAACCACAAGCATATATAATA

ACAATGAAATGGTAATGTTTCTTCATTTTTATTTGTTCAAATTCCTTATTTCGGTTGTTTTTTC
TTACCCTACGAGAATCCGTGAGGTCAAAGGGAAACAGTGATTTTTTTTTTTGTATTTTGTTTT
TTAAATTGATGAACTGTAAAACCTCTCTCTCTAGAAAAATATATAAGTAGTAGTATGAATTTT
CTCTCACTAAAAGCATTAAATGGACCTTTCGATAATCATAAATGCAATGCACCCTCTCTATGC
ATTTTCGCAATAACTCCTTTTTCTTCTGCCACATCCTCTTCCTCACCTCTTCTCTTCTTCCC
TTTCTCCTAAGTTCCTCCTCCACCAAATTCCTCATTATTTTCGTAACTATCCTCCATTTGT
TTTCTTCTGAAGAGTGATATATTCTACCTTCTCTGGTTAAAGAAAACCTCCCTGAATCCACCG
GTTATGTCTTGACCGGTATAAGCCTATAAACTGATGCCCTAAGACACCTTTTTTAGGTTTCT
CAATAATTCTCCGCATCTATCTTTTTCTTCTCCACAAGTAAGAGAACCAGAAAACCAGAGAAG
AAGCCGAGCTAGCTAGGGTTTCATTGTGTGCACAAAAGTAAGATCTCTCTCTCTAACCAATA
CTTGTGTAATTTGTCTTTGTTTTCTTTGAGCAAATATTGCATGTTTGTTCATATTAGCCGGAT
CCGTTTTATATTTTTTTCATGATCTACATTTTATCTTTATTTTGTGTTGTAATTAATGAGTTT
TTTTTTTTTTTTTCTGTTTTTGTACGATCTAAAAACAAGCGTTACAAAGAAGAAGAAAA
CCTTTTTGGAGTTAGAAGTGTAAGGGGTTTTAGTTGACGAATTTTCTTAGTAGTTGTG
TAAAAAAGGCCATTGACTTAATGTCAACTCTATATATCTACACATTTTTTTTATTAATTAGT
TTTTGTTTTTTTTCCCACTTCATTTACCTTTAGTCAATGAATTTTTTACTGAAAACGTTTTTTC
AAGGTCAATTTCACTGAGTTAAAAAAAAGTTTTATTTTTTAACCAAAAATTACGTTTTTTC
CTAGGCTTCGGTAACCTGTGAATTCCTCTATCTCACTAGCTTTTATGTAGAAGAGAGAGAAG
GCAACATTAATTCGATCTAAAACCTCAAGAAACCAAACAACACTTCAAAAAAAGAG
ATCTGTTCTATAGAGTTTTAATCTTTTTCTTTCGACTCGAGTTTGGCTCAACAAAGTTTATAT
CGATTTGGCACTCTAAAATGTAAGTAGAACCAATGAATCTTGATTTTTATGTACGTTAATA
AAAAATTAGGGTTTCCTAGACGACAATCTCGTCATCCGTTTCTTCTTTGTCTACCTCTGCGT
TTTCTTGTAGATCCGATGATGTGCTCAGTCTTGTGACTTTCAAGATTGATTTTATCGTTATT
GTTTGAAGATATGTGGTTTGATTATTTTCTCAACACATTGTGTCCTTTTAGCGCTTACTTC
AGTTTCTCTCTAATTTTTCATAATATTATTATTGAACATTATGCTTAATTATTCATCCGAATA
TTCGTGTCCATTTTTTTAAATTGAATTTTCAGGATAACTTGTATTTTATATGCAACGAGGTTA
TGTCACGTAGTGGGTGCATTTATATTCATAACCCTTTTTGATAAGATGAATGCATATGCTTAT
ATAAGCGTATAGGTATAAATAACCATCAAAAATAGAGAAAAAGACCAATATTTTGCTTTTCG
GTTACTTATGAAATGTGAAAAAGACCATATAAATATATCTATTAAGGGGAAGTATAGTTTCA
TAAAATCTTGAGGATTACATTCCATAAACCAAGATTACCTTCCGTTTTTTGCTTTGATCCTCT
TCTTATCAAATATATAAACATGACCATTTGATCTTTCATTTTGGATAGTGGGATATACAGGC
AGAAGAAAATCGAGATAAATCAACTAAATGATTTGGATAATCATCTTGAAGATTTGAAGGAA
AATCCAAGAGCTTCAAAAACCTCAAAAATTGATAGGCATCCATCATCATC

A.2. Vektorkarten

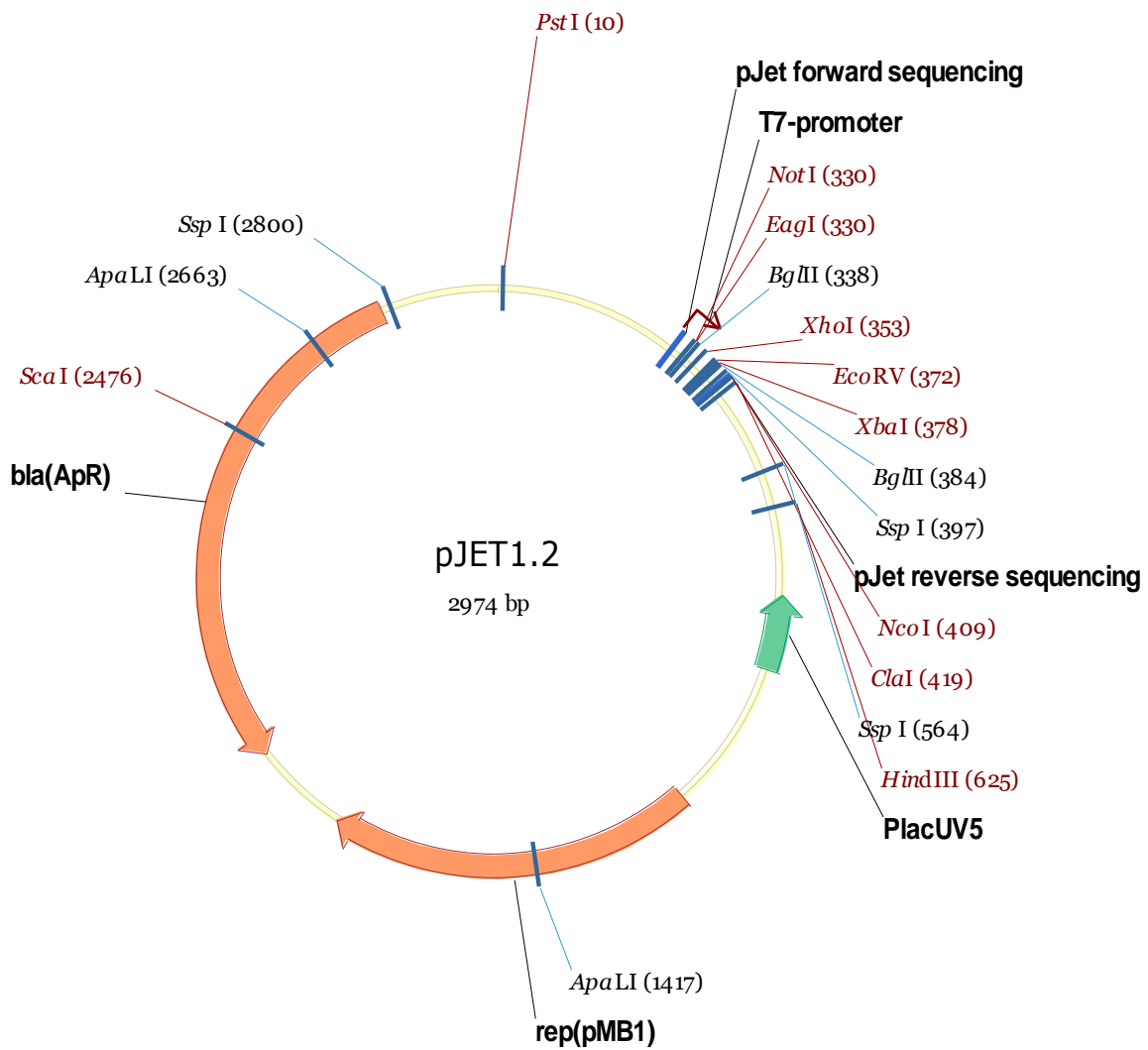


Abbildung A.1.: pJet 1.2 Vektor. Die Vektorkarte wurde aus der vorhandenen Vorlage aus der Vector NTI® Datenbank entnommen.

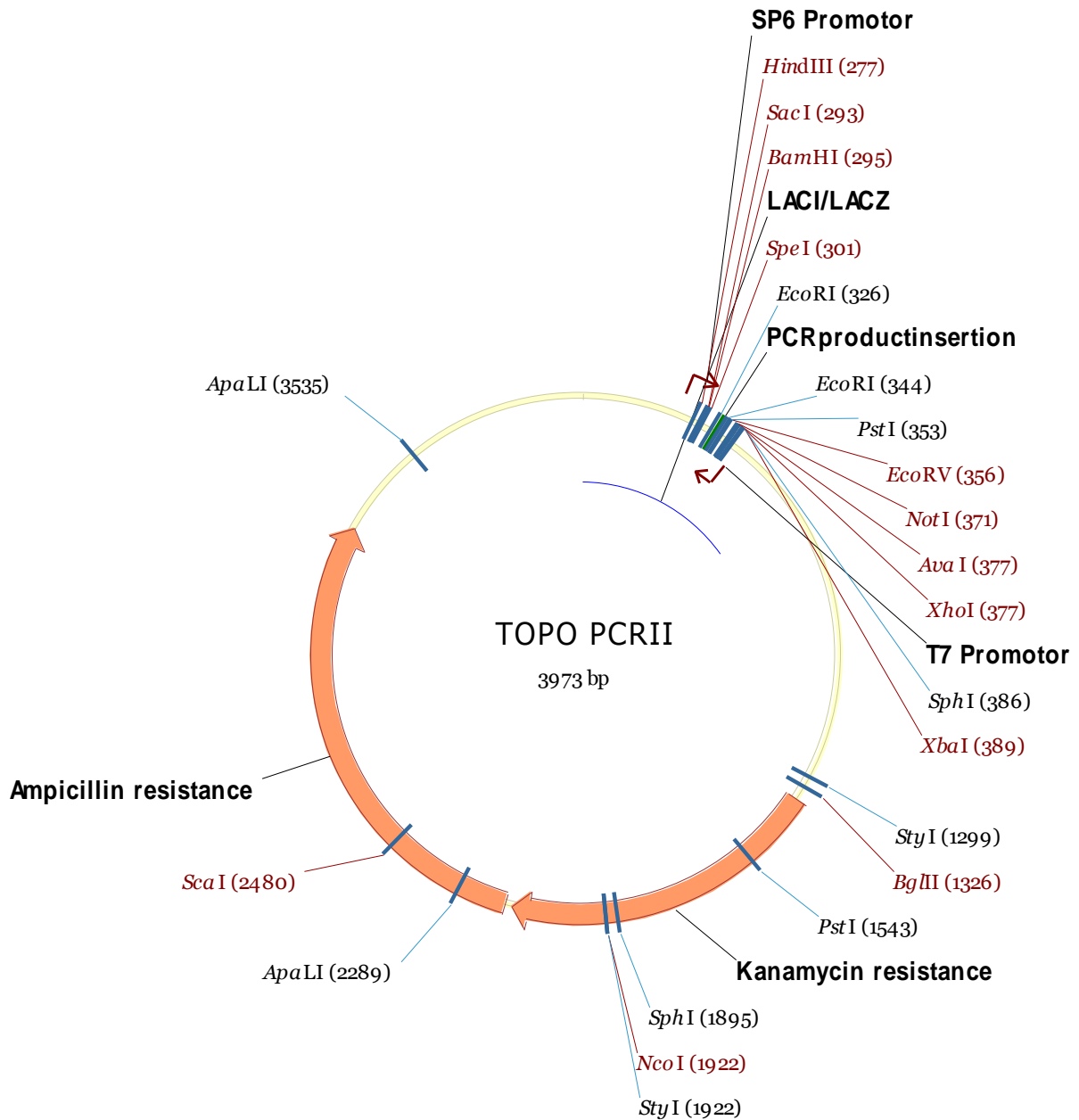


Abbildung A.2.: TOPO pCR II Vektor. Die Vektorkarte wurde aus der vorhandenen Vorlage aus der Vector NTI® Datenbank entnommen.

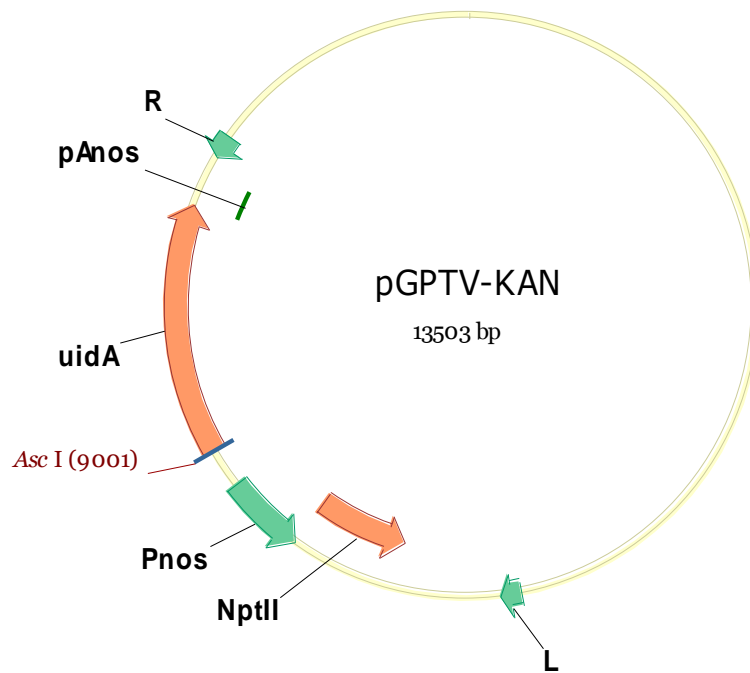


Abbildung A.3.: pGPTV-Kan Vektor. Die Vektorkarte wurde aus der vorhandenen Vorlage aus der Vector NTI® Datenbank entnommen.

A.3. Differentiell exprimierte Gene

A.3.1. In Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* herunter regulierte Gene

ATG Nummer	Name/Funktion	DRN-GR	DRNL-GR
AT4G33790	"acyl CoA reductase, putative"	-0.95	-2.36
ATCG00070	"PSII K protein"	-0.78	-0.88
ATCG00770	"chloroplast 30S ribosomal protein S8"	-0.88	-0.71
AT1G15550	"GA4 (GA REQUIRING 4); gibberellin 3-beta-dioxygenase"	-0.68	-0.70
AT1G68568,AT1G68570	"proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein"	-0.92	-0.75
AT4G19430	"unknown protein"	-1.13	-0.86
AT2G26080	"glycine decarboxylase, putative / glycine cleavage system P-protein, putative"	-0.94	-0.72
AT3G13750	"BGAL1 (BETA GALACTOSIDASE 1); beta-galactosidase"	-0.90	-1.19
AT2G42885	"unknown protein"	-0.68	-0.82
AT5G54190	"PORA (Protochlorophyllide reductase A); oxidoreductase/ protochlorophyllide reductase"	-1.42	-0.77
AT4G02510	"TOC159 (translocon outer membrane complex 159)"	-0.61	-0.71
AT5G08610	"DEAD box RNA helicase (RH26)"	-1.10	-0.99
AT5G62165	"AGL42 (AGAMOUS LIKE 42); transcription factor"	-0.98	-0.66
AT3G42170	pseudogene	-0.68	-0.65
AT1G10980	"unknown protein"	-0.62	-0.56
AT4G17000	"unknown protein"	-0.92	-1.04
AT4G17270,AT4G17280	"auxin-responsive family protein"	-0.82	-0.68
AT2G15128	unknown	-0.71	-0.64
AT1G51460	"ABC transporter family protein"	-0.70	-0.70
AT1G69180	"CRC (CRABS CLAW); transcription factor"	-0.74	-1.44
AT1G06290	"ACX3 (ACYL-COA OXIDASE 3); acyl-CoA oxidase"	-0.59	-0.62
AT4G36050,AT4G36052	"endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein"	-0.59	-0.91
AT1G15690,AT1G15700	"AVP1 (vacuolar-type H ⁺ -pumping pyrophosphatase 1)"	-0.67	-1.03
AT2G23350	"PAB4 (POLY(A) BINDING PROTEIN 4); RNA binding / translation initiation factor"	-0.60	-0.89
AT3G17360	"POK1 (PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 1); microtubule motor"	-0.71	-0.62
AT1G75640	"leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein"	-0.63	-0.63
AT3G52170	"DNA binding"	-0.72	-0.96
AT1G50840	"POLGAMMA2 (polymerase gamma 2); DNA binding / DNA-directed DNA polymerase"	-0.64	-0.72
AT3G54350	"EMB1967 (EMBRYO DEFECTIVE 1967)"	-0.72	-0.86
AT3G11520	"CYCB1;3 (CYCLIN B1;3); cyclin-dependent protein kinase regulator"	-0.63	-0.74
AT5G13980	alpha-mannosidase	-0.61	-0.69
AT3G55660	"ATROPGEF6/ROPGEF6 (KINASE PARTNER PROTEIN-LIKE); Rho guanyl-nucleotide exchange factor"	-0.71	-0.69
AT4G23740	"leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative"	-0.60	-0.61
AT1G11680	"CYP51G1 (CYTOCHROME P450 51); oxygen binding"	-0.66	-0.63
AT4G31210	"DNA topoisomerase family protein"	-0.94	-0.97
AT4G22990	"SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein"	-0.59	-0.98
AT3G56100	"MRLK (MERISTEMATIC RECEPTOR-LIKE KINASE); ATP binding / protein serine/threonine kinase"	-0.69	-0.71
AT1G10510	"EMB2004 (EMBRYO DEFECTIVE 2004); protein binding"	-0.79	-1.05
AT5G04885	"glycosyl hydrolase family 3 protein"	-0.71	-1.18
AT4G34830	binding	-0.63	-0.84
AT2G04395	"DNA binding"	-0.59	-0.74
AT4G20940	"leucine-rich repeat family protein"	-0.65	-0.96
AT1G30690	"SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein"	-0.71	-0.88
AT5G18202,AT5G18202	pseudogene	-0.73	-1.67
AT3G50380	"unknown protein"	-0.61	-0.86
AT2G34190	"xanthine/uracil permease family protein"	-0.66	-0.74
AT3G16660	"unknown protein"	-0.87	-0.76
ATCG01110	unknown	-0.69	-0.91
AT4G36360	"BGAL3 (beta-galactosidase 3); beta-galactosidase"	-0.76	-1.14
AT1G48300,AT1G48310	"SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein"	-0.64	-0.58
AT2G26270,AT2G26280	"unknown protein"	-0.75	-0.71
AT2G41540	"GPDHC1; NAD binding / glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD ⁺)"	-0.61	-0.90
AT1G19880	"regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein"	-0.61	-1.24
AT1G03470	"kinase interacting family protein"	-0.61	-0.57
AT5G51910	"TCP family transcription factor, putative"	-0.60	-0.57
AT2G41550	"unknown protein"	-0.64	-0.70
AT3G20440	"BE1/EMB2729 (BRANCHING ENZYME 1, EMBRYO DEFECTIVE 2729); alpha-amylase"	-0.65	-0.60
AT2G24120	"PDE319/SCA3 (PIGMENT DEFECTIVE 319, SCABRA 3); DNA binding / DNA-directed RNA polymerase"	-0.95	-0.70
AT5G45140	"NRPC2 (nuclear RNA polymerase C 2); DNA binding / DNA-directed RNA polymerase"	-0.70	-0.80

AT3G61300,AT3G61310	"DNA-binding family protein"	-0.70	-0.78
AT5G26742	"EMB1138 (EMBRYO DEFECTIVE 1138); ATP binding / ATP-dependent helicase"	-0.75	-0.75
AT5G64580	"AAA-type ATPase family protein"	-0.93	-1.29
AT1G24310,AT1G24320	"unknown protein"	-0.60	-0.72
AT5G37590	binding	-0.61	-0.88
AT1G34460	"cyclin-dependent protein kinase regulator"	-0.76	-0.61
AT1G55490	"CPN60B (CHAPERONIN 60 BETA); ATP binding / protein binding / unfolded protein binding"	-0.66	-0.66
AT3G48560	"CSR1 (CHLORSULFURON/IMIDAZOLINONE RESISTANT 1)"	-0.64	-0.81
AT2G07690	"minichromosome maintenance family protein / MCM family protein"	-0.60	-1.02
AT1G60160	"potassium transporter family protein"	-0.61	-0.75
AT1G62150	"mitochondrial transcription termination factor-related / mTERF-related"	-0.64	-0.68
AT4G14790	"ATSUV3 (embryo sac development arrest 15)"	-0.65	-1.10
AT5G52920	"pyruvate kinase, putative"	-0.71	-0.89
AT2G41040,AT2G41050	"PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein"	-0.69	-0.78
AT5G66520	"pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein"	-0.72	-0.58
AT1G77470	"replication factor C 36 kDA, putative"	-0.74	-1.14
AT1G55940	"CYP708A1 (cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 1); oxygen binding"	-0.69	-0.61
AT5G23290,AT5G23300	"PYRD (PYRIMIDINE D); dihydroorotate dehydrogenase"	-0.79	-0.89
AT1G62110	"mitochondrial transcription termination factor family protein / mTERF family protein"	-0.64	-0.91
AT1G29270	"unknown protein"	-0.66	-1.93

Tabelle A.1.: In Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* herunter regulierte Gene. In dieser Tabelle sind die 79 in Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* herunter regulierten Gene aus Abbildung 3.19. A aufgelistet.

A.3.2. In Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* hoch regulierte Gene

ATG Nummer	Name/Funktion	<i>DRN-GR</i>	<i>DRNL-GR</i>
AT3G13950	"unknown protein"	1.17	1.82
AT4G39030,AT4G39040	"ED55 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5); antiporter/ transporter"	1.10	1.17
AT1G13470	"unknown protein"	0.93	3.47
AT5G54710	"ankyrin repeat family protein"	1.21	2.41
AT2G43570	"chitinase, putative"	2.88	1.95
AT2G15390	"FUT4 (fucosyltransferase 4); fucosyltransferase"	1.04	1.43
AT1G65690	"harpin-induced protein-related / HIN1-related / harpin-responsive protein-related"	0.94	0.83
AT3G01290	"band 7 family protein"	1.34	2.79
AT3G57260	"BGL2 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2)"	1.95	1.65
AT2G26020	"PDF1.2b (plant defensin 1.2b)"	0.59	1.19
AT3G14050	"RSH2 (RELA-SPOT HOMOLOG); catalytic"	0.71	1.29
AT1G52200	"unknown protein"	0.89	0.69
AT2G34500	"CYP710A1 (cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1)"	1.02	0.57
AT1G36622	"unknown protein"	1.01	0.73
AT1G51270	"structural molecule"	1.33	0.88
AT5G58120,AT5G58130	"disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative"	0.69	1.29
AT5G13080	"WRKY75 (WRKY DNA-binding protein 75); transcription factor"	1.76	0.99
AT3G18240,AT3G18250	"unknown protein"	0.76	1.19
AT2G30750	"CYP71A12 (cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12); oxygen binding"	1.56	1.59
AT5G26920	"calmodulin binding"	0.75	2.20
AT4G23215	pseudogene	0.61	1.20
AT4G01010	"calmodulin binding / cyclic nucleotide binding / ion channel"	1.01	1.34
AT3G08720 ATREP5_27549	"ATPK19/ATPK2 (ARABIDOPSIS THALIANA SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE 19/2)"	0.75	1.35
AT2G17040	"ANAC036 (Arabidopsis NAC domain containing protein 36); transcription factor"	2.51	2.77
AT5G36925	"unknown protein"	0.62	1.24
AT5G50200	"WR3 (WOUND-RESPONSIVE 3)"	0.62	1.72
AT2G35980	"YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)"	2.21	3.10
AT5G35525	"unknown protein"	2.28	3.13
AT3G54150	"embryo-abundant protein-related"	0.68	2.15
AT5G44420	"PDF1.2 (Low-molecular-weight cysteine-rich 77)"	0.94	2.52
AT3G57460	"unknown protein"	0.82	1.54
AT1G14370,AT1G14380	"APK2A (PROTEIN KINASE 2A); kinase"	1.05	1.14
AT1G02360	"chitinase, putative"	1.05	1.64
AT1G02930	"ATGSTF6 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 11); glutathione transferase"	2.47	2.36
AT3G26830	"PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3); oxygen binding"	1.07	1.41
AT5G01540	"lectin protein kinase, putative"	0.68	2.60
AT2G38780,AT2G38790	"unknown protein"	1.06	1.29
AT5G52760	"heavy-metal-associated domain-containing protein"	0.61	3.87
AT4G01750	"RGXT2 (RHAMNOGALACTURONAN XYLOSYLTRANSFERASE 2); UDP-xylosyltransferase"	0.80	1.80

AT5G35735	"auxin-responsive family protein"	1.76	1.27
AT2G24850	"TAT3 (TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3); transaminase"	4.07	1.77
AT4G00970	"protein kinase family protein"	1.66	0.76
AT1G05575	"unknown protein"	0.60	1.14
AT3G19010	"oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein"	1.33	1.06
AT4G18250	"receptor serine/threonine kinase, putative"	0.68	3.25
AT4G38540,AT4G38545	"monooxygenase, putative (MO2)"	1.31	1.10
AT5G18470,AT5G18475	"curculin-like (mannose-binding) lectin family protein"	1.24	2.36
AT1G78410	"VQ motif-containing protein"	0.67	2.11
AT5G24210	"lipase class 3 family protein"	1.85	1.36
AT2G45550	"CYP76C4 (cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4); oxygen binding"	1.24	0.70
AT3G29034	"unknown protein"	0.98	1.15
AT1G13330,AT1G13340	"unknown protein"	0.99	1.58
AT1G66090	"disease resistance protein (TIR-NBS class), putative"	0.65	2.14
AT1G21525	pseudogene	0.69	0.81
AT2G18690	"unknown protein"	1.98	3.65
AT1G76960	"unknown protein"	3.79	3.76
AT3G11340	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	1.13	0.79
AT1G24145	"unknown protein"	2.42	2.87
AT1G09932	"phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase-related"	1.06	3.26
AT5G39670,AT5G39680	"calcium-binding EF hand family protein"	1.23	3.78
AT4G33050	"EDA39 (embryo sac development arrest 39); calmodulin binding"	1.00	2.33
AT1G62840,AT1G62850	"unknown protein"	1.00	0.65
AT1G19020	"unknown protein"	1.93	2.56
AT5G35735,AT5G30540	"auxin-responsive family protein"	1.78	0.80
AT1G02920	"ATGSTF7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 11); glutathione transferase"	3.34	2.81
AT2G24600	"ankyrin repeat family protein"	0.61	1.80
HELITRONY1B_4254,AT5G40780	"LHT1 (LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER 1); amino acid permease/ amino acid transporter"	1.40	2.10
AT2G46400	"WRKY46 (WRKY DNA-binding protein 46); transcription factor"	0.85	2.22
AT1G17170	"ATGSTU24 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 24); glutathione transferase"	0.90	0.88
AT4G23140	"CRK6 (CYSTEINE-RICH RLK 6)"	1.99	3.16
AT2G29350	"SAG13 (Senescence-associated gene 13); oxidoreductase"	3.37	1.60
AT1G21120	"O-methyltransferase, putative"	0.67	1.72
AT3G25760	"AOC1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1)"	3.59	0.90
AT4G14365	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / ankyrin repeat family protein"	1.07	2.64
AT1G59590	ZCF37	1.21	0.89
AT2G23680	"stress-responsive protein, putative"	2.47	2.70
AT5G42050	"unknown protein"	0.70	0.60
AT4G32870	"unknown protein"	0.89	0.84
AT2G14610	"PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1)"	3.92	5.06
AT1G77450	"ANAC032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32); transcription factor"	0.72	0.64
AT4G31800	"WRKY18 (WRKY DNA-binding protein 18); transcription factor"	2.00	1.53
AT3G56710	"SIB1 (SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1); binding"	0.82	0.78
AT3G47480	"calcium-binding EF hand family protein"	1.90	2.29
AT2G29460	"ATGSTU4 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 22); glutathione transferase"	1.96	1.66
AT5G26340	"MSS1 (SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13)"	2.39	0.88
AT5G48540	"33 kDa secretory protein-related"	1.26	1.31
AT2G14580	"ATPRB1 (Arabidopsis thaliana basic pathogenesis-related protein 1)"	0.92	2.08
AT5G19240	"unknown protein"	1.65	0.83
AT3G22600	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	2.81	3.06
AT3G26210	"CYP71B23 (cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 23); oxygen binding"	1.63	2.57
AT1G22170,AT1G22180	"SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein"	0.62	0.78
AT3G51450	"strictosidine synthase family protein"	1.38	0.77
AT3G49780	"ATPSK4 (PHYTOSULFOKINE 4 PRECURSOR); growth factor"	2.29	0.73
AT1G18390	"protein kinase family protein"	0.79	1.04
AT5G38895,AT5G38900	"DSBA oxidoreductase family protein"	1.56	1.14
AT3G04720	"PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)"	2.90	2.03
AT3G22160	"VQ motif-containing protein"	0.75	0.64
AT2G26560	"PLP2 (PHOSPHOLIPASE A 2A); nutrient reservoir"	1.01	2.88
AT3G09270	"ATGSTU8 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 8); glutathione transferase"	0.75	0.79
AT1G17147	"unknown protein"	0.62	1.07
AT5G60950	"phytochelatin synthetase-related"	0.95	1.78
AT3G23550	"MATE efflux family protein"	2.19	1.30
AT5G52750	"heavy-metal-associated domain-containing protein"	1.27	2.88
AT1G35350	"unknown protein"	0.96	0.66
AT5G10760	"aspartyl protease family protein"	2.90	2.19
AT5G36220	"CYP81D1 (CYTOCHROME P450 91A1); oxygen binding"	2.42	0.94
AT4G13180	"short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein"	0.71	0.59
AT3G50770	"calmodulin-related protein, putative"	3.87	2.32
AT5G33290	"XGD1 (XYLOGALACTURONAN DEFICIENT 1); catalytic"	1.62	0.79
AT3G16530	"legume lectin family protein"	3.09	2.04
AT1G28370	"ATERF11/ERF11 (ERF domain protein 11); DNA binding / transcription factor/ transcriptional repressor"	0.79	0.77
AT4G37400	"CYP81F3 (cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 3); oxygen binding"	0.97	0.65
AT1G14880	"unknown protein"	2.22	3.29
AT1G65500	"unknown protein"	0.80	1.02
AT3G28210	"PMZ; zinc ion binding"	0.76	0.86
AT2G15490	"UGT73B4; UDP-glycosyltransferase"	0.97	0.72
AT5G38210	"serine/threonine protein kinase family protein"	0.65	0.93
AT1G13210	"haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein"	0.75	0.84
AT3G60420	"unknown protein"	1.04	1.64

AT3G44860	"S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein"	2.92	1.32
AT2G32190	"unknown protein"	0.84	1.59
AT1G45145	"ATTRX5 (thioredoxin H-type 5); thiol-disulfide exchange intermediate"	1.68	0.93
AT2G30140	"UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein"	1.12	0.66
AT1G14870	"unknown protein"	1.71	2.68
AT5G55460,AT5G55470	"protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein"	0.72	1.53
AT2G47130	"short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein"	1.22	2.09
AT2G41410	"calmodulin, putative"	1.34	0.93
AT4G02410	"lectin protein kinase family protein"	1.01	0.88
AT3G57330	"calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative / Ca2+-ATPase, putative (ACA11)"	0.60	0.89
AT2G25735	"unknown protein"	1.23	0.63
AT5G23510	"unknown protein"	0.82	0.73
AT5G11970	"unknown protein"	0.60	0.72
AT4G13900	pseudogene,pseudogene	1.01	1.20
AT3G28540	"AAA-type ATPase family protein"	1.57	2.32
AT3G25882	"NIMIN-2 (NIM1-INTERACTING 2)"	0.83	1.23
AT3G11000,AT3G11010	"disease resistance family protein / LRR family protein"	0.94	1.91
AT1G60730	"aldo/keto reductase family protein"	0.73	0.72
AT4G36648	unknown	0.82	0.60
AT1G65845	"unknown protein"	1.41	1.23
AT4G23160	"protein kinase family protein"	1.11	1.92
AT3G15356	"legume lectin family protein"	1.09	0.72
AT5G20230	"ATBCB (ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN); copper ion binding"	1.24	0.99
AT1G28480	"glutaredoxin family protein"	2.48	2.10
AT1G76070	"unknown protein"	0.82	0.70
AT2G02930	"ATGSTF3 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 16); glutathione transferase"	2.34	2.24
AT1G05340	"unknown protein"	1.54	2.46
AT5G10380	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein"	2.24	1.18
AT1G23140	"C2 domain-containing protein"	0.92	1.02
AT3G04410	"transcription factor"	1.27	0.60
AT2G46600,AT2G46610	"calcium-binding protein, putative"	2.46	0.61
AT4G02380	"SAG21 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21)"	2.07	2.99
AT5G54490	"PBP1 (PINOID-BINDING PROTEIN 1); calcium ion binding"	0.70	1.09
AT3G50900	"unknown protein"	0.75	0.65
AT5G25250	"unknown protein"	0.98	2.74
AT4G23270	"protein kinase family protein"	1.02	0.61
AT1G25400	"unknown protein"	1.26	0.94
AT4G02520	"ATGSTF2 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class phi) 2); glutathione transferase"	2.08	2.13
AT1G15790	"unknown protein"	0.61	1.08
AT1G74430,AT1G74440	"unknown protein"	0.67	0.97
AT2G14560	"unknown protein"	0.69	1.37
AT1G70810	"C2 domain-containing protein"	1.44	0.80
AT1G35230	"AGP5 (ARABINO GALACTAN-PROTEIN 5)"	1.22	2.08
AT1G58225	"unknown protein"	2.81	2.02
AT1G78280,AT1G78290	"serine/threonine protein kinase, putative"	0.62	0.88
AT4G04540	"protein kinase family protein"	0.59	1.33
AT1G72900	"disease resistance protein (TIR-NBS class), putative"	0.68	1.30
AT4G22710	"CYP706A2 (cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 2); oxygen binding"	1.26	0.61
AT4G36988,AT4G36990	"unknown protein","HSF4 (HEAT SHOCK FACTOR 4); DNA binding / transcription factor"	1.44	1.44
AT3G49120	"ATPCB/ATPERX34/PERX34/PRXCB (PEROXIDASE 34); peroxidase"	1.07	0.57
AT1G35710	"leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative"	0.75	1.58
AT4G25940	"epsin N-terminal homology (ENTH) domain-containing protein"	0.64	1.38
AT3G60540	"sec61beta family protein"	0.62	0.58
AT1G24147	"unknown protein"	3.05	1.73
AT5G60900	"RLK1 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1); carbohydrate binding / kinase"	0.98	1.13
AT5G26690	"heavy-metal-associated domain-containing protein"	0.78	1.50
AT5G44568	"unknown protein"	0.79	1.58
AT2G25000	"WRKY60 (WRKY DNA-binding protein 60); transcription factor"	1.11	1.89
HELITRONY1B_4254AT5G40780	unknown	0.60	0.89
AT4G38550	"unknown protein"	0.67	1.00
AT1G33560	"ADR1 (ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1)"	0.86	0.89
AT2G38860	"YLS5 (yellow-leaf-specific gene 5)"	0.73	0.68
AT3G28930	"AIG2 (AVRRPT2-INDUCED GENE 2)"	0.83	0.93
AT2G46440	"ATCNGC11 (cyclic nucleotide gated channel 11)"	0.84	1.35
AT5G59540	oxidoreductase	1.09	0.64
AT3G03000	"calmodulin, putative"	0.93	0.96
AT2G43150	"proline-rich extensin-like family protein"	0.68	1.25
AT4G13810	"disease resistance family protein / LRR family protein"	0.84	0.73
AT5G18310	"unknown protein"	0.79	1.14
AT2G39210	"nodulin family protein"	0.78	1.42
AT1G21130	"O-methyltransferase, putative"	1.04	1.01
AT2G37760	"aldo/keto reductase family protein"	1.62	0.74
AT1G09970	"leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative"	0.85	0.77
AT4G20780	"calcium-binding protein, putative"	0.83	0.60
AT3G19660	"unknown protein"	0.83	0.60
AT1G75040	"PRS5 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 5)"	1.42	1.09
AT3G51430	"YLS2 (yellow-leaf-specific gene 2); strictosidine synthase"	0.72	1.12
AT5G54610	"ANK (ANKYRIN); protein binding"	0.90	1.57
AT3G28940	"avirulence-responsive protein, putative / avirulence induced gene (AIG) protein, putative"	0.76	0.64
AT3G24982	"protein binding"	0.82	1.21

AT2G45210	"auxin-responsive protein-related"	0.78	0.93
AT4G23170	"EP1; protein kinase"	0.68	1.00
AT1G72520	"lipoxygenase, putative"	1.22	1.81
AT2G01540	"C2 domain-containing protein"	0.60	0.57
AT5G08760	"unknown protein"	0.81	1.10
AT2G25510	"unknown protein"	0.86	1.60
AT1G21100	"O-methyltransferase, putative"	1.10	1.31
AT2G38465	"unknown protein"	0.75	0.61
AT1G21110	"O-methyltransferase, putative"	1.19	1.36
AT1G06225	unknown	0.78	0.64
AT4G18205	AT4G18200	1.67	0.99
AT1G21245	"wall-associated kinase-related"	0.92	1.36
AT5G45380	"sodium:solute symporter family protein"	0.92	0.60
AT5G46871	"unknown protein"	0.69	0.70
AT1G55910	"ZIP11 (ZINC TRANSPORTER 11 PRECURSOR); cation transporter"	0.69	0.67
AT3G61280	unknown	1.24	1.21
AT5G59540	unknown	1.18	1.13
AT1G15390,AT1G15400	"unknown protein"	0.60	0.66
AT1G72450	unknown	0.95	0.60
AT4G28490	"HAESA (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 5); ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase"	0.87	0.81
AT5G24270	"SOS3 (SALT OVERLY SENSITIVE 3)"	0.63	0.95
AT1G24147	unknown	1.55	1.30
AT4G14746	"unknown protein"	0.88	0.60
AT5G44580	"unknown protein"	0.94	1.01
AT3G45860	"receptor-like protein kinase, putative"	2.43	0.97
AT3G26590	"MATE efflux family protein"	1.35	0.81
AT3G51430	unknown	0.62	1.00
AT2G41090	"calmodulin-like calcium-binding protein, 22 kDa (CaBP-22)"	0.61	0.93
AT2G41080	unknown	0.70	1.16
AT3G45860	"receptor-like protein kinase, putative"	2.29	1.34
AT3G25770	unknown	1.82	0.71
AT5G53420	"unknown protein"	0.78	0.81
AT1G69450	"unknown protein"	2.19	0.62
AT1G78850	"curculin-like (mannose-binding) lectin family protein"	1.52	1.33
AT3G22235,AT3G22240	"unknown protein","unknown protein"	1.35	1.28
AT1G65190	"protein kinase family protein"	0.76	0.65
AT5G03350	"legume lectin family protein"	1.96	1.42
AT1G31580	ECS1	0.83	1.07
AT5G01850	"protein kinase, putative"	0.72	0.61
AT2G25510	unknown	0.69	1.33
AT2G41090	unknown	0.71	0.73
AT5G43770,AT5G43780	APS4	1.47	0.82
AT4G28270	"zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein"	1.53	0.57
AT5G57550	"XTR3 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 3); hydrolase, acting on glycosyl bonds"	1.32	0.94
AT3G22235,AT3G22240	"unknown protein","unknown protein"	1.22	0.82
AT1G65190	unknown	0.76	0.64
AT3G22231	"PCC1 (PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1)"	1.25	1.24
AT3G13951	"unknown protein"	0.88	0.65
AT4G39030,AT4G39041	"EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5); antiporter/ transporter"	1.28	0.58
AT1G13471	"unknown protein"	0.61	0.71
AT5G54711	"ankyrin repeat family protein"	0.59	0.61
AT2G12790	"chitinase, putative"	1.00	1.09
AT2G40970	"FUT4 (fucosyltransferase 4); fucosyltransferase"	1.19	1.02
AT1G65691	"harpin-induced protein-related / HIN1-related / harpin-responsive protein-related"	0.79	0.62
AT3G113230	"band 7 family protein"	0.61	0.60
AT3G169200	"BGL2 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2)"	1.06	1.26

Tabelle A.2.: In Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* hoch regulierte Gene. In dieser Tabelle sind die 255 in Abhängigkeit von *DRN* und *DRNL* hoch regulierten Gene aus Abbildung 3.19. B aufgelistet.

A 4. Korrekturen und Ergänzungen

Die Experimente aus Abschnitt 3.3. welche die Abbildungen 3.1.2., 3.1.3, 3.1.4. sowie die Tabellen 3.2 und 3.3. umfassen, wurden mit Wildtyp und *ATML1::DRN* Keimlingen durchgeführt. In zwei weiteren unabhängigen Versuchsansätzen wurde gezeigt, dass die in diesen Experimenten für *ATML1::DRN* erbrachten Ergebnisse, ebenso für *ATML1::DRN-LIKE* gültig sind.

A 4.1. Zellzahlen von Wildtyp, *ATML1::DRN* und *ATML1:DRN-LIKE* Keimlingen

Im ersten Experiment wurden die epidermalen Zellen Zellreihen des Hypokotyls von 2 Tage alten, im Licht gekeimten und etiolierten Keimlingen (n=10) gezählt und zwischen Wildtyp und transgenen Linien verglichen. Dieses Experiment umfasst die Abbildung A.4. und die Tabelle A.3., welche Abbildung 3.1.4 sowie Tabelle 3.3 ersetzen.

Das Experiment wurde zusätzlich dahingehend optimiert, dass die epidermalen Zellen zweier nebeneinander liegender Zellreihen des Hypokotyls gezählt wurden. Damit wurde der signifikante Unterschied in der Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls zwischen der Stomata-Zellreihe und der nicht-Stomata Zellreihe berücksichtigt (Tabelle A.3.)

Wie zuvor in Abschnitt 3.1. und 3.3. beschrieben wird, bestätigt dieses Experiment, dass die Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls in transgenen *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht ist. Sowohl bei Licht-gekeimten, als auch etiolierten Keimlingen ist dieser Unterschied zum Wildtyp hoch signifikant ($p < 0,001$) (Abb. A.4. und Tabelle A.3.).

Die Etiolierung und damit einhergehende Zellstreckung hat im Wildtyp keinen Einfluss auf die Anzahl der epidermalen Zellen des Hypokotyls (Abbildung A4, Tabelle A.3.). Hingegen war in der 1. Version der Arbeit gezeigt, dass in *ATML1::DRN* Keimlingen die Etiolierung der erhöhten Zellteilungsaktivität im Hypokotyl entgegen wirkt (Abbildung, 3.1.4., Tabelle 3.3). Das ergänzenden zweite Experiment zeigt dies nun für *ATML1::DRN* sowie *ATML1::DRNL* Keimlinge; in beiden Fällen sind die Zellzahlen im Hypokotyl im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht ($p < 0,001$), jedoch niedriger im Vergleich zu Licht-gekeimten *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen (*ATML1::DRN*: $p < 0,01$; *ATML1::DRNL*: $p < 0,5$ in

Tabelle A3.). Damit bestätigt das Experiment die ursprünglichen Beobachtungen für *ATML1::DRN* und zeigt außerdem, dass diese auch für *ATML1::DRNL* gelten.

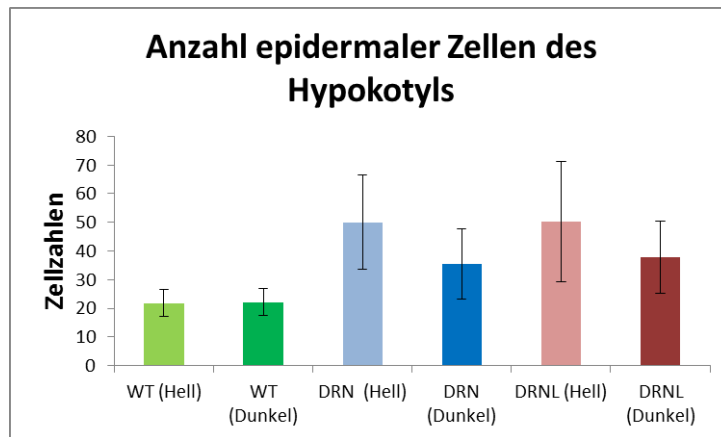


Abbildung A.4.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls von Wildtyp, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN-LIKE* Keimlingen. In dieser Tabelle sind die Zellzahlen zweier nebeneinanderliegender Zellreihen des Hypokotyls von im Licht gekeimten und etiolierten Keimlingen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Zellreihe	WT (Hell)	WT (Dunkel)	DRN (Hell)	DRN (Dunkel)	DRNL (Hell)	DRNL (Dunkel)
1	1	19	23	27	30	27
	2	33	30	45	58	45
2	1	22	15	41	33	32
	2	29	25	72	70	71
3	1	16	16	35	18	32
	2	20	25	53	32	42
4	1	20	23	48	25	54
	2	25	30	81	37	65
5	1	16	15	25	27	44
	2	21	20	75	43	80
6	1	16	19	43	17	52
	2	20	20	73	35	111
7	1	21	14	37	32	27
	2	27	23	58	45	48
8	1	15	24	37	32	30
	2	26	25	45	36	55
9	1	21	22	42	34	28
	2	26	23	68	41	48
10	1	20	23	38	28	49
	2	24	28	57	37	66
Mittelwert	21.85	22.15	50	35.5	50.3	37.85
Standardabweichung	4.727021985	4.671019273	16.47006855	12.22809535	20.91360675	12.65025483
p-Wert: Transgen vs. WT			***	***	***	***
p-Wert: Hell vs. Dunkel	0.84108277		0.003082083		0.02843922	
p-Wert: Reihe 1 vs. Reihe 2	**	**	***	**	**	*
	0.000512321	0.004795411	3.27259E-05	0.001447254	0.003031711	0.020140885

Tabelle A.3.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls von Wildtyp, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN-LIKE* Keimlingen. In dieser Tabelle sind die Zellzahlen zweier nebeneinanderliegender epidermaler Zellreihen des Hypokotyls von im Licht gekeimten und etiolierten Keimlingen aufgeführt.

A 4.2. Chromatin-Gehalt epidermaler Zellen des Hypokotyls von Wildtyp, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN-LIKE* Keimlingen

Im zweiten Experiment wurden 2 Tage alte, im Licht- bzw. Dunkeln gekeimte Keimlinge (n=10) mit DAPI gefärbt und anschließend der Chromatin-Gehalt der epidermalen Zellen des Hypokotyls gemessen (Durchführungen siehe Abschnitt 2.2.12.3). Dieses Experiment umfasst die Abbildung A.5. sowie die Tabellen A.4 und A.5., welche die Abbildungen 3.1.2., 3.1.3 und die Tabelle 3.2. ersetzen.

Die experimentelle Auswertung wurde dahingehend verbessert, dass nicht der Chromatin-Gehalt fluoreszierender Zellkerne entlang des Hypokotyls in apikal-basaler Richtung, sondern Zellkerne innerhalb einer definierten Fläche von 75x75µm (8-10 Zellen) im apikalen bzw. basalen Teil des Hypokotyls vermessen wurden. Bei etiolierten Keimlingen bleibt diese Fläche nur apikal im Hypokotyl vergleichbar, da sich die Zellen im basalen Teil des Hypokotyls stark strecken. Hier wurden 8-10 Kerne benachbarter Zellen gemessen. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, nicht nur die Unterschiede im Chromatin-Gehalt zwischen Wildtyp und *ATML1::DRN/DRNL* zu beschreiben, sondern auch Unterschiede zwischen apikalen und basalen Zellen des Hypokotyls herauszuarbeiten.

A.4.2.1. Die Anzahl Zellen mit einem Chromatin-Gehalt von 2C ist in *ATML1::DRN/DRNL* signifikant erhöht

ATML1::DRN und *ATML1::DRNL* Keimlinge besitzen im apikalen Teil des Hypokotyls mit jeweils 69,28% und 73,21% während der Keimung im Licht signifikant ($p < 0,01$, Tabelle A.5. A) mehr Zellen in der 2C Fraktion als der Wildtyp mit 46,30% (Abbildung A.5. A) und Tabelle A.4.), wo hingegen die Anzahl Zellen in der 4C Fraktion bei *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen signifikant erniedrigt ist ($p < 0,01$ Tabelle A.5. A). Die Anzahl Zellen der 8C und 16 C Fraktionen ist nicht signifikant verändert im Vergleich zum Wildtyp. Die erhöhte Anzahl Zellen mit einem Chromatin-Gehalt von 2C ist repräsentativ für Zellen, die gerade eine Zellteilung durchlaufen haben bzw. Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden. Dieser Befund stimmt mit den erhöhten Zellzahlen der transgenen Linien aus Experiment A.4.1 überein. Im Licht gekeimte transgene Linien zeigen im basalen Teil des Hypokotyls keine signifikanten Unterschiede im Chromatin-Gehalt zum Wildtyp. Dies geht mit der Beobachtung

einher, dass sich in diesem Stadium des Keimlings auch keine zusätzlichen Zellteilungen im basalen Teil des Hypokotyls beobachten lassen.

A.4.2.2. In etiolierten Keimlingen reduziert sich die Anzahl von Zellen in der 2C Fraktion

Die Etiolierung von Wildtyp und transgenen Keimlingen bewirkt, dass die epidermalen Zellen einen zusätzlichen Endozyklus durchlaufen (Abbildung A.5. C und D). Die Analyse der 3 Genotypen vor und nach der Etiolierung zeigt eine deutliche Reduktion der Zellen in der 2C Fraktion und das vermehrte Auftreten von Zellen in der 8 C Fraktion. Dieser Effekt ist sowohl im apikalen, als auch basalen Bereich des Hypokotyls für den Wildtyp sowie *ATML1::DRN/DRNL* signifikant (Tabelle A.5. D). Ebenso wie bei der Lichtkeimung besitzen etiolierte *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL* Keimlinge im apikalen Bereich des Hypokotyls mit 38,07% und 40,20% signifikant mehr Zellen in der 2C Fraktion ($p < 0,01$ Tabelle A.5. B), sowie eine signifikant reduzierte Anzahl Zellen in der 4C Fraktion im Vergleich zum Wildtyp ($p < 0,01$) (Abb. A.5. B) und Tabellen A.4. und A.5. B). Dies stimmt mit der Beobachtung aus Experiment A.4.1. überein, dass die Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls etiolierter transgener Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. Vergleicht man nun die Anzahl apikaler Zellen der 2C und 4C Fraktion von im Licht gekeimten und etiolierten *ATML1::DRN/DRNL* (Abbildung A.5. C) und Keimlingen zeigt sich, dass die Etiolierung eine signifikante Reduktion der 2C Zellen von 69,28 % auf 38,07% für *ATML1::DRN* und von 73,21 % auf 40,20% für *ATML1::DRNL* zur Folge hat (Tabelle A.4. und A.5. D). Gleichzeitig erhöht sich im apikalen Bereich während der Etiolierung die Anzahl der Zellen in der 4C Fraktion. Durch diesen Vergleich wird deutlich, dass die histologisch erkennbare Reduktion zusätzlicher Zellteilungen in *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen als Folge der Etiolierung, auch auf der Ebene des Chromatin-Gehaltes wiederzuerkennen ist.

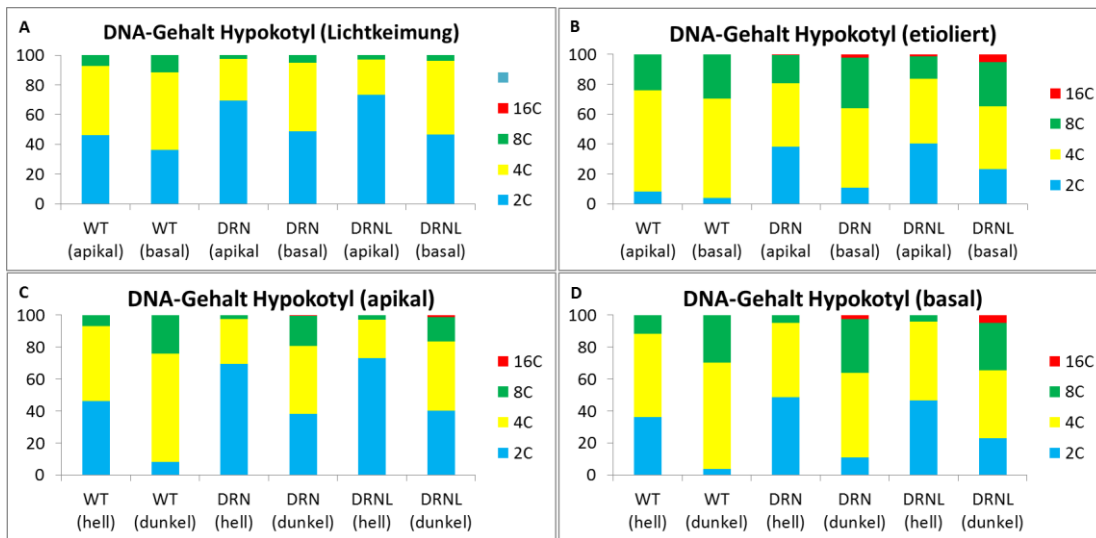


Abbildung A.5.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls 2 Tage alter Keimlinge in der jeweiligen C-Klasse (in % der Gesamtzellzahl) von WT, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL*: Die Diagramme A) und B) verdeutlichen die Unterschiede in der prozentualen Verteilung von Zellen zwischen transgenen Keimlingen und dem WT sowie die Unterschiede im apikalen und basalen Bereich des Hypokotyls. Die Diagramme C) und D) heben die Unterschiede in der prozentualen Verteilung zwischen im Licht gekeimten und etiolierten Keimlingen hervor.

		2C	4C	8C	16C	2C	4C	8C	16C
		Lichtkeimung							
		apikal				basal			
WT	Mittelwert	46.309524	46.607143	7.0833333	0	36.329365	52.083333	11.587302	0
	STABW	12.103066	10.199541	9.9821944	0	21.893922	20.013636	15.13357	0
DRN	Mittelwert	69.285714	28.130952	2.5833333	0	48.730159	46.269841	5	0
	STABW	16.328702	14.883867	3.3379598	0	19.58771	18.310863	8.7400737	0
DRNL	Mittelwert	73.212652	23.930205	2.8571429	0	46.56746	49.464286	3.968254	0
	STABW	14.993025	15.068801	4.9943278	0	20.6612	17.930979	6.4476495	0
		Dunkelkeimung							
		apikal				basal			
WT	Mittelwert	8.3333333	67.638889	24.027778	0	3.9285714	66.488095	29.583333	0
	STABW	5.7824056	16.499288	16.998371	0	6.3442441	13.197204	13.663275	0
DRN	Mittelwert	38.079365	42.474206	18.890873	0.5555556	10.833333	53.194444	33.611111	2.3611111
	STABW	7.6084755	7.6021388	10.65887	1.7568209	10.573409	13.514237	19.748504	4.9884125
DRNL	Mittelwert	40.208333	43.375	15.083333	1.3333333	23.194444	42.083333	29.722222	5
	STABW	6.9756244	9.5630825	9.785114	2.8109135	14.713921	22.096966	18.18213	8.7400737

Tabelle A.4.: Anzahl epidermaler Zellen des Hypokotyls 2 Tage alter Keimlinge in der jeweiligen C-Klasse (in % der Gesamtzellzahl) von Wildtyp, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN-LIKE*. In dieser Tabelle ist der DNA Gehalt zweier nebeneinanderliegender Zellreihen des Hypokotyls von im Licht gekeimten (A) und etiolierten (B) Keimlingen aufgeführt

A 4.2.3. Apikal-basale Polarität in *ATML1::DRN* und *ATML1::DRNL*

Bei Wildtyp Keimlingen lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem apikalen Bereich und der Basis in Hinblick auf den Chromatin-Gehalt der Zellkerne beobachten (Tabelle A.5. C). Bei *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen hingegen fällt auf, dass sich diese nur im apikalen Bereich durchgehend signifikant vom Wildtyp unterscheiden bzw. während der Etiolierung in gleicher Weise antworten. Im basalen Bereich unterscheiden sich *ATML1::DRN/DRNL* Keimlinge entweder, wie bei der Lichtkeimung, gar nicht vom Wildtyp (Tabelle A.5. A) oder antworten unterschiedlich voneinander (Tabelle A.5. B und C).

	2C	4C	8C	16C	2C	4C	8C	16C	
A	Signifikanz WT/Transgen (Lichtkeimung)								
	apikal				basal				
	p-Wert WT/DRN	** 0.0024091	** 0.0051732	0.203555	0.1987601	0.5066379	0.2525459		
	p-Wert WT/DRNL	*** 0.0003674	** 0.001192	0.2521776	0.2964142	0.7614984	0.168376		
p-Wert DRNL/DRN	0.5823107	0.5384123	0.8872238	0.8128847	0.6980932	0.7676092			
B	Signifikanz WT/Transgen (Dunkelkeimung)								
	apikal				basal				
	p-Wert WT/DRN	*** 2.184E-08	*** 0.0007914	0.4307009	0.3434364	* 0.0935329	0.0390662	0.6023246	0.1517834
	p-Wert WT/DRNL	*** 2.459E-09	** 0.0011871	0.1707062	0.1678507	** 0.0024372	** 0.009167	0.9848217	0.1038881
p-Wert DRNL/DRN	0.522561	0.818392	0.416311	0.469473	* 0.0461933	0.1951255	0.6523846	0.4206012	
C	Signifikanz apikal/basal								
	Lichtkeimung				Dunkelkeimung				
	p-Wert WT	** 0.227676	** 0.4541478	0.4438673	0.1221903	** 0.8652611	*	0.4314951	
	p-Wert DRN	** 0.0043858	** 0.0025636	0.667608	** 0.0057832	* 0.868058	** 0.0419224	0.2330954	
p-Wert DRNL	** 0.0204772	** 0.0262247	0.4305182	5.338E-06	* 0.0460426	0.0572115	0.3030272		
D	Signifikanz hell/dunkel								
	apikal				basal				
	p-Wert WT	*** 6.755E-07	** 0.0037306	* 0.0162078	** 0.0010199	0.0760836	* 0.0121465		
	p-Wert DRN	*** 0.0001142	** 0.0173322	*** 0.0007903	0.3434364	*** 0.0001004	** 0.3497917	0.0011719	0.1686747
p-Wert DRNL	*** 2.975E-05	** 0.003535	** 0.0036185	0.1678507	* 0.0100138	** 0.4232751	** 0.0013696	0.1038881	

Tabelle A.5.: Statische Signifikanz der Verteilung epidermaler Zellen des Hypokotyls in der jeweiligen C-Klasse (in % der Gesamtzellzahl) 2 Tage alter Wildtyp, *ATML1::DRN* und *ATML1::DRN-LIKE* Keimlinge. p-Werte resultierend aus dem Vergleich zwischen in Licht gekeimten Wildtyp und *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen im apikalen und basalen Bereich des Hypokotyls (A). p-Werte resultierend aus dem Vergleich zwischen etiolierten Wildtyp und *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen im apikalen und basalen Bereich des Hypokotyls (B). p-Werte resultierend aus dem Vergleich des apikalen und basalen Bereich des Hypokotyls (C). p-Werte resultieren aus zwischen Licht-gekeimten und etiolierten Keimlingen (D).

A 4.3. Aktuelle Erkenntnisse und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser beiden Experimenten bestätigen die für *ATML1::DRN* gemachten Beobachtungen und zeigen, dass diese auch für *ATML1::DRNL* Gültigkeit haben. Damit werden die zuvor gemachten Beobachtungen vervollständigt und unterstützen weiterhin die in dieser Arbeit diskutierte Annahme von einer gemeinsamen bzw. ähnlichen Funktion von *DRN* und *DRNL* im Meristem.

Das Experiment A.4.1. zeigt zudem, dass ein erheblicher Unterschied in der Zellzahl zwischen zwei nebeneinander liegenden Zellreihen des Hypokotyls, der Stomata- und der nicht-Stomata-Zellreihe, besteht.

Dadurch wird deutlich, dass obwohl in *ATML1::DRN/DRNL* Keimlingen auch in der nicht-Stomata Zellreihe zusätzliche Zellteilungen auftreten, die Zellteilungskompetenz in der Stomata-Zellreihe signifikant erhöht ist.

Weiterhin zeigt Experiment A.4.2. dass die Unterschiede im Chromatin-Gehalt von *ATML1::DRN/DRNL* Vergleich zum Wildtyp im apikalen Bereich signifikanter sind als an der Basis des Hypokotyls.

Der zelluläre Kontext scheint demnach entscheidend für das „Auslesen“ der ektopischen Expression von *DRN* bzw. *DRNL* zu sein.

Erklärung

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

Die von mir vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Funktionale Analyse und Identifizierung potentieller Zielgene von *DORNRÖSCHEN* und *DORNRÖSCHEN-LIKE* in *Arabidopsis thaliana*“

ist von Prof. Dr. Wolfgang Werr betreut worden.

Ort, Datum

Unterschrift