

**Zur Rolle von *CLAVATA3* bei der Regulation des Stammzellschicksals
im Sproßmeristem von *Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Ulrike Brand
aus Köln

Köln 2002

Berichtersteller :

Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prof. Dr. Rüdiger Simon

Tag der mündlichen Prüfung :

29.11.2002

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-4.

Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. and Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-9.

Brand, U., Hobe, M., Simon, R. Functional domains in plant shoot meristems. Review; *BioEssay* 2001; **23**: 134-41.

Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M. and Simon, R. (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 565-75.

Danksagung

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

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Rüdiger Simon, der die vorliegende Arbeit betreut hat. Seine große Hilfsbereitschaft, Unterstützung und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Margit Grünewald danke ich herzlich für ihre große Unterstützung bei vielfältigen Arbeiten und die freundschaftliche Zusammenarbeit als Laborbank-Nachbarinnen.

Martin Hobe sei gedankt für seine fachliche Unterstützung, große Hilfsbereitschaft und seine freundschaftliche Kollegialität.

Lorenzo Borghi und Ralf Müller danke ich für die nette Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe.

Bei den Mitgliedern des Instituts, vor allem der Pflanzen-Gruppe – Peter, Judith, Roman, Petra, Melanie, Jochen, Mario, John, Rachid und Thomas - möchte ich mich herzlich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Heike Markel gilt mein Dank für die Unterstützung und die anregenden Diskussionen in unseren Donnerstags-Feynsinn-Zirkeln.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Verantwortlichen im Gewächshaus für ihre große Hilfe.

Alexander Brand danke ich besonders für seine EDV-technische Unterstützung und Martin Brand für die wichtigen Korrekturen dieser Arbeit.

Burkhard Schnorrenberg danke ich herzlich für seine unendliche Geduld und Unterstützung sowie für die Endkorrektur der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre stete Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Organisation des pflanzlichen Meristems	1
1.2	Pflanzliche Stammzellen befinden sich in den Meristemen	2
1.3	Wichtige meristemspezifische Gene und deren Mutanten in Arabidopsis	3
1.3.1	Repression von meristematischem Schicksal	4
1.3.1.1	<i>CLAVATA</i>	4
1.3.2	Bildung und Aufrechterhaltung eines funktionalen Meristems	5
1.3.2.1	<i>WUSCHEL</i>	5
1.3.2.2	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>	6
1.3.2.3	<i>CUP SHAPED COTYLEDON</i>	7
1.3.2.4	<i>POLTERGEIST</i>	8
1.3.2.5	<i>PINHEAD</i>	8
1.3.3	Kontrolle der Organbildung in der peripheren Zone	9
1.3.3.1	<i>MGOON</i>	10
1.3.4	Blattsymmetrie und Organbildung	10
1.3.4.1	<i>PHABULOSA</i>	10
1.3.4.2	<i>ASYMMETRIC LEAVES</i>	11
1.4	Zielsetzung der Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Verwendete Materialien	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Enzyme	13
2.1.3	Häufig verwendete Puffer und Medien	13
2.1.4	Bakterienstämme	13
2.1.5	Vektoren	13
2.1.6	Oligonukleotide	15
2.1.7	Verwendete Pflanzenlinien	16
2.1.8	Programme zur elektronischen Datenverarbeitung	16
2.2	Genetische Methoden	16
2.2.1	Pflanzenanzucht	16
2.2.2	<i>In planta</i> -Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17

2.3	Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	17
2.3.1.1	Präparation von Plasmid DNA	17
2.3.1.2	Präparation genomischer DNA	17
2.3.1.3	Präparation von RNA	18
2.3.1.4	cDNA Synthese	18
2.3.1.5	Gelelektion von DNA-Fragmenten	18
2.3.2	Molekularbiologische Standardmethoden	18
2.3.3	Konstruktion der verschiedenen Plasmide	18
2.4	Zytologische und histologische Techniken	21
2.4.1	Präparation von Embryonen	21
2.4.2	Nicht-radioaktive-RNA- <i>in situ</i> Hybridisierung	21
2.4.3	Nachweis der β -Glukuronidase Aktivität	21
2.4.3.1	Fluorometrischer Nachweis	21
2.4.3.2	<i>In-situ</i> - β -Glukuronidase Färbereaktionen (GUS-Färbung)	22
2.4.4	Immunohistologischer Proteinnachweis	22
2.4.5	Ballistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen	23
2.4.6	Transiente Transfektion von BY2-Tabak-Protoplasten	23
2.5	Mikroskopische Techniken	24
2.5.1	Nomarsky-Mikroskopie	24
2.5.2	Konfokale Mikroskopie	24
3	ERGEBNISSE	25
Teil I:	Untersuchungen zur Funktion von <i>CLV3</i> im SAM	25
3.1	Wirkt <i>CLV3</i> zellautonom ?	25
3.1.1	Periklinale Chimären: <i>CLV3</i> -Expression in einzelnen Zellagen gewährleistet eine normale Meristemfunktion	25
3.1.2	Immunolokalisierung: In welchen Zellen ist das <i>CLV3</i> -Protein nachweisbar ?	28
3.1.3	Ist die putative Signalsequenz verantwortlich für eine Sekretion von <i>CLV3</i> ?	29
3.1.3.1	Ballistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen	29
3.1.3.2	Transiente Transfektion von BY2-Protoplasten	30
3.2	Konstitutive <i>CLV3</i> Expression: Sind Intensität und Ort der <i>CLV3</i> Expression relevant für die Kontrolle der meristematischen Aktivität ?	31
3.2.1	35S:: <i>CLV3</i> : Das Meristem der transgenen Pflanzen verliert frühzeitig seine Aktivität	32
3.2.2	<i>HisH4</i> :: <i>CLV3</i> : Transgene Pflanzen zeigen einen Phänotyp wie 35S:: <i>CLV3</i> -Pflanzen	35
3.2.3	<i>UFO</i> :: <i>CLV3</i> : <i>CLV3</i> -Expression unterhalb der zentralen Zone führt zum Verlust meristematischer Aktivität	37

3.2.4	<i>CLV3</i> reprimiert die Expression von <i>WUS</i>	39
3.2.5	<i>CLV3</i> -Dosis bestimmt die Anzahl an Stammzellen	43
3.2.6	<i>CLV3</i> wirkt über den <i>CLV1/2</i> -Rezeptorkomplex	46
3.2.7	<i>35S::CLV3</i> in <i>pol</i> Mutanten: <i>35S::CLV3</i> zeigt einen neuen Phänotyp in <i>pol</i> Mutanten....	48
3.2.8	<i>35S::CLV3</i> in <i>stm</i> Mutanten: <i>stm</i> verstärkt den <i>35S::CLV3</i> -verursachten Phänotyp.....	49
3.3	Zusammenfassung Teil I: Die Funktion von <i>CLV3</i>	50
Teil II: Regulation der <i>CLV3</i> -Expression durch meristemspezifische Gene		51
3.4	Etablierung eines <i>CLV3</i> -Reportergens.....	51
3.5	Expressionsstudien: Kontrolliert <i>WUS</i> die Expression von <i>CLV3</i> ?.....	54
3.5.1	<i>WUS</i> ist nur während der Embryogenese für die <i>CLV3</i> Expression essentiell	54
3.5.2	<i>WUS</i> verstärkt <i>CLV3</i> Expression nur im Meristem	55
3.6	Expressionsstudien: Kontrolliert <i>STM</i> die Expression von <i>CLV3</i> ?.....	58
3.6.1	<i>STM</i> ist nicht essentiell für die Aktivierung von <i>CLV3</i>	58
3.6.2	<i>STM</i> aktiviert <i>CLV3</i> nicht in der gesamten Pflanze	60
3.6.3	<i>WUS</i> ist in <i>35S::STM-GR</i> Pflanzen nicht ektopisch exprimiert	63
3.6.4	<i>STM</i> kann auch in <i>wus</i> -Mutanten <i>CLV3</i> -Expression aktivieren	64
3.6.5	Koexpression von <i>STM-GR</i> und <i>WUS-GR</i> : <i>STM</i> und <i>WUS</i> können gemeinsam <i>CLV3</i> - Expression in Blättern aktivieren.....	65
3.7	Expressionsstudien: Welche weiteren meristemspezifischen Gene kontrollieren die <i>CLV3</i> - Expression ?.....	67
3.7.1	<i>CLV3</i> -Expression fehlt in <i>cuc1/cuc2</i> -Doppelmutanten.....	67
3.7.2	<i>PNH</i> ist während der Embryogenese für die Expression von <i>CLV3</i> essentiell.....	68
3.7.3	<i>CLV3</i> ist in <i>mgo</i> -Mutanten im wildtypischen Muster exprimiert	70
3.7.4	<i>CLV3</i> ist in den Adventivmeristemen von <i>phb</i> Mutanten wildtypisch exprimiert.....	70
3.7.5	<i>CLV3</i> ist in <i>as1</i> -Mutanten wildtypisch exprimiert.....	71
3.8	Zusammenfassung Teil II: Die Kontrolle der <i>CLV3</i> Expression im Meristem.....	73
Teil III: Regulation von <i>CLV3</i> durch eigene regulatorische Sequenzen		73
3.9	Deletionsanalyse: Welche regulatorischen Elemente sind für die Expression von <i>CLV3</i> essentiell ?.....	73
3.9.1	Ergebnisse der Deletionsanalysen der regulatorischen Sequenzen von <i>CLV3</i>	75
3.9.2	Aktivierbarkeit der <i>CLV3</i> -Deletionsderivate durch <i>WUS</i> und <i>STM</i>	80
3.10	Zusammenfassung Teil III: Wesentliche regulatorische Elemente zur Kontrolle von <i>CLV3</i> ...	82

4	DISKUSSION	84
	Teil I: Die Funktion von <i>CLV3</i> im SAM.....	84
4.1	<i>CLV3</i> wirkt nicht-zellautonom als Signalmolekül im Meristem.....	84
4.2	<i>CLV3</i> reguliert das Stammzellschicksal durch die Repression von <i>WUS</i>	85
4.3	<i>CLV3</i> ist feedback reguliert	88
4.4	Welche anderen Faktoren spielen in der <i>CLV</i> -Signaltransduktion eine Rolle?	90
	Teil II: Regulation der <i>CLV3</i> -Expression durch meristemspezifische Gene	91
4.5	<i>WUS</i> verstärkt die Expression von <i>CLV3</i> im Meristem	91
4.6	<i>STM</i> ist nicht essentiell für die Aktivierung von <i>CLV3</i>	93
4.7	Koexpression von <i>WUS-GR</i> und <i>STM-GR</i> und der Einfluß auf <i>CLV3</i>	94
4.8	Welche anderen meristemspezifischen Gene kontrollieren die Expression von <i>CLV3</i> ?	95
	Teil III: Regulation von <i>CLV3</i> durch eigene regulatorische Sequenzen.....	97
4.9	Welche der regulatorischen Elemente kontrollieren die Expression von <i>CLV3</i> ?	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	LITERATUR	103

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA (complementary)
DAB	Diaminobenzidin
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E.coli	Escherichia coli
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten-RNA (messenger)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SAM	Sproßapikalmeristem
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
UV	ultraviolette Strahlung
h	Stunde
RT	Raumtemperatur
min	Minute
üN	über Nacht

1 Einleitung

Bei Pflanzen erfolgt die entwicklungsbedingte Musterbildung der Organe während des gesamten Lebenszyklus hindurch. Das postembryonale Wachstum vollzieht sich in den sogenannten Meristemen, aus denen alle Strukturen wie Blätter, Internodien, Blüten und Wurzeln hervorgehen. Meristeme sind kleine Gruppen undifferenzierter und totipotenter Zellen, die an der Sproß- und Wurzelspitze lokalisiert sind und während der gesamten Lebensdauer aufrechterhalten werden. Im späteren Entwicklungsstadium leiten sich Blüten- und Achselmeristeme aus dem Sproßmeristem ab.

1.1 Organisation des pflanzlichen Meristems

Oberflächlich gesehen erscheint das Meristem der Angiospermen als homogene Zellgruppe. Es besteht jedoch aus einer sehr komplexen Struktur, die in Regionen mit unterschiedlichen Funktionen und Zellschicksalen unterteilt ist. In einer ersten Organisationsebene ist das Meristem in eine äußere Tunica- und eine innere Corpus-Schicht unterteilt, die sich aus verschiedenen Zellschichten bilden. Die Tunica umfasst in vielen Spezies die äußere L1 sowie die darunterliegende L2, während der Corpus aus der L3 besteht (Satina et al., 1940; Steeves und Sussex, 1989; Vaughan, 1952).

Die Zellen der L1 teilen sich während der gesamten Entwicklung antiklin – d.h. die Zellteilungsebene liegt senkrecht zur Schicht, so daß die Tochterzellen in derselben Schicht verbleiben. In der L3 finden die Zellteilungen hingegen in allen Ebenen statt. Im Gegensatz zu L1 und L3 teilen sich die Zellen der L2 anfangs ausschließlich antiklin, später bei der Entwicklung der Organe dann aber auch periklin. Das Resultat dieser Zellteilungsebenen ist, daß alle drei Zellschichten klonal sind, die Organisationsstruktur der Schichten erhalten bleibt und trotzdem die Zellen aller Schichten an der Organbildung beteiligt sind (Satina et al., 1940).

Das Schicksal der Zellen in jeder Zellschicht konnte mit Hilfe von pflanzlichen Chimären, die aus Zellen zweier verschiedener Genotypen bestehen, analysiert werden. Die Analysen zeigten, daß sich die Zellen der L1 zu epidermalen Strukturen und die der L2 zum subepidermalen Mesophyll und den Gameten differenzieren. Die Zellen der L3 bilden das Grundgewebe und das vaskuläre System (Satina and Blakeslee, 1941 und 1943; Stewart und Burk, 1970; Dermen und Stewart, 1973).

Eine weitere Organisationsebene ist die Einteilung des Meristems in eine zentrale Zone in der Mitte des meristematischen Domes sowie in eine flankierende Region, die sogenannte periphere Zone. Die beiden Zonen, die jeweils aus allen drei klonalen Zellschichten bestehen, unterscheiden sich in ihren Zellteilungsraten. In der zentralen Zone finden Zellteilungen seltener statt als in der umgebenden peripheren Zone (Steeves und Sussex, 1989). Darüberhinaus befindet sich in der zentralen Zone ein Reservoir an totipotenten Stammzellen, das während des gesamten Lebenszyklus der Pflanze aufrechterhalten wird. Durch die kontinuierliche Teilung der Stammzellen in der zentralen Zone gelangen die Tochterzellen in die periphere Zone und differenzieren sich dort. Alle Organe und Blütenmeristeme entstehen folglich in der peripheren Zone, während in der zentralen Zone keine Organbildung stattfindet.

Die Zellen im Meristem sind wie auch in anderen pflanzlichen Geweben untereinander durch Plasmodesmata verbunden, die einen kontrollierten Stoffaustausch erlauben. Zellverbände, die auf diese Weise miteinander in Kontakt stehen, werden als Symplasten bezeichnet. Durch Mikroinjektionen von Fluoreszenzfarbstoffen in die äußeren Zellschichten von Birkenmeristemen konnte die Kompartimentierung des Sproßapikalmeristems (SAM) in ein zentrales und ein peripheres symplastisches Feld als eine dritte Organisationsebene sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff verblieb in dem jeweiligen Symplasten (Rinne und van der Schoot, 1998).

Ähnliche Experimente in *Arabidopsis* (Gisel et al., 1999) bestätigten ebenfalls, daß das SAM eine hoch organisierte Struktur ist, in der Signale innerhalb und zwischen den symplastischen Feldern zur Koordinierung morphogenetischer Ereignisse und der Erhaltung des Meristems dienen können.

Vor der Blütenbildung wandelt sich das vegetative Sproßapikalmeristem in das Infloreszenzmeristem und bringt in *Arabidopsis* eine Reihe von Blütenmeristemen hervor, die jeweils eine Einzelblüte bilden. Wie bei den meisten dikotylen Pflanzen besteht eine *Arabidopsis*-Blüte aus vier verschiedenen Blütenorganen, die in vier konzentrischen Wirteln angeordnet sind: je vier Sepalen und Petalen, sechs Stamen und zwei fusionierte Karpelle werden in der peripheren Zone eines Blütenmeristems gebildet.

1.2 Pflanzliche Stammzellen befinden sich in den Meristemen

Pflanzen können im Vergleich zum Tier ein deutlich höheres Lebensalter erreichen und befinden sich dabei in einem ständigen Wachstumsprozess. Sie bilden während ihrer gesamten Lebenszeit kontinuierlich und wiederkehrend neue Organe wie Blätter und Blüten, so daß auch nach starken Beschädigungen ein Überleben gesichert ist. Voraussetzung dafür ist, daß sie in der gesamten Zeit eine Population an undifferenzierten Zellen – die sogenannten Stammzellen - aufrechterhalten. Bei einer Stammzelle handelt es sich um eine undifferenzierte Zelle, die sich einerseits selbst reproduzieren kann, um damit ihren undifferenzierten Status aufrecht zu erhalten (Morrison et al., 1997). Zum anderen hat sie aber auch die Möglichkeit, durch Teilung einen oder mehrere verschiedene differenzierte Zelltypen zu generieren.

Stammzellen, die das komplette Spektrum an Zelltypen eines Organismus erzeugen können, werden als totipotent bezeichnet. In den meisten tierischen Organismen trifft das lediglich für die Zygote und deren unmittelbaren Nachkommen zu. Die Stammzellen im adulten Säugetier hingegen sind pluripotent und können, wie z.B. die blutbildenden Zellen im Knochenmark, nur noch ein bestimmtes Spektrum an Zelltypen hervorbringen. Anders ist die Situation in der Pflanze: Hier sind nicht nur die Stammzellen totipotent, sondern auch die meisten bereits differenzierten Zellen. Während der gesamten Lebensdauer einer Pflanze können aus kleinen Gewebestückchen oder sogar aus einzelnen Zellen komplette Pflanzen regeneriert werden (Weigel und Jürgens, 2002).

Pflanzliche Stammzellen befinden sich im Zentrum des Sproß- und des Wurzelmeristems. Sie teilen sich langsam und bringen zwei verschiedene Typen an Tochterzellen hervor. Die Zellen, die im Zentrum verbleiben, halten die Stammzellpopulation aufrecht. Demgegenüber differenzieren sich Tochterzellen, die in die Peripherie abgegeben werden, zu wurzel- oder sproß-spezifischen Zellen und zu Organen wie Blätter oder sekundäre Meristeme.

Eine charakteristische Eigenschaft pflanzlicher Stammzellen ist somit, daß sie klar über ihre Position im Meristem definiert sind (Weigel und Jürgens, 2002). Obwohl das auch für einige tierische Stammzellen z.B. in den Gonaden von Fruchtfliege oder Nematoden gilt (Watt und Hogan, 2000), lassen sich tierische Stammzellen normalerweise nur über molekulare Marker in einer Population morphologisch gleichartiger Zellen nachweisen. Trotzdem ist es aber auch für tierische Stammzellen entscheidend, in welchem direkten Umfeld sie sich befinden.

Tierische Stammzellen haben sich in der letzten Zeit als weit vielseitiger herausgestellt als erwartet. Entgegen der traditionellen Sichtweise einer "Einbahnstraße", bei der Stammzellen ihre Toti- bzw. Pluripotenz abrupt verlieren und für immer spezifiziert sind, können sich tierische Zellen auch aus einem bereits differenzierten Zustand wieder in Stammzellen zurückverwandeln (Blau et al., 2001). Diese Möglichkeit verlieren sie mit der Zeit nur langsam. Insbesondere in pflanzlichen Stammzellen ist es nicht ungewöhnlich, daß komplett differenzierte Zellen wieder zu Stammzellen revertieren (Weigel und Jürgens, 2002). So können beispielsweise aus pflanzlichen Suspensionskulturen somatische Embryonen gewonnen werden.

1.3 Wichtige meristemspezifische Gene und deren Mutanten in *Arabidopsis*

Wie bereits erwähnt ist das pflanzliche Sproßmeristem eine hoch organisierte Struktur, die während der gesamten Lebensdauer der Pflanze stabil erhalten werden muß. Hierzu ist es notwendig, daß im Meristem eine exakte Balance zwischen der Teilungsrate der Stammzellen in der zentralen Zone und der Zelldifferenzierung in der peripheren Zone aufrechterhalten wird. Mittlerweile sind zahlreiche Gene bekannt, die auf unterschiedliche Weise in diesen Prozess involviert sind. Im Folgenden soll auf die Funktion derjenigen Gene näher eingegangen werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert wurden. Die Gene wurden ausgewählt, weil sie mit Beginn der Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit *CLAVATA3 (CLV3)* in der Literatur diskutiert wurden und entsprechende Mutanten zur Verfügung standen.

Die mutanten Phänotypen dieser Gene lassen sich hierbei in verschiedene Klassen einteilen und ermöglichen Hinweise auf die wildtypische Genfunktion.

Die erste Klasse an Mutanten, die *clavata*-Mutanten (*clv*), akkumulieren Zellen in der zentralen Zone und haben in Folge dessen ein stark vergrößertes Sproßmeristem. Im Gegensatz dazu sind für eine zweite Klasse Mutanten charakteristisch, denen ein funktionsfähiges Sproßmeristem fehlt bzw. bei denen es nicht aufrecht erhalten werden kann. Dazu gehören *wuschel/(wus)*- und *shoot meristemless/(stm)*-Mutanten sowie *cup shaped cotyledon-1*- und *cup shaped cotyledon-2/ (cuc1/cuc2)*-Doppelmutanten. Nicht ganz eindeutig in diese Klasse gehören *poltergeist/(pol)*- Mutanten, die als Einzelmutante nahezu wildtypisch sind, aber den *clv* mutanten Phänotyp suprimieren. Auch *pinhead/(pnh)*-Mutanten zeigen während der Embryogenese einen Funktionsverlust des Meristems. Einen dritter Typ stellen *mgoun/(mgo)*-Mutanten dar, die mit einer vergrößerten peripheren Zone eine veränderte Struktur im SAM aufweisen. Als Mutanten mit Defekten der adaxialen/abaxialen Blattsymmetrie und der Organbildung wurden hier *phabulosa (phb)* und *asymmetric leaves1 (as)* ausgewählt.

1.3.1 Repression von meristematischem Schicksal

1.3.1.1 CLAVATA

Zu Beginn dieser Untersuchungen waren in *Arabidopsis* bereits alle drei *CLAVATA*-Gene beschrieben: *CLAVATA1* (Leysner and Furner, 1992; Crone und Lord, 1993; Clark et al. 1995), *CLAVATA2* (Kayes et al. 1998) und *CLAVATA3* (Clark et al., 1995).

Der Phänotyp von *clv1*-Mutanten ist schon im Embryo sichtbar. Sie zeigen ein im Vergleich zum Wildtypen signifikant vergrößertes Sproßmeristem (Running et al., 1995). In der weiteren Entwicklung der Pflanze kann sich das Sproßmeristem volumenmäßig bis zur 1000-fachen Größe des Wildtypen vergrößern und stark faszieren. Die Meristemvergrößerung in *clv1*-Mutanten ist auf eine Akkumulation von undifferenzierten Zellen oder Stammzellen in der zentralen Zone zurückzuführen. Mikroskopisch deutlich sichtbar ist im Vergleich zum Wildtypen, daß in Meristemen von *clv1*-Pflanzen nur die zentrale Zone massiv vergrößert ist. Diese ist anhand der fehlenden Organbildung leicht zu identifizieren. (Clark et al. 1993). Die Entwicklung der peripheren Zone, in der die Organe normal ausdifferenzieren, ist hingegen nicht betroffen. Auch in den Blütenmeristemen kommt es durch die größere Anzahl undifferenzierter Zellen zur Bildung zusätzlicher Blütenorgane. Namensgebend sind hierbei die auffälligen Schoten der *clavata*-Mutanten, die durch Fusion zusätzlicher Karpelle ein keulenförmiges Aussehen erhalten (lat. *clava* = Keule). Das Wurzelmeristem ist in seiner Entwicklung nicht beeinträchtigt.

Mutationen im *CLV3*-Gen führen zu identischen Phänotypen wie in *CLV1* (Clark et al. 1995). Zudem unterscheiden sich die Phänotypen von *clv1/clv3*-Doppelmutanten nicht von starken *clv1*- bzw. *clv3*-Einzelmutanten, so daß vermutet wurde, daß beide Gene in einem gemeinsamen Prozess wirken. Diese Hypothese wurde auch dadurch bestätigt, daß Pflanzen, die sowohl heterozygot für *clv3* als auch *clv1* sind, einen starken mutanten Phänotyp aufweisen, obwohl beide Mutationen für sich genommen nur schwach semidominant bzw. rezessiv sind.

Mutationen in dem dritten Locus *CLV2* zeigen Phänotypen wie schwächere *clv1*- und *clv3*-mutante Allele. In Doppelmutantenanalysen erwiesen sich *clv1* und *clv3* als epistatisch über *clv2* (Kayes und Clark, 1998). Im Unterschied zu den anderen *CLV*-Genen schien *CLV2* außerdem nicht nur zusammen mit *CLV1* und *CLV3* zu wirken, sondern in Abhängigkeit zur Tageslänge zusätzlich eine Funktion in der Blütenentwicklung zu haben.

Die wildtypische Funktion der *CLV*-Gene wäre demnach eine negative Regulation der Anzahl an Stammzellen in der zentralen Zone. Hierzu wurden zum damaligen Zeitpunkt zwei mögliche Modelle diskutiert, um die Rolle der *CLV*-Gene bei der Regulation der Meristemgröße zu erklären (Clark et al., 1997). Beide Modelle legen zugrunde, daß die Anzahl an Stammzellen durch Zellteilung und Zelldifferenzierung bestimmt wird. Eine mögliche Erklärung war demnach, daß sich die Zellen der zentralen Zone in *clv* Mutanten schneller teilen als im Wildtyp und folglich akkumulieren. Die wildtypische Funktion der *CLV*-Gene wäre also eine Repression der Zellteilung in der zentralen Zone. Diese Hypothese konnte von Laufs et al. (1998) widerlegt werden. Die Autoren zeigten, daß der mitotische Index in der zentralen Zone des Meristems von Wildtypen und *clv*-Mutanten identisch war.

Demnach fördern die *CLV*-Gene den Übergang der undifferenzierten Zellen aus der zentralen Zone in den differenzierten Status und damit in die periphere Zone, so daß in *clv*-Mutanten die undifferenzierten Stammzellen in der zentralen Zone akkumulieren.

Zu Beginn dieser Arbeit war außerdem die molekulare Struktur von *CLV1* bekannt (Clark et al., 1997). Hierbei handelt es sich um ein Protein mit großer Sequenzähnlichkeit zu Transmembran-Rezeptorkinasen, die unter anderem in der pflanzlichen Pathogenerkennung und Pathogenresistenz eine Rolle spielen (Song et al., 1995). *CLV1* besteht zum einen aus einer extrazellulären Domäne die sich aus wiederholenden Leucin-reichen Motiven zusammensetzt und für eine Interaktion von Rezeptor und Ligand sorgen könnte. Ein weiterer Bestandteil ist eine intrazelluläre Protein-Kinase-Domäne. Biochemische Untersuchungen konnten zeigen, daß diese vermutlich intrazelluläre Domäne an Serinresten autophosphoryliert und mit der Proteinphosphatase KAPP interagiert (Stone et al. 1997). Zusammen mit den aus der Analyse von Doppelmutanten gewonnenen Daten wies dies darauf hin, daß *CLV1* Teil eines neuen Signaltransduktionsweges ist. Es wurde vermutet, daß *CLV1* als Rezeptorkinase extrazellulär registrierte Signale an bestimmte Zellen im SAM weitergibt. *CLV1* ist sehr spezifisch in der zentralen Region im SAM in der L3 exprimiert (Clark et al., 1997).

Laborintern war zu Beginn dieser Arbeit auch die Sequenz von *CLV3* bekannt. *CLV3* kodiert ein kleines Protein von 96 Aminosäuren mit einer aminoterminalen Signalsequenz, von der damals nach Datenbankanalysen vermutet wurde, daß es für die Direktion des Proteins in den sekretorischen Stoffwechselweg verantwortlich sein könnte. Erste mRNA *in situ* Hybridisierungen zeigten, daß *CLV3* in den Zellen der zentralen Zone in L1-L3 exprimiert wird. In *clv*-Mutanten ist die *CLV3*-Expressionsdomäne entsprechend der akkumulierten Stammzellen in der zentralen Zone stark vergrößert.

Da das Gen *CLV3* im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, soll der gegenwärtige wissenschaftliche Stand zum gesamten *CLV*-Signaltransduktionsweg in Kap. 4.1-4.4 zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ausführlich diskutiert werden.

1.3.2 Bildung und Aufrechterhaltung eines funktionalen Meristems

Gene wie *WUS*, *STM*, *CUC*, *POL* und *PNH* stehen im direkten Zusammenhang mit der Etablierung und Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen SAM. Bei einer Mutation kommt es folglich zu unterschiedlichen Verlusten an meristematischer Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit sollen sie deshalb auf eine mögliche Interaktion mit *CLV3* hin analysiert werden.

1.3.2.1 WUSCHEL

Das Gen *WUSCHEL* (*WUS*) ist sowohl für die embryonale Etablierung als auch für die Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation in der zentralen Zone des SAM notwendig. In homozygoten, *wus*-mutanten Embryonen fehlt das SAM komplett. In der weiteren Entwicklung der Pflanze werden dann zwar Adventivmeristeme gebildet, die jedoch nur wenige Blätter - häufig als Luftrosetten - bilden

und verfrüht terminieren (Laux et al., 1996). Histologisch läßt sich feststellen, daß zum einen die mutanten Meristeme abgeflacht sind, zum anderen die Stammzellen in der zentralen Zone vergrößert und differenziert wirken. In seltenen Fällen werden auch Blütenmeristeme gebildet, aus denen Blüten hervorgehen, deren Organe im dritten und vierten Wirtel ganz oder teilweise fehlen. *wus*-Mutanten können postembryonal also grundsätzlich Meristeme initiieren, sie jedoch im weiteren Verlauf der Entwicklung nicht funktionsfähig aufrechterhalten. *WUS* ist somit notwendig zur Aufrechterhaltung einer Population an totipotenten Stammzellen im Meristem.

Das Gen *WUS* kodiert ein kern-lokalisiertes Homeodomänen-Protein, das wahrscheinlich als Transkriptionsfaktor wirkt (Mayer et al., 1998). Die Expression von *WUS* ist zum erstenmal im 16-Zell-Embryo-Stadium in den inneren Zellen im apikalen Bereich detektierbar, also noch vor Sichtbarwerden eines organisierten Meristems (Mayer et al., 1998). Im reifen Embryo und in der postembryonalen Phase wird *WUS* in wenigen Zellen im Meristemzentrum in der tiefen L3 exprimiert.

In Analysen von *wus/clv1-4*-Doppelmutanten konnte gezeigt werden, daß *wus*-Mutanten epistatisch über *clv*-Mutanten sind (Laux et al., 1996). Die Daten ließen also schon den Schluß zu, daß *CLV1* entweder die Aktivität von *WUS* reguliert oder daß *WUS* zur Etablierung der undifferenzierten Zellen, in denen *CLV1* wirkt notwendig ist. Der gegenwärtige Stand der Forschung zur Interaktion zwischen den *CLV*-Genen und *WUS* wird in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen in Kap.4.2-4.4 detailliert diskutiert.

1.3.2.2 SHOOT MERISTEMLESS

Auch das Gen *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) ist notwendig für die Etablierung des embryonalen SAM und die Aufrechterhaltung meristematischer Aktivität in der späteren Entwicklung. In homozygoten *stm* mutanten Embryonen kann die Tunica/Corpus-Organisation des SAM nicht etabliert werden (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). Im reifen *stm*-Embryo läßt sich der mutante Phänotyp eindeutig identifizieren, da die apikalen Zellen differenziert sind und das SAM komplett fehlt. Im *stm*-Keimling sind die Kotyledonen an der Basis fusioniert und die Pflanze bildet zunächst keine Blätter. In der weiteren Entwicklung werden dann - ähnlich wie in *wus*-Mutanten - Adventivmeristeme gebildet, die ebenfalls nur wenige Organe bilden und dann ihre Funktion wieder einstellen. Die selten gebildeten Blüten in schwachen Allelen haben eine reduzierte Anzahl innerer Organe, während das Wurzelmeristem in *stm*-Mutanten in seiner Entwicklung nicht beeinträchtigt ist.

STM kodiert ein Protein mit einer DNA-bindenden-Homeoboxdomäne, die dem *KNOTTED1*-Gen von Mais ähnlich ist. Es wirkt als putativer Transkriptionsfaktor und ist notwendig zur SAM-Entwicklung (Long et al., 1996). Mitglieder der *KNOTTED1*-Genfamilie (*KNOX*-Gene) werden im Sproß exprimiert und sind normalerweise nur im meristematischen Gewebe aktiv, nicht jedoch in den sich entwickelnden Blättern. Die Expression von *STM* ist erstmalig nachweisbar in wenigen Zellen im globulären Embryo (Long et al., 1996; Long und Barton, 1998). Vom frühen Herzstadium an wird *STM* dann zwischen den präsumptiven Kotyledonen im SAM exprimiert. Auch in der weiteren Entwicklung ist *STM* im gesamten SAM mit Ausnahme der Organprimordien detektierbar.

Wie genau die Regulationsmechanismen von *CLV* und *STM* im SAM interagieren, um dessen Bildung und Aufrechterhaltung zu gewährleisten, ist zur Zeit nicht eindeutig geklärt. Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß *CLV* und *STM* antagonistische Rollen in der Meristementwicklung haben. Es besteht jedoch keine klare Epistasiebeziehung zwischen *CLV* und *STM*. Mutationen in *WUS* verstärken schwache *stm*-Mutanten, während starke *stm*-Allele epistatisch über *wus* sind (Endrizzi et al., 1996). Das legt nahe, daß beide Gene unabhängig voneinander in verschiedenen Regulationsmechanismen wirken. *WUS*-Expression wird in *stm*-Mutanten korrekt aktiviert, geht aber in späteren embryonalen Stadien wieder verloren (Mayer et al., 1998). Zudem wird *WUS* in der wildtypischen Embryogenese früher aktiviert als *STM* (Long und Barton, 1998; Mayer et al., 1998). Dies indiziert, daß die Interaktion zwischen *CLV*, *WUS* und *STM* kein einfacher linearer Mechanismus ist.

Genetische und molekulare Analysen zeigten, daß *STM* in der zentralen Zone des Meristems notwendig ist, um Zelldifferenzierung zu verhindern und ein SAM-spezifisches Programm zu initiieren (Long und Barton, 1998). Dies geschieht auch durch Repression organspezifischer Myb-Gene wie *ASI* (Byrne et al., 2000). In den Primordien der peripheren Zone ist *STM* reprimiert und es kommt zur Organbildung.

1.3.2.3 CUP SHAPED COTYLEDON

Neben *WUS* und *STM* sind auch die beiden Gene *CUP-SHAPED-COTYLEDON-1* (*CUC1*) und *CUP-SHAPED-COTYLEDON-2* (*CUC2*) für die Etablierung eines funktionsfähigen embryonalen Meristems notwendig und damit auch im Zusammenhang mit *CLV3* möglicherweise relevant. In *cuc1/cuc2*-Doppelmutanten fehlt das SAM und die Pflanzen weisen lediglich zwei an der Basis becherförmig fusionierten Kotyledonen auf, die namensgebend für die Mutante sind (Aida et al., 1997). *cuc1*- und *cuc2*-Einzelmutanten hingegen sehen, abgesehen von vereinzelt einseitig fusionierten Kotyledonen im Keimling, nahezu wildtypisch aus. In den Blüten der Einzelmutanten sind zudem häufig die Sepalen und die Stamen miteinander fusioniert (Aida et al., 1997). Außerdem ist *CUC1* in *cuc2*-Mutanten exprimiert und umgekehrt. Daraus folgt, daß *CUC1* und *CUC2* als funktionell-redundante Gene wirken und für die embryonale Etablierung des SAM notwendig sind.

Beide Gene kodieren zwei homologe Proteine, die eine starke Ähnlichkeit zum NAM-Protein von *Petunia* aufweisen. NAM ist für die Blütenorganentwicklung, die Trennung der Kotyledonen sowie die embryonale SAM Bildung verantwortlich (Souer et al., 1996). Im N-terminalen Bereich aller drei Proteine ist die sogenannte NAC-Domäne als ein hoch-konservierter Bereich zu finden. Proteine mit einer solchen NAC-Domäne bilden eine große Familie, die bisher nur in Pflanzen gefunden wurde und nahelegt, daß ihnen eine Schlüsselfunktion während der pflanzlichen Entwicklung zukommt (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001).

CUC1 und *CUC2* zeigen im Embryo nahezu identische Expressionsmuster. *CUC1* mRNA wird in wenigen Zellen des präsumptiven SAM schon im globulären Embryo und *CUC2* im späten globulären Embryo in der gleichen Domäne exprimiert (Aida et al., 1999). Im Übergang vom globulären zum herzförmigen Embryo sind beide Gene zwischen den präsumptiven Kotyledonen und dem SAM exprimiert. Dieses Expressionsmuster bleibt auch in den späteren Stadien bestehen.

Die Expressionsdomänen von *CUC1* und *CUC2* überschneidet sich mit der Domäne von *STM*. Zudem ist *STM* nicht in *cuc1/cuc2*-mutanten Embryonen exprimiert, wohingegen sich sowohl *CUC1* als auch *CUC2* mRNA in *stm*-mutanten Embryonen nachweisen läßt (Takada et al., 2001). Das weist darauf hin, daß *CUC1* und *CUC2* früher als *STM* wirken und für dessen Expression notwendig sind. Die ektopische Expression von *CUC1* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors führt auch in Abwesenheit von *CUC2* zur ektopischen Aktivierung von *STM*. Daraus läßt sich schließen, daß *CUC1* alleine *STM*-Expression aktivieren kann und somit ein positiver Regulator von *STM* ist. Ob diese Interaktion direkt oder indirekt ist, ist bislang nicht geklärt.

1.3.2.4 POLTERGEIST

Verschiedene Hinweise lassen vermuten, daß das Gen *POLTERGEIST* (*POL*) zusammen mit *WUS* für die Förderung des Stammzellschicksals verantwortlich sein könnte (Yu et al., 2000). *pol*-Mutanten konnten in einem genetischen Screen als rezessive Suppressoren des *clv3*- bzw. *clv1*-mutanten Phänotyps identifiziert werden. Hier wiesen *pol/clv*-Doppelmutanten deutlich weniger Stammzellen in den Sproß- und Blütenmeristemen auf als *clv*-Einzelmutanten. *pol*-Einzelmutanten hingegen sind kaum vom Wildtypen zu unterscheiden. Außerdem verstärkt *pol* den *wus*-mutanten Phänotyp. Diese Ergebnisse legen nahe, daß *POL* meristematisches Zellschicksal fördert und redundant mit *WUS* - möglicherweise als ein Zielgen des *CLV* Signaltransduktions-Wegs - agiert.

1.3.2.5 PINHEAD

Das Gen *PINHEAD/ZWILLE* – bei beiden Bezeichnungen handelt es sich um dasselbe Gen - ist im embryonalen SAM für die Aufrechterhaltung der undifferenzierten Stammzellpopulation notwendig (Jürgens et al., 1994; McConnell und Barton, 1995; Endrizzi et al., 1996). Generell zeigen *pnh*-Mutanten einen sehr pleiotropen Phänotyp (Lynn et al., 1999). Bei der phänotypischen Analyse *pnh*-mutanter Embryonen finden sich zum einen Pflanzen mit einem mikroskopisch wildtypisch aussehenden SAM und zum anderen Embryonen mit einem abgeflachten SAM. Ein dritter Teil der Embryonen ist völlig abnorm verkleinert und mit komplett fusionierten Kotyledonen nicht zur Keimung fähig. Im nachfolgenden Keimlingstadium sieht wiederum ein Teil der Mutanten wildtypisch aus, alle anderen zeigen außer den Kotyledonen lediglich ein endständiges Primärblatt oder eine filamentartige Struktur anstelle des eigentlichen SAM. Im Alter von ca. 3 Wochen initiieren dann auch diese Pflanzen Adventivmeristeme, die völlig wildtypisch oder fasziiert sein können. Ein weiterer Effekt ist in den Blüten zu beobachten, bei denen die Anzahl der Organe variiert und häufig überzählige, verkürzte Karpelle gebildet werden, so daß die Schoten an *clv*-Mutanten erinnern. Zudem kommt es zur partiellen Abaxialisierung der lateralen Organe. *PNH* ist somit zwar notwendig um Zelldifferenzierung im Zentrum des embryonalen Apex zu verhindern, spielt aber offensichtlich keine Rolle für die Bildung der postembryonalen Adventivmeristeme.

Das Genprodukt von *PNH* ist Teil einer Genfamilie, die in vielen Eukaryoten zu finden ist und zu der auch *ARGONAUTE1* (*AGO1*) gehört (Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999). *AGO1* ist in Blattentwicklung und Aufrechterhaltung des Meristems involviert (Bohmert et al., 1998). Hammond et al. (2001) identifizierten in *Drosophila* *AGO2* als weiteres Mitglied dieser Genfamilie. *AGO2* hat als eine Komponente des RISC-Komplexes (*RNA-induced silencing complex*) eine Funktion beim sogenannten PTGS (*postranscriptional gene silencing*). Ein weiteres Protein aus dieser Familie ist der Translations-Initiations Faktor *eIF2C* aus Kaninchen (Zou et al., 1998). *PNH* spielt somit möglicherweise eine Rolle bei der Translationskontrolle verschiedener Gene während der Entwicklung.

Während *PNH* embryonal nur im provaskulären Gewebe exprimiert wird, findet es sich im reifen Embryo zusätzlich im präsumptiven SAM (Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999). Im reifen Embryo ist *PNH* notwendig, um die wildtypische Expression von *STM* im Meristem aufrechtzuerhalten (Moussian et al., 1998). Das läßt zum einen vermuten, daß die Expression von *PNH* im embryonalen SAM zu diesem Zeitpunkt eine Verminderung der *STM*-Expression und eine daraus resultierende Differenzierung der meristematischen Zellen verhindert. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß *PNH* vom somatischen provaskulären Gewebe aus zu den darüberliegenden meristematischen Zellen signalisiert und so die Aufrechterhaltung der *STM*-Expression und der meristematischen Aktivität gewährleistet. Postembryonal spielt diese *PNH*-Funktion dann keine Rolle mehr bei der Aufrechterhaltung der meristematischen Funktion.

Cox et al. (1998) identifizierten das Gen *PIWI*, ein Homolog von *PNH* und *AGO*, dem eine entscheidende Funktion bei der Aufrechterhaltung von Stammzellen in *Drosophila* zukommt. *PIWI* ist hier notwendig zur Selbsterneuerung der Keimbahn-Stammzellen, die sich in *piwi*-mutanten Fliegen ausdifferenzieren. *PIWI* wird spezifisch in den sogenannten Filamentzellen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Keimbahnzellen exprimiert. Hier könnte also eine durch *PIWI* vermittelte Signaltransduktion zwischen somatischem Gewebe und Keimbahnzellen existieren.

Auch in *C. elegans* konnten die *PIWI*-Homologe *PRG-1* und *PRG-2* identifiziert werden, deren Funktionsverlust ebenfalls den Verlust von Keimbahnzellen zur Folge hat (Cox et al., 1998). Die Autoren vermuten in der Signalübertragung von differenziertem Gewebe zu den Stammzellen einen fundamentalen Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Stammzellen in Eukaryonten. Im Zusammenhang mit *CLV3* ist *PNH* besonders wegen dieser Stammzellen erhaltenden Funktion während der Embryogenese möglicherweise relevant.

1.3.3 Kontrolle der Organbildung in der peripheren Zone

Im Meristem wird sowohl der Übergang der Zellen von der zentralen in die periphere Zone, als auch die Bildung von Organprimordien genau reguliert. In diesen Prozess sind die sog. *MGOUN*-Gene involviert.

1.3.3.1 MGOUN

Die Gene *MGOUN1* (*MGO1*) und *MGOUN2* (*MGO2*) kontrollieren das Zellschicksal in der peripheren Zone des SAM. Vergleichbar mit *clv*-Mutanten zeigen ältere *mgo*-Mutanten ebenfalls ein fasziertes Sproßmeristem (Laufs et al. 1998). Im Gegensatz zu *clv*-Mutanten aber bilden *mgo*-Mutanten weniger laterale Organe als der Wildtyp und der faszierte Sproß entsteht durch vielfache Aufspaltung des ursprünglichen Apex in mehrere Meristeme. Im SAM *mgo*-mutanter Pflanzen akkumulieren Zellen in der peripheren Zone, weil Organprimordien nur in verminderter Anzahl gebildet werden. Die beiden *MGO*-Gene sind folglich notwendig, damit sich Zellen in der peripheren Zone tatsächlich zu Organprimordien differenzieren können (Laufs et al., 1998). Die Mutanten zeigen, daß nicht nur der Übergang der Zellen von der zentralen in die periphere Zone, sondern auch von dieser Zone bis zur Bildung von Organprimordien einer strengen Kontrolle unterliegt.

1.3.4 Blattsymmetrie und Organbildung

Blätter zeigen eine asymmetrische Verteilung verschiedener Zelltypen. Die adaxiale, dem Sproß zugewandte Seite ist darauf spezialisiert, Licht zur Photosynthese aufzunehmen, während die abaxiale Seite für den Gasaustausch zuständig ist. Das gleiche Symmetrie-Prinzip wird auch in Kotyledonen und Blütenorganen beobachtet.

Verschiedene Hinweise lassen eine Interaktion zwischen SAM und adaxialer Identität vermuten. Eines der Gene, das adaxiales Zellschicksal kontrolliert, *PHABULOSA* (*phb*), soll im folgenden exemplarisch dargestellt werden.

Auch für ein Gen, das generell in die Organbildung involviert ist, konnte ein Zusammenhang mit meristemspezifischen Genen gezeigt werden (Byrne et al. 2000). Die Gene, *ASYMMETRIC LEAVES1* (*ASI*) und *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*), könnten somit für die Regulation von *CLV3* relevant sein. Sie werden in Kapitel 1.3.4.2 erläutert.

1.3.4.1 PHABULOSA

In *Arabidopsis* konnten drei verschiedene Genfamilien identifiziert werden, die adaxiales bzw. abaxiales Organschicksal fördern (McConnell et al., 2001; Eshed et al., 1999; Kerstetter et al., 2001; Eshed et al., 2001). Eine dieser Genfamilien, zu denen neben *PHABULOSA* (*PHB*) auch *PHAVOLUTA* (*PHV*) und *REVOLUTA* (*REV*) gehören, fördert adaxiales Zellschicksal in lateralen Organen (McConnell und Barton, 1998). *phb-1d*-Mutanten - eine neomorphe Mutation, die ektopische Genaktivität bedingt - zeigen eine dosisabhängige Adaxialisierung aller lateralen Organe.

PHB kodiert ein Protein aus einer kleinen Unterfamilie der Homeodomänen-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren. Diese HD-ZIP-III-Proteinen (McConnell et al., 2001) können spezifisch DNA binden. (Sessa et al., 1998). *PHB* und andere HD-ZIP-III-Proteine enthalten eine sogenannte

START-Domäne. Dieses Motiv ist in zahlreichen Proteinen mit den verschiedensten Funktionen vorhanden und konnte in einigen Fällen als Bindungsstelle für einen Lipid-Liganden identifiziert werden (Ponting und Aravind, 1999).

Das Gen *PHB* wird sowohl in der zentralen Zone des SAM als auch in den jungen Organprimordien exprimiert (McConnell et al., 2001). Im Embryo wird *PHB* zunächst in der kompletten apikalen Region des globulären Embryos exprimiert und ist dann auf das SAM, die adaxiale Region der sich entwickelnden Kotyledonen sowie die Leitbündel beschränkt.

Es konnten 5 unabhängige *phb*-Mutanten mit einer veränderten PHB-START-Domäne isoliert werden. Die semi-dominanten *phb*-mutanten Effekte, die einen Funktionsgewinn-Phänotyp verursachen, könnten durch die unregulierte Bindung eines Lipid-Liganden hervorgerufen werden. Mutationen an der Bindestelle verursachen demnach eine konstitutive PHB-Aktivität, die ektopisches adaxiales Zellschicksal in der Pflanze bedingt. Dieser Zusammenhang konnte auch durch ektopische Expression des wildtypischen *PHB*-Gens unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors im *phb*-mutanten Hintergrund bestätigt werden, da die transgenen Pflanzen keinen Effekt zeigten (McConnell et al., 2001). *phb* wird in *phb-d*-Mutanten ektopisch exprimiert und aktiv.

Zwischen den lateralen Organen und dem Meristem existiert eine positionelle Beziehung: Während die adaxiale Seite des Organprimordiums dem Meristem zugewandt ist, ist die abaxiale Seite diesem abgewandt. Dies zeigt sich auch, bei der radiärsymmetrischen Entwicklung von Kartoffelpflanzen, wenn junge Blätter vom Meristem separiert wurden (Sussex, 1955). Umgekehrt wird aber auch die Meristementwicklung durch adaxiale Identität gefördert. So werden sowohl Achselmeristeme an der Blattbasis als auch die ektopischen Meristem in *phb-d*-Mutanten adaxial gebildet.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Beziehungen zwischen adaxialer Identität und dem Meristem hin. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die ektopische Expression von *phb* in den Mutanten einen Einfluß auf die Expression von *CLV3* hat.

1.3.4.2 ASYMMETRIC LEAVES

Pflanzen mit einer Mutation in den Genen *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) und *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) zeigen Defekte in der Entwicklung von Kotyledonen, Blättern und Blütenorganen. In *as1*-Mutanten ist die Blattspreite stark gelappt, wobei spätere Blätter stärker betroffen sind als frühe Blätter. Vereinzelt treten zudem ektopische Sproßmeristeme auf der adaxialen Blattoberfläche auf. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit transgenen Pflanzen, die *KNAT1* - ein KNOX-Homeobox-Gen wie *STM* - überexprimieren (Ori et al., 2000; Semiarti et al. 2001).

Tatsächlich sind in den Blättern von *as1*-Mutanten die Gene *KNAT1* und *KNAT2* fehlexprimiert. Beide Gene werden im Wildtypen in einem mit *STM* vergleichbaren Muster im SAM, nicht aber in den Primordien exprimiert (Lincoln et al., 1994; Serikawa et al., 1996). Dies läßt den Schluß zu, daß die Repression dieser beiden Gene in den Organprimordien entscheidend für die Blattentwicklung ist und das *AS1* hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle spielt.

AS1 kodiert einen putativen Transkriptionsfaktor mit Myb-Domäne und wird nur in den lateralen Organprimordien exprimiert, also in einer komplementären Domäne zu *STM* und *KNAT1* (Byrne et

al., 2000). Die Autoren konnten außerdem zeigen, daß *ASI* von *STM* im Meristem negativ reguliert wird und dessen Expression so auf die lateralen Vorläuferzellen der Organprimordien begrenzt ist. In *stm*-Mutanten wurde *ASI*-Expression ektopisch auch im Meristem detektiert, wohingegen die *STM*-Expression in *as1*-Mutanten unverändert ist. Zudem wiesen Byrne et al. (2000) mit *as1-1/stm-1*-Doppelmutanten nach, daß *as1* partiell epistatisch über *stm* ist. Im embryonalen und vegetativen Stadium dieser Doppelmutanten konnte der *stm* mutante Phänotyp nicht beobachtet werden. *ASI* seinerseits reprimiert die Expression von *KNATI* in den Organprimordien.

Mit dieser Interaktion von *STM*, *ASI* und *KNATI* konnte gezeigt werden, daß Gene, die in den Organprimordien exprimiert werden, mit den meristematischen Genen interagieren und gemeinsam das Zellschicksal im Sproßapex regulieren.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Rolle von *CLAVATA3* bei der Regulation des Stammzellschicksals im Sproßmeristem von *Arabidopsis thaliana*. Die Schwerpunkte der Arbeit liegen dabei auf der Analyse

- der Genfunktion von *CLV3*,
- der Regulation der *CLV3*-Expression durch meristemsspezifische Gene und
- der Regulation von *CLV3* durch eigene regulatorische Sequenzen.

Entsprechend dieser Schwerpunkte gliedert sich der Aufbau der Arbeit in drei Teile. Im ersten Teil der Arbeit soll die Funktion von *CLV3* untersucht werden, indem zunächst die Signalwirkung des *CLV3*-Proteins im Meristem näher analysiert wird. Außerdem wird mit Hilfe von Fehlexpressions-Experimenten analysiert, welchen Einfluß Änderungen der Intensität und der Richtung des *CLV3* Signals auf das Stammzellschicksal haben.

Im zweiten Teil der Arbeit wird mit Hilfe eines *CLV3*-Reportergens untersucht, welche Gene das Expressionsmuster und die Expressionsstärke von *CLV3* kontrollieren. Hierzu wurde die Expression des *CLV3*-Reportergens in verschiedenen amorphen und neomorphen Mutanten analysiert.

Im letzten dritten Teil dieser Arbeit soll mit Hilfe von Deletionsderivaten untersucht werden, welche regulatorischen DNA Sequenzen verantwortlich für das wildtypische Expressionsmuster und die Expressionsstärke von *CLV3* sind.

Als Modellorganismus diente die einjährige Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*, bei der Entwicklungsmutanten gut analysiert und zahlreiche verantwortliche Gene bereits isoliert wurden. Viele Aspekte in der Entwicklung von *Arabidopsis* sind repräsentativ und in den vergangenen Jahren konnte so ein guter Einblick in die molekularen Grundlagen der Genregulation im Meristem der dikotylen Blütenpflanzen gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: *Amersham Life Science*, Braunschweig; *Biomol*, Hamburg; *Biozym*, Oldendorf; *Duchefa*, (NL) *Fluka*, Neu-Ulm; *Invitrogen* (Karlsruhe); *Merck-Eurolab*, Darmstadt; *Life Technologies* (Karlsruhe); *Pharmacia*, Freiburg; *Promega*, Heidelberg; *Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim; *Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Sigma*, Deisenhofen; *Stratagene*, Heidelberg, *Clontech*, Heidelberg.

2.1.2 Enzyme

Es wurden Enzyme folgender Firmen verwendet, falls nicht anders angegeben:

Biolabs, Schwalbach; *Boehringer*, Mannheim; *Life Technologies* (Karlsruhe); *Pharmacia*, Freiburg. Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit den beigefügten Puffern verwendet.

2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle standardmäßig verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden nach den Protokollen von Asubel et al. (1996) angesetzt. Von diesen Standardprotokollen abweichende Zusammensetzungen sind separat angegeben.

2.1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierungen und Plasmidamplifikationen in dieser Arbeit wurden die beiden *E.coli* – Stämme DH5 α (*GIBCO/BRL*) und DH10B (*Boehringer*) verwendet. Die Genotypen der beiden Bakterienstämme sind Asubel et al. (1996) sowie den Firmenangaben zu entnehmen.

Für die Pflanzentransformationen wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm-GV3101 (Koncz und Schell, 1986) verwendet.

2.1.5 Vektoren

pBluescript

Der Vektor pBluescriptKS+ (*Stratagene*) wurde für Zwischenklonierungen und als Vektor für die *in vitro* Transkription verwendet.

pRT- Ω /Not/Asc

Der Vektor pRT- Ω /Not/Asc (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Werr) enthält den *CaMV35S*-Promotor mit der Ω -leader Sequenz und einem polyA-Signal. Außerdem steht ein Ampizillin Resistenzgen zur Verfügung. Dieser Vektor wurde für die Klonierung von *CaMV35S::CLV3* verwendet. Weitere Informationen finden sich bei Überlacker und Werr (1996).

pHis- Ω /Not/Asc

Der Vektor pHis- Ω /Not/Asc (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Werr) enthält den *H4A748*-Promotor ebenfalls fusioniert mit der Ω -leader Sequenz und einem polyA-Signal. Auch hier steht ein Ampizillin Resistenzgen zur Verfügung. Dieser Vektor wurde für die Klonierung von *HisH4::CLV3* verwendet. Weitere Informationen finden sich bei Überlacker und Werr (1996).

pGPTV-BAR-Asc

Der Vektor pGPTV-BAR-Asc (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von W. Werr) ist ein pflanzlicher Expressionsvektor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hieraus für die Klonierung des *CLV3*-Reportergens das *GUS*-Gen entnommen. Weitere Informationen finden sich bei Überlacker und Werr (1996).

pGREENnos-BAR

Der Vektor pGREENnos-BAR wurde als pflanzlicher Expressionsvektor aller im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Transgenen verwendet. Der Vektor enthält den Polylinker von pBluescriptSK und liefert eine bakterielle Kanamycin Resistenz und eine Basta-Resistenz in der transgenen Pflanze. Als Helferplasmid wurde pJIC-Sa-Rep verwendet, das eine Plasmidreplikation in *Agrobacterium* ermöglicht. Dieses binäre Vektorensystem wurde vom John Innes Centre, Großbritannien zur Verfügung gestellt. Weitere Informationen sind unter <http://www.pgreen.ac.uk> sowie in Hellens et al. (2000) zu finden.

***CLV3-GFP* (pNB3 und pNB3a)**

Der Vektor pNB3 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Beinert) enthält die komplette *CLV3*-cDNA, die translational mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) fusioniert ist. Für den Vektor pNB3a wurde die putative Signalsequenz aus *CLV3* entfernt und das verbleibende Fragment ebenfalls mit GFP fusioniert. In beiden Vektoren steht die Fusion unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors.

***CaMV35S::WUS-GR* (pMG10)**

Im Plasmid pMG10 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Grünewald) steht das Gen *WUS* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors. Das Konstrukt wurde außerdem mit der hormonbindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptors fusioniert, so daß es durch Applikation mit dem Glukokortikoidhormon Dexamethason gezielt aktivierbar ist (Lloyd et al., 1994). Pflanzen, die dieses Transgen tragen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *WUS-GR*-Pflanzen bezeichnet.

CaMV35S::STM-GR (pRS4)

Im Plasmid pRS4 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Simon) steht das Gen *STM* ebenfalls unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors. Auch das Konstrukt wurde mit der hormonbindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptors fusioniert, so daß es durch Applikation mit dem Glukokortikoidhormon Dexamethason gezielt aktivierbar ist (Lloyd et al., 1994). Pflanzen mit diesem Transgen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *STM-GR*-Pflanzen bezeichnet.

2.1.6 Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Sequenz- und PCR-Reaktionen verschiedene Oligonukleotide synthetisiert bzw. verwendet, die in Tab. 1 zusammengefaßt sind. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen *Eurogentech*, Belgien und *Sigma*, Darmstadt bezogen.

Bezeichnung	Gen	Sequenz (5'3')	Verwendung
clv3.21	<i>CLV3</i>	CCCCGGATCCGATGGATTCTAAAAGCTTTG	Klonierung <i>CLV3</i>
clv3.22	<i>CLV3</i>	CCCCTCTAGAGGTCAAGGGAGCTGAAAGTTGTT	Klonierung <i>CLV3</i>
551up	<i>CLV3</i> 5'Region	CCCCCTGCAGAGAGAAAGTGACTGAGTGAG	Klonierung <i>CLV3</i> 5'Region
553dow	<i>CLV3</i> 3'Region	AAAAGCGGCCGCCCTAATCTCTTGTGCTTTAA	Klonierung <i>CLV3</i> 3'Region
554dow	<i>CLV3</i> 3'Region	CCCCGAGCTCTATGTGTGTTTTTCTAAACAA	Klonierung <i>CLV3</i> 3'Region
1dow	<i>CLV3</i> 3'Region	CCCCGAGCTCACCATAAATTTTAACGTATTA	<i>CLV3</i> Promotordeletion
2dow	<i>CLV3</i> 3'Region	CCCCGAGCTCTATTAATAATATCTTTTCAAGT	<i>CLV3</i> Promotordeletion
3dow	<i>CLV3</i> 3'Region	CCCCGAGCTCATTCCAAAGCAAGTTAGATAT	<i>CLV3</i> Promotordeletion
1up	<i>CLV3</i> 5'Region	AAAAGAATTCTCAGAAGTGACTCCAGGTAT	<i>CLV3</i> Promotordeletion
2up	<i>CLV3</i> 5'Region	AAAAGAATTCCACAAATATTATATGTTTAAT	<i>CLV3</i> Promotordeletion
3up	<i>CLV3</i> 5'Region	AAAAGAATTCTGAACAAGTTCGTATAAGATC	<i>CLV3</i> Promotordeletion
GAPC1 ¹	<i>GAPC</i>	CCTGTTGTGCGCCAACGAAGTC	Positivkontrolle RT-PCR
GAPC2 ¹	<i>GAPC</i>	CACTTGAAGGGTGGTGCCAAG	Positivkontrolle RT-PCR
WUS2r	<i>WUS</i>	AAGGTGCAGATGAGTAATGA	RT-PCR
WUS2f	<i>WUS</i>	ACCACACCATCTTCATCACC	RT-PCR
STMr	<i>STM</i>	TCCAGCCTCGCCACAACCTC	RT-PCR
STMf	<i>STM</i>	ATGGTCCGATGTGTCCTATG	RT-PCR
reverse		CAGGAAACAGCTATGAC	PCR, Sequenz
forward		GTAAAACGACGGCCAG	PCR, Sequenz
GUS1	<i>uidA</i>	ACTGCTTTTTCTTGCCGTTTTCGT	Kontrolle Deletionen
GUS2	<i>uidA</i>	AATGTAATGTTCTGCGACGCTCAC	Kontrolle Deletionen

Tab. 1: Liste der verwendeten Oligonukleotide.¹ Sequenz entnommen aus Schiefthaler et al. 1999

2.1.7 Verwendete Pflanzenlinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ökotypen *Columbia (Col)* und *Landsberg erecta (Ler)* als Wildtypen verwendet. Die mutanten *Arabidopsis*-Genotypen sind in Tab. 2 zusammenfassend dargestellt.

Genotyp	Bezugsquelle	Literaturhinweis
<i>as1</i>	Dr. A. Hudson	Byrne et al., 2001
<i>clv 1-4</i>	NASC, GB	Clark et al., 1997
<i>clv 2-1</i>	NASC, GB	Trotochaud et al., 1999
<i>clv3-8</i>	NASC, GB	Clark et al., 1995
<i>clv 3-2</i>	NASC, GB	Fletcher et al., 1999
<i>clv 3-7</i>	laborintern	Fletcher et al., 1999
<i>cuc1/cuc2</i>	NASC, GB	Aida et al., 1997
<i>mgo1</i>	Dr. J. Traas	Laufs et al., 1998
<i>mgo2</i>	Dr. J. Traas	Laufs et al., 1998
<i>pol</i>	Dr. S. Clark	Yu et al., 2000
<i>phb</i>	NASC, GB	McConnell et al., 2001
<i>pnh-2</i>	Dr. K. Barton	Lynn et al., 1999
<i>stm-2</i>	Dr. T. Laux	Clark et al., 1996
<i>stm-5</i>	Dr. T. Laux	Clark et al., 1996
<i>stm-1</i>	Dr. J. Long	Barton und Peothig, 1993
<i>stm-11</i>	Dr. J. Long	Long und Barton, 1998
<i>wus-1</i>	Dr. T. Laux	Mayer et al., 1998

Tab. 2: Zusammenfassende Auflistung der verwendeten Genotypen.

2.1.8 Programme zur elektronischen Datenverarbeitung

Zur elektronischen Datenverarbeitung wurden die Programme Microsoft Word und Microsoft Excel verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet.

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht) im Gewächshaus bei einer Temperatur von 23°C angezogen. Pflanzenschutzmaßnahmen wurden nach Bedarf getroffen.

2.2.2 In planta-Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte nach einer Standardmethode von Bechtold et al. (1998). Im Vakuum wurden adulte *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer *Agrobacterium tumefaciens*-Suspensionskultur infiltriert. Die abgereiften Samen wurden dann abgeerntet, zur Keimung gebracht und transgene Pflanzen wurden selektioniert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Präparation von Plasmid DNA

Plasmid-DNA-Minipräparationen

Zur schnellen Analyse kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte die Präparation nach einem modifizierten Protokoll der sogenannten *TELT Microquick* Methode (Holmes und Quigley, 1981).

Plasmid-DNA-Midi/Maxipräparationen

Größere Mengen Plasmid-DNA (ab ca. 100g) wurden durch eine alkalische Lyse und anschließender Reinigung über Ionenaustauschchromatographiesäulen präpariert. Hierzu wurden Kits der Firmen *Qiagen* (Hilden) und *Genomed* (Bad Oeyenhausen) verwendet. Die Herstellerangaben wurden befolgt.

2.3.1.2 Präparation genomischer DNA

Die Präparation von pflanzlicher genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Doyle und Doyle (1987)

- Blattmaterial in flüsigem N₂ einfrieren
- Material in gefrorenem Zustand gründlich mörsern
- 700 µl DNA-Präparationspuffer (erwärmt auf 65°C) zugeben und vortexen
- ca. 20 min bei 65°C inkubieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in frisches Reaktionsgefäß überführen, 500 µl Chloroform zugeben und vortexen
- Überstand in frisches Reaktionsgefäß überführen und 350 µl Isopropanol und 40 µl 3M NaAcetat zugeben
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand entfernen und Pellet mit 70% Ethanol waschen

- Ethanol abnehmen, Pellet nicht trocknen und in geeignetem Volumen TE (mit 10 µg/ml RNase) aufnehmen

DNA-Präparationspuffer: 200 mM TRIS/HCL pH8, 20mM EDTA, 800mM NaCl, 5% SDS, 0,8% CTAB

2.3.1.3 Präparation von RNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für RT-PCR Experimente Gesamt-RNA aus Pflanzen benötigt. Die RNA wurde aus in N₂ eingefrorenem Blattmaterial mit Hilfe des *TRIZOL*[®] *REAGENT* der Firma *Life Technologies* (Karlsruhe) präpariert. Bei der Präparation wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

2.3.1.4 cDNA Synthese

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA wurde aus gesamt RNA mit Hilfe des *Superscript*[™]II Kits von *Life Technologies* synthetisiert. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt.

2.3.1.5 Gelelution von DNA-Fragmenten

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA Fragmente für die verschiedenen Klonierungen erfolgte über die präparative Gelelektrophorese mit Hilfe des DNA Extraktions-Kits *EASY PURE*[®] der Firma Biozym (Oldendorf). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden wie Größenseparation von DNA und RNA, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Restriktionsspaltung von DNA, Dephosphorylierung von 5'Enden, Auffüllen überhängender Enden von DNA-Fragmenten, Ligationen, Bakterientransformationen, DNA-Sequenzierungen und PCR-Reaktionen erfolgten nach den Protokollen in Asubel et al. (1996).

2.3.3 Konstruktion der verschiedenen Plasmide

Im folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit konstruierten und verwendeten Plasmide beschrieben. Sie wurden durch Restriktionsspaltungen mit geeigneten Enzymen und durch Sequenzierung kontrolliert und bestätigt.

CaMV35S::CLV3 (pBU6)

Um *CLV3* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors zu exprimieren, wurde zunächst aus dem Vektor pNB3.25 (N. Beinert) die *CLV*-cDNA in einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Oligonukleotide *clv3.21* und *clv3.22* amplifiziert. Hierbei wurden eine *BamHI* am 5' und eine *XbaI* Schnittstelle am 3' Ende von *CLV3* eingeführt. Der Vektor pRT- Ω /*Not/Asc* wurde mit *BamHI* und *XbaI* geschnitten und das PCR-Produkt in die *BamHI/XbaI*-Schnittstellen kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU3. Anschließend wurde die komplette *35S::CLV3*-Kassette mit einer *PstI*-Restriktion herausgeschnitten und in den zuvor mit *PstI* geöffneten Vektor pGreen-nos-bar kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU6 und wurde in Pflanzen transformiert.

HisH4::CLV3 (pBU5)

Um *CLV3* unter Kontrolle des *HistonH4/(HisH4)*-Promotors zu exprimieren, wurde zunächst aus dem Vektor pNB3.25 (N. Beinert) *CLV3*-cDNA in einer PCR-Reaktion ebenfalls unter Verwendung der Oligonukleotide *clv3.21* und *clv3.22* amplifiziert. Hierbei wurden eine *BamHI*- am 5' und eine *XbaI*-Schnittstelle am 3' Ende von *CLV3* eingeführt. Der Vektor pHis- Ω /*Not/Asc* wurde mit *BamHI* und *XbaI* geschnitten und das PCR-Produkt in die *BamHI/XbaI* Schnittstellen kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU4. Anschließend wurde die komplette *HisH4::CLV3*-Kassette ebenfalls über *PstI* herausgeschnitten und in den zuvor mit *PstI* geöffneten Vektor pGreen-nos-bar kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU5 und wurde in Pflanzen transformiert.

UFO::CLV3 (pBU12)

Um *CLV3* unter Kontrolle des *UFO*-Promotors im Meristem zu exprimieren, wurde zunächst aus dem Plasmid pUfo9 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Simon) mit Hilfe der Enzyme *BamHI* und *HindIII* der 3,5 kb große *UFO*-Promotor herausgeschnitten und dessen Enden mit Hilfe der T4-Polymerase wieder aufgefüllt. Aus dem Plasmid pBU3 wurde dann mit den Enzymen *HincII* und *XhoI* der *HisH4*-Promotor entfernt und die Enden des Restvektors ebenfalls mit der T4 Polymerase aufgefüllt. Über eine *blunt-end*-Ligation wurde der *UFO*-Promotor in der richtigen Orientierung in den geöffneten pBU3 kloniert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU11. Dann wurde die komplette Kassette aus pBU11 über *PstI* herausgeschnitten und in die *PstI* Schnittstelle des Vektor pGreen-nos-bar kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU12 und wurde dann in Pflanzen transformiert.

5,6 kb genomische Sequenz um *CLV3* (pBU9)

Das Plasmid pBU9 wurde konstruiert, um zu testen, ob die Sequenzen im 5' und im 3' von *CLV3* gelegenen Bereich den *clv3-2* mutanten Phänotyp komplementieren können. Hierzu wurden aus dem Vektor pE5.5CLV3 (R. Simon) über *EcoRI* rund 5,6 kb genomische DNA herausgeschnitten, die das *CLV3* Gen enthielten. Das 5,6 kb große DNA Fragment wurde in die die *EcoRI* Schnittstelle des Vektors pGreen-nos-bar kloniert. Das so konstruierte Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU9 wurde dann in *clv3-2* Mutanten transformiert.

***CLV3::GUS* Reportergen (pBU16)**

Zur Klonierung des *CLV3::GUS*-Reportergens wurden die putativen regulatorischen Sequenzen von *CLV3* aus dem Vektor gE5.5CLV3, der ein etwa 5,6 kb großes DNA Fragment mit dem *CLV3*-Gen

enthält, mit einer PCR-Reaktion amplifiziert. Zur Amplifikation des 1487 bp großen Promotorfragmentes direkt 5' vom translationalen Start von *CLV3* wurden der Primer *551up*, der eine *PstI*-Schnittstelle einfügt und der 5'Primer *forward*, der an der Vektorsequenz bindet verwendet. Das putative Enhancer-Fragment mit einer Größe von 1256 bp im 3'gelegenen Bereich des *CLV3* Gens wurde mit den Primern *553dow* und *554dow* amplifiziert. Der 5'Primer *553dow* fügt eine *NotI* Schnittstelle ein und der 3'Primer *554dow* eine *SacI* Schnittstelle. Beide PCR Produkte wurden über die Schnittstellen *EcoRI/PstI* und *NotI/SacI* in den Vektor pGreen-nos-bar kloniert. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pBU14. In einem weiteren Klonierungsschritt wurde die 1,8 kb kodierende Sequenz des *GUS*-Gens (*uidA*) über die im Polylinker vorhandene *SmaI*-Schnittstelle zwischen die beiden Regulationselemente in den Vektor pBU14 kloniert. Das so konstruierte Plasmid, in dem das *GUS*-Gen unter der Kontrolle des *CLV3*-Promotors steht, erhielt die Bezeichnung pBU16.

***CLV3::GUS* Deletionsderivate (pBU16*Del1-7* und *Del3x5* und *3x4*)**

Auf Grundlage des *CLV3::GUS*-Reportergens wurde eine erste Funktionsanalyse der regulatorischen Sequenzen von *CLV3* durchgeführt. Hierzu wurden sowohl aus dem 5'gelegenen Bereich als auch aus dem 3'Bereich von *CLV3* mittels PCR Deletionsderivate konstruiert. Die Amplifikation der Fragmente im 5'gelegenen Bereich wurden mit dem festen 3'Primer *551up*, der eine *PstI* Schnittstelle einfügt sowie mit variablen 5'Primern, die alle eine *EcoRI* Schnittstelle einfügen, durchgeführt. Die Bezeichnungen und Sequenzen der Primer sind in Tab.1 aufgelistet. Hierbei bindet Primer *Dellup* 1166 bp entfernt 5' vom Translationsstart von *CLV3*, Primer *Del2up* nur 746 bp und Primer *Del3up* 286 bp, so daß drei unterschiedlich lange Promotorfragmente entstanden. Der Vektor pBU16 (*CLV3::GUS*) wurde dann mit *EcoRI/PstI* geöffnet, das 1487 bp lange *CLV3* Promotorfragment damit entfernt und durch die drei Deletionsfragmente ersetzt. Das *GUS*-Gen in diesen Plasmiden steht also unter Kontrolle der drei 5'Deletionsderivate und den 1256 bp im 3'Bereich von *CLV3*, die als putativer Enhancer dienen. Die Plasmide erhielten die Bezeichnungen *Del1*, *Del2* und *Del3*. In einem zweiten Klonierungsansatz wurden die Deletionsderivate des 3' von *CLV3* gelegenen Bereiches erstellt. Hierzu wurden in den PCR-Reaktionen der feste 5'Primer *553dow*, der eine *NotI*-Schnittstelle einfügt und die 3'Primer *1dow* (bindet 275 bp nach dem translationalen Stop), *2dow* (595 bp nach Stop) und *3dow* (965 bp nach Stop) verwendet. Alle 3'Primer fügen eine *SacI*-Schnittstelle ein. Der Vektor pBU16 wurde dann *NotI/SacI* geschnitten und das 1256 bp lange putative Enhancer-Fragment damit entfernt. Dann wurden die drei unterschiedlichen Enhancerfragmente über *NotI/SacI* in den geöffneten pBU16 Vektor kloniert. Die Plasmide erhielten die Bezeichnung *Del4*, *Del5* und *Del6*. Ein weiterer Deletionsklon (Bez. *Del7*) entstand, indem der *NotI/SacI* geöffnete Vektor pBU16 nach einer Auffüllreaktion mit der T4-Polymerase, wieder ligiert wurde. In *Del7* wird das *GUS* Gen also lediglich von der regulatorischen Sequenz im 5' von *CLV3* gelegenen Bereich kontrolliert. Außerdem wurden zuletzt zwei 5' und 3'Deletionsfragmente miteinander kombiniert. Hierzu wurde aus dem Vektor *Del3* das 1256 bp Fragment aus dem 3'Bereich mit *NotI/SacI* herausgeschnitten und durch die 3'Deletionsfragmente von *Del5* und *Del4* ersetzt. Die beiden Plasmide erhielten die Bezeichnung *Del3x5* und *Del3x4*. Eine graphische Übersicht über alle Deletionskonstrukte ist in Kap. 3.11 zu finden.

2.4 Zytologische und histologische Techniken

2.4.1 Präparation von Embryonen

Für die Präparation der Embryonen wurden Schoten in unterschiedlichen Stadien von den Pflanzen abgeerntet, längs aufgeschnitten und die Ovulen entnommen. Diese wurden dann mit Hilfe von Skalpell und Pinzette geöffnet, die Embryonen entnommen und wie in Kap.2.4.3.2. beschrieben einer GUS-Färbung unterzogen

2.4.2 Nicht-radioaktive-RNA-*in situ* Hybridisierung

Die RNA *in situ*-Hybridisierung wurde leicht modifiziert nach Coen et al. (1990) und Jackson (1991) durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet die Fixierung des frischen Gewebes, dessen Einbettung in Paraffin, die Herstellung der Schnitte, die Herstellung der Sonden, sowie die Detektion der Transkripte von Interesse mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde und einem Anti-Digoxigenin AP-gekoppelten Antikörper.

Für die *in vitro* Transkription der Sonden wurden folgende Plasmide verwendet:

CLV3-Sonde: pNB3.25 (N. Beinert); *WUS*-Sonde: pMHwus (M. Hobe); *CLV1*-Sonde: pRSC1K2 (R. Simon); *STM*-Sonde pRSTM4 (R. Simon). Alle genannten Vektoren sind Derivate von pBluescriptKS+.

2.4.3 Nachweis der β -Glukuronidase Aktivität

2.4.3.1 Fluorometrischer Nachweis

Der fluorometrische Nachweis der β -Glukuronidase Aktivität ist sehr sensitiv. Verwendet wurde das Substrat MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glukuronid), welches bei enzymatischer Spaltung durch die β -Glukuronidase MU (Methylumbelliferon) freisetzt. MU hat die Eigenschaft, nach Anregung mit UV-Licht (365nm) im Bereich von 455 nm ein detektierbares Fluoreszenzsignal abzugeben. Verwendet wurde ein Lumineszenz-Spektrometer der Firma *Perkin Elmer*. Die Pflanzen wurden folgendermaßen vorbereitet:

- Pflanzenmaterial in flüssigem N₂ einfrieren und gründlich mörsern
- Material mit Extraktionspuffer resuspendieren und gut vortexen
- 10 min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und sofort für den Fluoreszenztest verwenden

Die Durchführung des Fluoreszenztests erfolgte folgendermaßen:

- Im Reaktionsgefäß werden 2 μ l MUG (50 mM) und 48 μ l Extraktionspuffer vorgelegt, alles auf Eis stellen

- 50 µl des Überstandes dazugeben und 15 min bei 37 °C inkubieren
- Reaktion abstoppen mit 900 µl 0,2 M Na₂CO₃

Die Proben wurden sofort im Fluorometer ausgewertet. Zusätzlich wurde immer ein Nullwert mitbestimmt, bei dem das Na₂CO₃ direkt dazu pipettiert wird. Um die Eigenfluoreszenz des Chlorophylls heraus zu filtern, wurde das Gerät für jede Probe ohne Substratzugabe einmal kalibriert. Die Durchführung der Messung und die Geräteeinstellung erfolgten nach Herstellerangaben.

Extraktionspuffer: 0,1 M Na₂PO₄ Puffer pH7, 0,5 M EDTA, 0,1% Triton X 100, 0,1% Sarkosyl

2.4.3.2 *In-situ*-β-Glukuronidase Färbereaktionen (GUS-Färbung)

Die β-Glukuronidase-Färbung in transgenen Pflanzen wurde nach einem modifizierten Färbeprotokoll von Sieburth und Meyerowitz (1997) durchgeführt. Das β-Glukuronidase Enzym spaltet hierbei das farblose Substrat x-Gluc (Cyclohexylammonium, *Duchefa*), das dann als blauer Farbniederschlag in der Zelle detektiert werden kann.

- Pflanzen 2-12 h bei 37°C in x-Gluc Färbelösung inkubieren
- mit 70% und 100% Ethanol das Chlorophyll entfernen (jeweils 1-4 h bei RT)
- Pflanzen in 50% und 100% Rotihistol waschen
- Pflanzen in Immersionsöl überführen

Die Embryonen und Keimlinge wurden als *whole mount* Präparat ausgewertet. Ältere Infloreszenzen wurden nach der GUS-Färbung fixiert, in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten.

x-Gluc Färbelösung: 50 mM NaPO₄, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 10 mM x-Gluc

Fixativ: 50% Ethanol, 5% Essigsäure, 3,7% Formaldehyd

2.4.4 Immunohistologischer Proteinnachweis

Es wurden zwei verschiedene CLV3-Antiseren getestet: ein Antiserum gegen ein synthetisches Peptid aus der konservierten Domäne im N-terminalen Bereich des CLV3-Proteins (*Eurogentec*, Belgien) und das zweite gegen ein CLV3-GST-Fusionsprotein (*Pineda*, Berlin).

Die Aufreinigung der Peptidantiseren erfolgte nach einer Methode von S. Zachgo (persönliche Mitteilung.)

- Peptid auf Nitrozellulose Filter pipettieren
- 30 min in Blockierungspuffer schwenken
- 200 µl Antiserum mit 20 ml Blockierungspuffer mischen
- Nitrozellulosefilter üN bei 4°C damit inkubieren
- Filter 1 x mit Blockierungspuffer bei 4°C und 3 x mit PBS bei RT waschen
- Filter in 2 ml Elutionspuffer für 3 min bei RT schwenken
- Eluat in Reaktionsgefäß auf Eis überführen und mit 250 µl 1M Tris/HCl neutralisieren
- Eluat in Centricon 100 Röhrchen aufkonzentrieren und für Immunolokalisierung verwenden

Die Aufreinigung des CLV3-GST-Antiserums erfolgte mit Hilfe des *High Affinity Purification Kits* der Firma *Invitrogen* über GST-gekoppelte Säulen. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt.

Die Immunolokalisation von CLV3 wurde nach einem Protokoll von S. Zachgo (pers. Mitteilung) auf Paraffinschnitten durchgeführt. Das Gewebe wurde wie für die RNA *in situ* Hybridisierungen beschrieben fixiert, eingebettet und geschnitten und anschließend wieder deparaffiniert. Die Detektion erfolgte mit dem *VECTASTAIN ABS reagent* Kit der Firma *Santa Cruz*.

- Objektträger 45 min bei RT in PBSTB-Puffer schwenken
- 5 min mit PBS waschen
- 5 – 7 min bei RT mit Proteinase K (5 µg/ml) inkubieren
- 3 x mit eiskaltem PBSTB waschen
- mit dem CLV3 Antikörper (1:1 – 1:100 verdünnt) üN bei 4°C inkubieren
- 2 x 5 min PBSTB und 2 x 15 min in PBS waschen
- mit dem 2. biotinylierten Antikörper 2,5 h bei RT inkubieren
- 3 x waschen mit PBS

Die weitere Farbdetektion mit dem *VECTASTAIN ABC* Kit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der DAB-Färbung wird das Gewebe mit Entellan eingebettet und unter dem Mikroskop analysiert.

Blockierungspuffer: 5% BSA, 0,2% Triton X 100, PBS

Elutionspuffer: 0,2 M Glycin, PBS

PBSTB-Puffer: 0,02% TWEEN20, 0,5% BSA, PBS

2.4.5 Ballistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen

Die ballistische Transformation der Zwiebelepidermiszellen erfolgte mit Hilfe einer Particle Gun der Firma *Biorad*. Es wurden Wolframpartikel mit der zu analysierenden DNA beschichtet:

- 50 µl Wolfram Partikel (suspendiert in 100% Ethanol)
- 20 µg DNA
- 20 µl 0,1 M Spermidin
- 200 µl 100% Ethanol
- kurz bei 8000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen
- erneut 200 µl 100% Ethanol zugeben, zentrifugieren und dies noch 3 x wiederholen
- das endgültige Pellet in 30 µl 100% Ethanol resuspendieren

Die so vorbereiteten Proben wurden auf *rupture disks* (11000 psi, *Biorad*) appliziert. Die ballistische Transformation erfolgte nach Herstelleranweisung.

2.4.6 Transiente Transfektion von BY2-Tabak-Protoplasten

Die PEG-vermittelte Transfektion der BY2-Protoplasten erfolgte nach Mathur und Koncz (1996). BY2-Protoplasten erlauben eine gute zelluläre Lokalisierung von GFP, so daß auch mit dieser Me-

thode ein möglicher Unterschied zwischen CLV3::GFP mit und ohne putativer Signalsequenz (pNB3 und pNB3a) deutlich gemacht werden sollte.

2.5 Mikroskopische Techniken

2.5.1 Nomarsky-Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem *Axioskop* Mikroskop mit Nomarsky-Optik der Firma *Zeiss* und einer angeschlossenen *Axiocam* der Firma *Zeiss* angefertigt. Dies geschah mit Hilfe der zugehörigen Software *Axio Vision*.

2.5.2 Konfokale Mikroskopie

Für die Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop wurden die *Arabidopsis* Keimlinge einer Propidiumjodid-Färbung unterzogen. Die Färbung wurde nach dem Protokoll von Running et al. (1995) durchgeführt. Propidiumjodid lagert sich im Zellkern und in den Zellwänden der Pflanzen an und fluoresziert nach Anregung durch geeignete Laser, so daß die zellulären Strukturen gut visualisiert werden können. Die Aufnahmen wurden an einem *Laser Scan* Mikroskop (*LSM 410 invert*) der Firma *Zeiss* (*Carl Zeiss, Jena*) mit Hilfe der zugehörigen Software angefertigt.

3 Ergebnisse

Teil I: Untersuchungen zur Funktion von *CLV3* im SAM

Schwerpunkt im ersten Teil der Arbeit ist die Analyse der Funktion von *CLV3* bei der Regulation des Stammzellschicksals im Sproßmeristem. Es soll zunächst untersucht werden, ob *CLV3* nicht-zellautonom als Signalmolekül im Meristem wirkt. Daran anschließend wird mit Hilfe verschiedener Fehlexpressions-Experimente untersucht, welche Auswirkungen Intensität und Ort der *CLV3*-Expression auf das Stammzellschicksal in *Arabidopsis* haben.

3.1 Wirkt *CLV3* zellautonom ?

Im Rahmen von Datenbankanalysen (<http://www.dbs.dtu.dk/services/TargetP/>) konnte gezeigt werden, daß *CLV3* eine putative Signalsequenz besitzt. Diese 18 AS in der N-terminalen hydrophoben Region könnten nach den Ergebnissen von TargetP eine Sekretion des Proteins bewirken.

Auf Basis dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach der tatsächlichen biologischen Funktion dieser putativen Signalsequenz. Die in diesem Kapitel beschriebenen experimentellen Ansätze sollten nun klären, ob *CLV3* nicht-zellautonom wirkt, wo das Protein in der Pflanze lokalisiert ist und welche Funktion die putative Signalsequenz von *CLV3* tatsächlich hat.

3.1.1 Periklinale Chimären: *CLV3*-Expression in einzelnen Zellagen gewährleistet eine normale Meristemfunktion

Die Analyse periklinaler Chimären ist ein klassisch genetisches Verfahren, mit dem z.B. bei Carpenter und Coen (1995) für *Anthirrinum* gezeigt werden konnte, daß das Meristemidentitätsgen *FLORICAULA* nicht-zellautonom agiert.

Für die vorliegende Analyse wurden instabile *clv3-7*-Mutanten verwendet. Das *clv3-7*-Allel enthält ein instabil inseriertes *En-1*-Transposon, das mit einer bestimmten Häufigkeit spontan mobilisiert wird, so daß die wildtypische Aktivität von *CLV3* in den entsprechenden Zellen wiederhergestellt ist. Wenn die Mobilisierung des Transposons in einer Zelle im Meristem stattfindet (Abb.1, schwarz markierte Zelle), kann sich daraus eine periklinale Chimäre entwickeln. Die revertierte, wildtypische Zelle teilt sich und verbleibt dabei in ihrer jeweiligen Zellage. Es entsteht ein Sektor und damit zunächst eine meriklinale Chimäre (Abb.1). Wenn es nun in genau dieser Region zu Zellteilung und Wachstum kommt, sich also ein Organ oder ein Achselmeristem und damit ein Seitentrieb bildet, kann eine periklinale Chimäre entstehen (Abb.1). Bezogen auf den Seitentrieb ist somit eine komplette Zellschicht des Meristems revertiert. Das kann im Extremfall auch für die komplette Pflanze gelten, wenn zu einem frühen Zeitpunkt in der Embryogenese eine Zelle revertiert, deren Tochterzellen dann in einer kompletten Schicht des SAM wiederzufinden sind. Eine solche periklinale Chimäre führt zu einem phänotypisch komplett revertierten, also wildtypischen Seitentrieb. Liegt eine meriklinale Chimäre vor, ist der Seitentrieb phänotypisch nicht komplett revertiert, sondern wildtypische

und *clv*-mutante Sektoren - leicht zu identifizieren an der Schotenform – treten abwechselnd auf. Periklinale Chimären geben Informationen über Interaktionen zwischen den Zellschichten (interdermale Effekte), während mit meriklinalen Chimären die Ausdehnung von Zell-Zell-Interaktionen innerhalb der jeweiligen Zellschicht (intradermale Effekte) verdeutlicht werden kann (Carpenter und Coen, 1995).

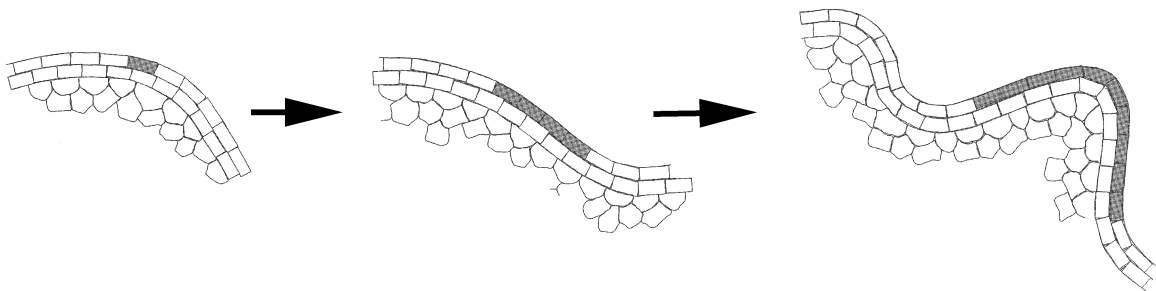


Abb.1: Entstehung von periklinalen Chimären in den Meristemen von *clv3-7* Mutanten. Dargestellt sind die drei meristematischen Zellschichten mit einer revertierten, also wildtypischen L1 Zelle (schwarz). Sie teilt sich weiterhin antiklin und bildet einen Sektor, der ein sich entwickelndes Achselmeristem umspannt und eine periklinale Chimäre entsteht. Abbildung entnommen aus Carpenter und Coen (1995).

Alle phänotypisch komplett revertierten wildtypischen Seitentriebe der instabilen *clv3-7*-Mutanten wurden abgeerntet, die Nachkommen dann zur Keimung gebracht und deren Segregation ausgewertet. Entscheidend hierbei ist, daß die Zellen in ihrer jeweiligen Schicht verbleiben, weil die Zellschichten im Meristem aufgrund ihrer Zellteilungsebenen klonal sind. Die Zellen der L1 sind später in der Epidermis der Pflanze wiederzufinden, die Zellen der L2 bilden das subepidermale Gewebe und die Gameten und die Zellen der L3 sind für die Bildung des Grundgewebes verantwortlich. Somit ist folgende Segregation in der zu analysierenden Folgegeneration zu erwarten: Unabhängig davon, ob die Reversion in der L1 oder L3 stattfindet, führt dieses theoretisch zu 100% *clv*-mutanten Pflanzen. Beide Reversionsereignisse lassen sich folglich anhand der Phänotypen in der Nachkommenschaft nicht voneinander unterscheiden, jedoch kann aufgrund der statistischen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß die Reversionen zu je 50% in der L1 oder der L3 stattfinden. Ein anderes Ergebnis ergibt sich für die L2, da die Zellen an der Bildung der Gameten beteiligt sind. Nur ein Reversionsereignis in der L2 wird in die nächste Generation weitergegeben und ist durch eine theoretische Segregation von 75% wildtypischen zu 25% *clv*-mutanten Pflanzen klar von L1/L3 Reversionen zu unterscheiden. Neben den somatischen Reversionen kommt es in den Pflanzen zusätzlich zu sekundären Keimbahnreversionen, so daß in L1/L3 Revertanten erfahrungsgemäß bis zu 30% wildtypischen Nachkommen auftritt (Tilney-Basset, 1986).

Mit Hilfe der Revertantenanalyse läßt sich untersuchen, ob *CLV3*-Expression in einer einzelnen Zellschicht für die normale Funktion des Meristems ausreichend ist. Falls das Gen nur in der L1 exprimiert wird, muß *CLV3* in die tiefere L3 zum *CLV1*-Rezeptor sekretiert werden. Dies wäre als indirekter Hinweis auf eine nicht-zellautonome Wirkung von *CLV3* zu werten.

Bei der Auswertung der Revertanten konnten 16 periklinale Chimären mit je einem phänotypisch komplett revertierten, also wildtypischen Seitentrieb identifiziert werden. Die Analyse der Folgegeneration der Pflanzen Nr.1-7 ließ auf ein Reversionsereignis entweder in der L1 oder in der L3

schließen. Die Nachkommen dieser Pflanzen segregierten zu 71-85 % *clv*-Mutanten (Tab. 3), so daß eine Reversion in der L2 und damit eine Weitergabe in die nächste Generation nicht wahrscheinlich war. Die Nachkommen der Pflanzen Nr. 8-12 segregierten nur zu 12-20 % *clv*-mutante Pflanzen, so daß sich auf ein Reversionsereignis in der L2 und damit eine Weitergabe der wildtypischen Funktion von *CLV3* in die nächste Generation schließen läßt. Unter den Nachkommen von vier weiteren periklinalen Chimären segregierten 66-55% *clv*-mutante Pflanzen, so daß diese nur als unklar eingestuft wurden.

Die Analyse der periklinalen Chimären hat gezeigt, daß *CLV3*-Expression in einer einzelnen Zellschicht ausreichend ist, um Zellteilung und Differenzierung im gesamten Meristem zu kontrollieren. Auch eine ausschließliche *CLV3*-Expression in der L1 reicht dazu aus. Wenn das *CLV3*-Protein nur in der L1 vorhanden ist, muß es zum *CLV1/2*-Rezeptor in den tieferen Zellschichten des Meristem gelangen: ein indirekter Hinweis also für eine Sekretion des *CLV3*-Proteins.

Pflanze	n	Phänotyp in der Folgegeneration		
		Wildtyp	Mutant	Reversion
1	167	23%	77%	L1 / L3
2	166	30%	70%	L1 / L3
3	54	15%	85%	L1 / L3
4	77	29%	71%	L1 / L3
5	33	18%	82%	L1 / L3
6	43	28%	72%	L1 / L3
7	128	25%	75%	L1 / L3
8	68	88%	12%	L2
9	64	84%	16%	L2
10	143	80%	20%	L2
11	98	83%	17%	L2
12	138	80%	20%	L2
13	54	35%	65%	-
14	84	45%	55%	-
15	106	39%	61%	-
16	88	34%	66%	-

Tab. 3: Anzahl der analysierten revertierten Seitentriebe der periklinalen Chimären und deren Segregation in der nächsten Generation. Wie in der Tabelle angegeben, wurden 16 Einzelpflanzen mit je einem phänotypisch komplett revertierten Seitentrieb gefunden. In der nächsten Generation wurden die auftretenden Phänotypen ausgezählt. Die Pflanzen Nr. 1-7 konnte als L1- oder L3-Reversionen klassifiziert werden, die Pflanzen Nr. 8-12 als L2-Reversionen und die restlichen ergaben kein klares Bild. n = Gesamtzahl ausgewerteter Pflanzen in der Folgegeneration, Wildtyp = wildtypischer Phänotyp in der Folgegeneration, Mutant = *clv*-mutanter Phänotyp in der Folgegeneration, - = Reversionsereignis wegen unklarer Segregation nicht einer meristematischen Schicht zuzuordnen.

3.1.2 Immunolokalisierung: In welchen Zellen ist das CLV3-Protein nachweisbar ?

In einem zweiten Schritt sollte das CLV3-Protein im Sproßapex lokalisiert werden, um weitere Hinweise auf eine mögliche Sekretion von CLV3 zu erhalten. Eine Sekretion ist wahrscheinlich, wenn das CLV3-Protein in einer größeren Domäne als die *CLV3*-mRNA detektiert werden kann. Alternativ ist auch eine interzelluläre Verteilung des CLV3-Proteins möglich.

Getestet wurden dazu sowohl polyklonale Antikörper gegen ein synthetisches Peptid aus einer konservierten Domäne im N-terminalen Bereich des CLV3-Proteins als auch polyklonale Antikörper gegen ein CLV3-GST Fusionsprotein. Es wurden Infloreszenzen von *Columbia* und von *clv1-4* Mutanten fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Auf diesen Gewebeschnitten wurde mit den aufgereinigten polyklonalen Antikörpern eine Immunolokalisierung des CLV3-Proteins durchgeführt.

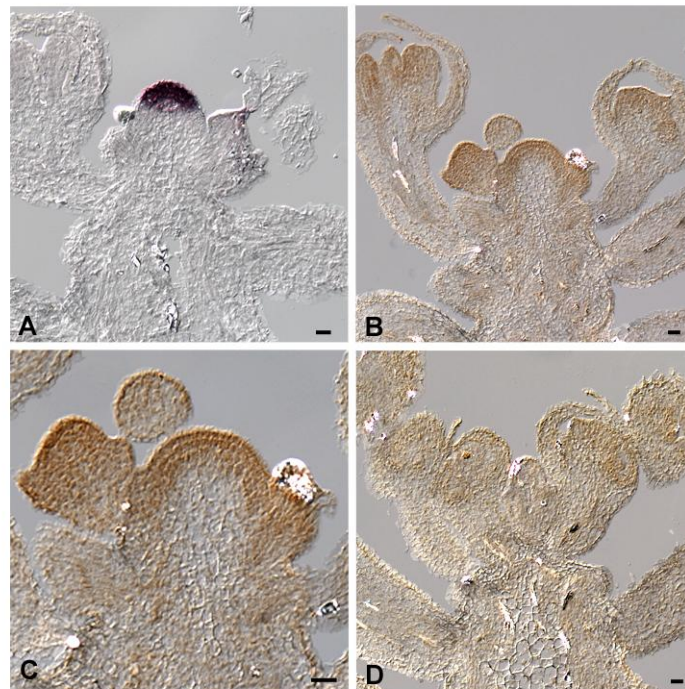


Abb.2: Vergleich des *CLV3*-RNA-Musters und der erhaltenen Signale in der Immunolokalisierung des *CLV3*-Proteins in *clv1-4*-Mutanten. (A) *CLV3* ist in *clv1-4*-Mutanten in der vergrößerten zentralen Zone des Meristems exprimiert. (B, C) Polyklonale Antikörper gegen ein *CLV3*-GST-Fusionsprotein zeigten ein Signal im Sproß- und Blütenmeristem, einschließlich der Primordien. (D) Eine Färbereaktion mit Präimmunsereum lieferte eine leichte Hintergrundfärbung. Maßstab: 20 µm

Wie in Abb.2 B und Abb.2 C dargestellt, konnte in der Immunolokalisierung mit beiden getesteten Antikörpern ein Signal im kompletten Meristem, einschließlich der Primordien und in den Blütenmeristemen nachgewiesen werden, dargestellt im Vergleich zur *CLV3*-RNA-Expression in der zentralen Zone des Meristems (Abb.2A). Das getestete Präimmun-Serum lieferte eine deutlich schwächere Hintergrundfärbung in einem vergleichbaren Muster, deren Stärke abhängig vom Spendertier war (Abb.2 D).

Auch nach verschiedenen Testexperimenten brachte die Immunolokalisierung keine klaren Aussagen darüber, ob es sich bei dem erhaltenen Signal um eine generell unspezifische Färbung handelte, mit der alle kleineren, kompakten Zellen in der Pflanze angefärbt worden sind. Nachdem *CLV3*-RNA nur in den undifferenzierten Zellen der zentralen Zone nachzuweisen ist, entspricht es nicht den Erwartungen, daß *CLV3*-Protein in den sich differenzierenden Organprimordien zu detektieren. Möglicherweise wurden mit den polyklonalen Antikörpern zusätzlich weitere Mitglieder der *CLE*-Familie (*CLV3/ESR* related genes) zu der auch *CLV3* gehört, detektiert (Cock und McCormick, 2001).

3.1.3 Ist die putative Signalsequenz verantwortlich für eine Sekretion von *CLV3* ?

Im *CLV3*-Protein wirken 18 AS im N-terminalen Bereich möglicherweise als Signalsequenz und könnten für eine Sekretion des Proteins verantwortlich sein (Fletcher et al., 1999). Um diese Hypothese experimentell zu untermauern, wurde *CLV3*-cDNA mit GFP (Green Fluorescent Protein) fusioniert. Im Plasmid pNB3 wurde die komplette *CLV3*-cDNA translational mit dem N-Terminus von GFP fusioniert und unter Kontrolle des *35SCaMV*-Promotors exprimiert. In einem zweiten Plasmid (pNB3a) wurde die *CLV3*-cDNA ohne das putative Signalpeptid translational mit GFP fusioniert. Mit diesen beiden *CLV3*-GFP-Fusionen wurden erst Zwiebelepidermiszellen transformiert und in einem weiteren Experiment BY2-Protoplasten transfiziert, um das Fusionsprotein in den Zellen zu lokalisieren.

3.1.3.1 Ballistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen

In einem ersten Schritt wurden pNB3 und pNB3a sowie die Vektorkontrolle pCKGFP in Zwiebelepidermiszellen transformiert, um die Verteilung beider *CLV3*-GFP-Fusionsproteine in den Zellen zu lokalisieren.

Hierzu wurden Wolframpartikel mit der DNA beschichtet und mit Hilfe einer Particle-Gun in die Zwiebelzellen gebracht. Die Auswertung erfolgte nach 12-stündiger Inkubation mit Hilfe eines Fluoreszenz-Binokulars. Bei erfolgter Sekretion von *CLV3*-GFP müßte erwartungsgemäß ein Zell-Zell-Transport in die benachbarten Zellen detektierbar sein, indem nicht nur die transformierte Zelle fluoresziert. Dieses Ergebnis müsste dann in Abhängigkeit mit der putativen Signalsequenz zu beobachten sein.

Tatsächlich konnte fluoreszierendes GFP in allen Fällen nur in den jeweils transformierten Einzelzellen detektiert werden. Eine unterschiedliche zelluläre Verteilung von *CLV3*-GFP mit und ohne putativer Signalsequenz wurde ebenfalls nicht beobachtet (Abb.3). In allen transformierten Zellen fluoreszierten das Cytoplasma und der Zellkern grün. Zusammenfassend kann lediglich geschlossen werden, daß der experimentelle Ansatz in dem gewählten System nicht geeignet war, die biologische Funktion der putativen Signalsequenz von *CLV3* zu klären.

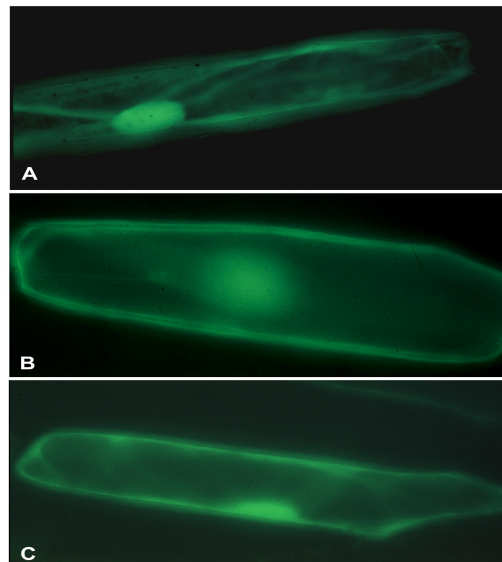


Abb.3: CLV3-GFP in Zwiebelepidermiszellen. (A) Die Transformation des Kontrollvektors *pCKGFP* führte zu einem starken GFP Signal im vakuolisierten Cytoplasma und im Kern der Zwiebelepidermiszellen. (B) CLV3-GFP mit putativer Signalsequenz (pNB3) und (C) CLV3-GFP ohne putative Signalsequenz (pNB3a) zeigten ein identisches Fluoreszenzsignal.

3.1.3.2 Transiente Transfektion von BY2-Protoplasten

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden BY2-Protoplasten mit pNB3 und pNB3a sowie mit der Vektorkontrolle *pCKGFP* transient transfiziert. Die BY2-Protoplasten sind besonders gut geeignet, um die Verteilung eines Proteins innerhalb der Zelle darzustellen. Wenn CLV3 sekretiert wird, müßte erwartungsgemäß ein CLV3-GFP Signal im Endoplasmatischen Reticulum oder membranassoziiert zu detektieren sein.

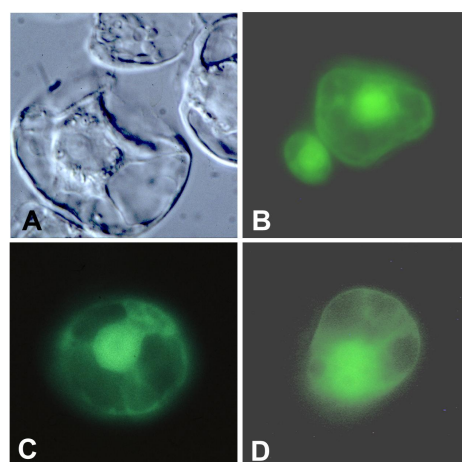


Abb.4: CLV3-GFP in BY2-Protoplasten. (A) Nomarsky-Aufnahme eines typischen BY2-Protoplasten. (B) Die Transformation des Kontrollvektors *pCKGFP* führte zu einem starken GFP Signal im Cytoplasma der BY2-Protoplasten. (C) CLV3-GFP mit putativer Signalsequenz (pNB3) und (D) CLV3-GFP ohne putative Signalsequenz (pNB3a) zeigten in ein identisches Fluoreszenzsignal im Cytoplasma.

Es konnte kein Unterschied zwischen pNB3 und pNB3a in den Protoplasten festgestellt werden (Abb.4). Beide CLV3-GFP-Fusionsproteine lieferten ein Fluoreszenz-Signal im gesamten Cytoplasma. Auch dieses heterologe Testsystem ließ sich also nicht erfolgreich zur Beantwortung der Frage einsetzen, ob die Signalsequenz in CLV3 tatsächlich für die Sekretion des Proteins verantwortlich ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß weder die Immunolokalisierung des CLV3 - Proteins, noch die Experimente mit den beiden CLV3-GFP-Fusionen klare Ergebnisse geliefert haben. Nur die Analyse der periklinalen Chimären deutet auf eine Sekretion von CLV3 hin.

3.2 Konstitutive CLV3-Expression: Sind Intensität und Ort der CLV3-Expression relevant für die Kontrolle der meristematischen Aktivität ?

Die wildtypische Expression von *CLV3* ist auf die zentrale Zone des Meristems begrenzt, so daß sich die Frage stellt, inwieweit eine ektopische Expression von *CLV3* die Entwicklung der Pflanze verändert. Die *CLV3*-cDNA wurde deshalb sowohl an den starken konstitutiven *CaMV35S*-Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus als auch an den *HisH4*-Promotor fusioniert. *35S::CLV3* führte zur ektopischen Expression von *CLV3* in der kompletten Pflanze, wie dies in Abb.5B exemplarisch anhand einer *in-situ*-Hybridisierung im *clv2-1*-mutanten Hintergrund dargestellt ist.

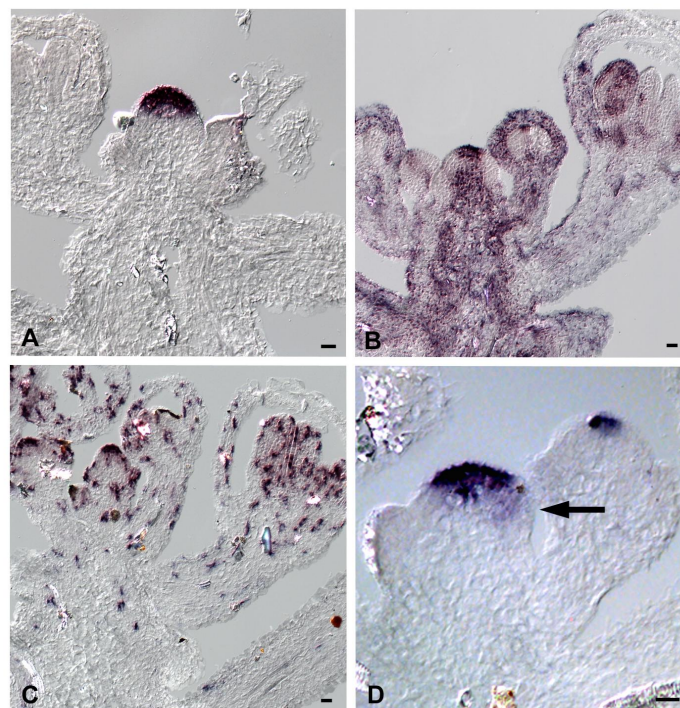


Abb.5: Ektopische CLV3 Expression im *clv*-mutanten Hintergrund. (A) *CLV3* ist ausschließlich in der vergrößerten zentralen Zone des Meristems von *clv2-1* Mutanten exprimiert. (B) In transgenen *35S::CLV3 clv2-1*-mutanten Pflanzen ist *CLV3* ektopisch in der kompletten Pflanze exprimiert. (C) Die Expression von *CLV3* unter Kontrolle des *HisH4*-Promotors führt in transgenen *clv2-1*-mutanten Pflanzen zu punktförmig in der Pflanze verteilten *CLV3*-RNA-Signalen. (D) Unterhalb der endogenen *CLV3*-Expression ist in transgenen *clv1-4*-Mutanten schwach die Expression von *UFO::CLV3* erkennbar. Maßstab: 20 µm

Eine besonders starke Expression von *35S::CLV3* konnte in den Blättern und im Grundgewebe der Pflanze detektiert werden. Die Expression von *HisH4::CLV3* beschränkte sich auf die gerade teilungsaktiven Zellen in der gesamten Pflanze (Abb.5 C). Das führte zu einer eher punktuellen Expression von *CLV3*, die gehäuft in den Primordien und den Blüten auftrat, also besonders im teilungs- und wachstumsaktiven Gewebe rund um die Sproßspitze. Der *HisH4*-Promotor kontrollierte ebenfalls konstitutiv eine starke, ektopische *CLV3*-Expression, allerdings in weitaus weniger Zellen als der *35S*-Promotor.

In einem dritten Fehlexpressions-Experiment wurde *CLV3* unter Kontrolle des *UFO*-Promotors ektopisch nur im Meristem exprimiert. In diesem Ansatz sollte analysiert werden, ob die Richtung des *CLV3*-Signals im Meristem ein wesentlicher Faktor für die Kontrolle der meristematischen Aktivität ist. Der *UFO*-Promotor kontrolliert die *CLV3*-Expression in einer tassenförmigen Domäne direkt unterhalb der zentralen Zone, d.h. unterhalb der endogenen *CLV3*-Expressionsdomäne (Abb.5 D). Später im Blütenmeristem reguliert *UFO* die Expression in den Achseln der Primordien.

Im Unterschied zu *35S::CLV3* und *HisH4::CLV3* wird *UFO::CLV3* folglich nicht in der endogenen *CLV3*-Domäne konstitutiv exprimiert. Mit den *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Transgenen läßt sich folglich die Frage nach der Relevanz der Intensität des *CLV3*-Signals beantworten. Mit dem *UFO::CLV3*-Transgen hingegen kann die Frage beantwortet werden, ob der Expressionsort und damit die Richtung des *CLV3*-Signals im Meristem einen entscheidenden Einfluß auf die Pflanzenentwicklung haben.

Die korrekte Expression des Transgens in den Pflanzen wurde mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung kontrolliert. Die Beobachtung, daß die Transgene keine Auswirkung auf den Phänotyp der in Abb.5 gezeigten *clv*-Mutanten haben, wird in Kap.3.2.6 näher erläutert. Hier soll sich zunächst auf die Darstellung der Expressionsmuster beschränkt werden.

3.2.1 *35S::CLV3*: Das Meristem der transgenen Pflanzen verliert frühzeitig seine Aktivität

Zunächst wurde das beschriebene *35S::CLV3*-Transgen in *Columbia* transformiert. Die erhaltenen transgenen Pflanzen wurden dann in der T1-Generation analysiert, um auch die starken, nicht fertilen Phänotypen erfassen zu können. Der grundsätzliche Effekt einer konstitutiven Expression von *CLV3* in der kompletten Pflanze kann zunächst anhand einer 3 Wochen alten *35S::CLV3*-Pflanze verdeutlicht werden (Abb.6 B). Das Meristem verlor verfrüht seine Aktivität und neue Blätter (Abb.6 A) wurden nicht kontinuierlich gebildet. Die transgenen Pflanzen bildeten im Verlauf ihrer Entwicklung häufig Adventivmeristeme, die jedoch nach der Bildung einiger Blätter ihre Funktion immer wieder einstellten. Ein solches Adventivmeristem ist in Abb.6 C als longitudinaler Schnitt in einer RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit starkem ektopischen *CLV3*-Signal dargestellt. Die Expression von *35S::CLV3* in den transgenen *Columbia*-Pflanzen entsprach dabei dem bereits in Kap.3.2 beschriebenen ektopischen Muster.

Die transgenen Pflanzen lieferten eine Spannbreite an Phänotypen und wurden entsprechend ihrer Stärke in drei Klassen eingeteilt: Klasse-I = starke Phänotypen, Klasse-II = intermediäre Phänotypen und Klasse-III = schwache Phänotypen. Phänotypisch wurden die Pflanzen mehrmals im Alter von 3-

20 Wochen charakterisiert. Transgene Klasse-I-Pflanzen (Abb.6 D, E) bildeten bis zum Alter von 20 Wochen lediglich eine Blattrosette mit bis zu 20 – 30 Blättern, die überwiegend wildtypisch aussahen. In einigen Fällen war die Blattspreite nach innen verdreht oder die Blätter an der Basis fusioniert. Bei diesen Pflanzen bildete sich ein meist endständiges, trichterförmiges Blatt (Abb.6P). Die Detailaufnahme des SAM einer Klasse-I-Pflanze in Abb.6 E zeigt, daß in diesen Blattrosetten keine kontinuierliche Bildung neuer Blätter erfolgte und die normale Meristemstruktur fehlte.

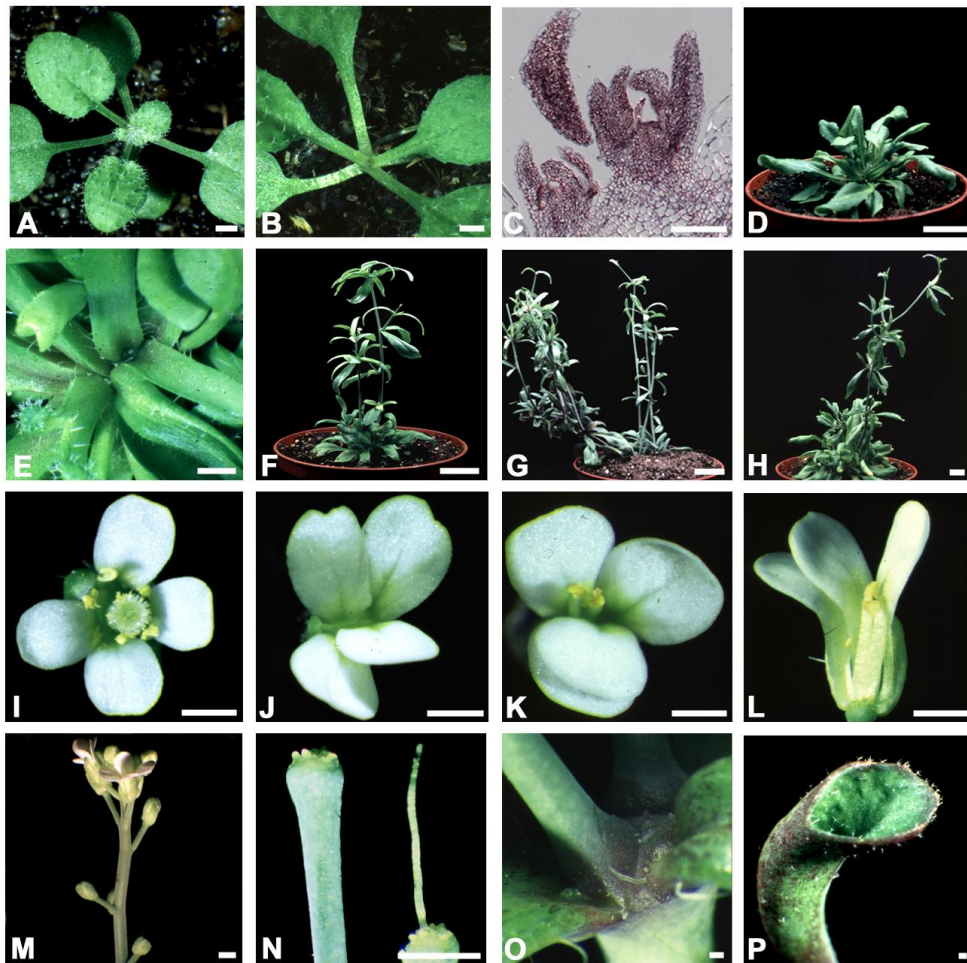


Abb.6: Phänotypische Merkmale 35S::CLV3-transgener Pflanzen. (A) Wildtypische *Columbia* Pflanze im Alter von 3 Wochen. (B) Klasse-I 35S::CLV3-Phänotyp in *Columbia* im Alter von 3 Wochen. Das Meristem verlor nach der Bildung von 3 Rosettenblättern seine Aktivität. (C) *In-situ*-Hybridisierung mit einer CLV3-Sonde auf einer 35S::CLV3-Pflanze. CLV3 ist ektopisch exprimiert und die Pflanze bildet defekte Adventivmeristeme. (D, E) Starker Klasse-I-Phänotyp in *Columbia* im Alter von 12 Wochen. Die Pflanzen bildeten ausschließlich Rosettenblätter. (F) Intermediärer Klasse-II-Phänotyp in *Columbia* mit den charakteristischen Luftrosetten. (G) Schwacher Klasse-III-Phänotyp im *Columbia* Hintergrund. Diese transgenen Pflanzen bilden neben Luftrosetten zahlreiche reduzierte Blüten. (H) Klasse-II-Phänotyp im *clv3-8*-mutanten Hintergrund. Die Pflanzen zeigten ebenfalls die Merkmale der ektopischen Expression von CLV3. (I) Wildtypische *Arabidopsis* Blüte. (J-L) Defekte Blüten von 35S::CLV3-Pflanzen. Die Organe der beiden inneren Wirtel fehlen ganz oder teilweise. (M) Charakteristische Infloreszenz eines Klasse-III-Phänotypen. Die älteren Blüten sind abortiert und die jüngeren wie vorangehend beschrieben reduziert. (N) Pedicel zweier reduzierter 35S::CLV3-Blüten ohne bzw. mit einem Karpell. (O) Detailaufnahme einer typischen 35S::CLV3-Luftrosette. (P) Ein trichterförmiges, an der Basis fusioniertes Blatt. In 35S::CLV3-Pflanzen traten solche Blätter typischerweise endständig an Blattrosetten auf. Maßstab: A,C,E = 2mm; D,F,G,H = 2cm; I-P = 0,5 cm; B = 30 µm

Der gleiche Effekt trat bei den intermediären Klasse-II-Pflanzen auf (Abb.6 F). Diese Pflanzen produzierten neben der oben beschriebenen Blattrosette auch einen Sproß, bei denen aber keine Infloreszenz, sondern eine oder mehrere Luftrosetten initiiert wurden. Vereinzelt wurden Blüten gebildet, denen die Organe der beiden inneren Wirtel ganz (Abb.6 J) oder teilweise (Abb.6 K, L) fehlten. Sepalen und Petalen hingegen waren vollzählig vorhanden. Die Blüten waren nur selten fertil, meist fehlten die Karpelle vollständig oder waren nur einzeln vorhanden (Abb.6 N). Die Klasse-III-Pflanzen zeigten einen schwachen Phänotyp (Abb.6 G). Diese transgenen Pflanzen bildeten eine ebenfalls vergrößerte Blattrosette und mehrere Seitentriebe mit den charakteristischen Luftrosetten (Abb.6 O). Außerdem fanden sich zahlreiche reduzierte Blüten, wobei vereinzelt fertile Blüten auftraten, von denen dann auch Samen geerntet werden konnten. Abb.6 M zeigt eine solche charakteristische Klasse-III-Infloreszenz mit einigen abortierten Blüten. Alle drei phänotypischen Klassen traten auch im starken *clv3-8*-mutanten Hintergrund auf. Exemplarisch ist in Abb.6 H eine Klasse-II Pflanze abgebildet. Das *35S::CLV3*-Transgen komplementierte den *clv3-8* mutanten Phänotyp also nicht nur, sondern lieferte darüber hinaus auch den Phänotyp einer ektopischen Expression von *CLV3*.

<i>35S::CLV3</i> in	P ⁿ	Anzahl Pflanzen in den Phänotypklassen			
		I	II	III	WT
<i>Col</i>	51	69%	14%	6%	12%
<i>Ler</i>	64	17%	77%	2%	5%
<i>clv3-8</i>	60	55%	27%	18%	0%

Tab. 4: Anzahl transgener *35S::CLV3* Pflanzen (T1-Generation) in den drei verschiedenen Phänotypklassen. Analysiert wurde *35S::CLV3* in den wildtypischen Ökotypen *Columbia* (*Col*) und *Landsberg* (*Ler*) sowie in *clv3-8*-Mutanten. Pⁿ = absolute Anzahl analysierter Pflanzen, Phänotypklassen: I = starker Phänotyp, II = intermediärer Phänotyp, III = schwacher Phänotyp, WT = wildtypischer Phänotyp

Die verschiedenen phänotypischen Klassen traten unterschiedlich häufig auf – zusammengefaßt sind die Zahlen in Tab. 4. Die transgenen Pflanzen zeigten im *Columbia*-Hintergrund zu 69% Klasse-I-, zu 14% Klasse-II- und zu 6% Klasse-III-Phänotypen. 12% der Pflanzen sahen nahezu wildtypisch aus. In *Landsberg erecta* war das Verhältnis zwischen Klasse-I- und Klasse-II-Phänotyp umgekehrt. Hier zeigten lediglich 17% den Klasse-I-Phänotypen der Blattrosette und 77% Klasse-II-Phänotyp. Nur 2% waren Klasse-III-Pflanzen und 5% sahen nahezu wildtypisch aus. Auch in dem *clv3-8*-mutantem Hintergrund bewirkte *35S::CLV3* zu 55% einen Klasse-I-, zu 27% einen Klasse-II- und zu 18% Klasse-III-Phänotypen.

Von den wenigen fertilen Blüten wurden Samen abgeerntet und zur Keimung gebracht, um zu prüfen, ob die Phänotypen in der T2-Generation wieder stabil auftreten. Die Werte sind in Tab. 5 angegeben. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß transgene *35S::CLV3*-Pflanzen nicht grundsätzlich ihre meristematische Funktion verloren. Stattdessen wurden während der gesamten Entwicklung kontinuierlich Adventivmeristeme gebildet. Diese Meristeme stellten aber nach der Bildung weniger Organe ihre Aktivität immer wieder verfrüht ein. Insbesondere der intermediäre Phänotyp dieser *35S::CLV3*-Pflanzen wies eine starke Ähnlichkeit mit dem Phänotyp von *wus*-Mutanten auf. Auf diesen Aspekt soll in Kap. 3.2.4 näher eingegangen werden.

35S::CLV3 in	P ⁿ	Anzahl Pflanzen in den Phänotypklassen der T2 Generation			
		I	II	III	WT
<i>Col</i>	15	0%	0%	80%	20%
<i>Ler</i>	35	20%	46%	11%	23%
<i>clv3-8</i>	50	18%	4%	64%	14%

Tab. 5: Segregation der 35S::CLV3 Phänotypen in der T2-Generation. Analysiert wurde 35S::CLV3 in den wildtypischen Ökotypen *Columbia* und *Landsberg* sowie in *clv3-8* Mutanten. Pⁿ = absolute Anzahl analysierter Pflanzen, Phänotypklassen: I = starker Phänotyp, II = intermediärer Phänotyp, III = schwacher Phänotyp, WT = wildtypischer Phänotyp

3.2.2 *HisH4::CLV3*: Transgene Pflanzen zeigen einen Phänotyp wie 35S::CLV3-Pflanzen

Wie in Kap. 3.2 beschrieben, ist *CLV3* unter Kontrolle des *HisH4*-Promotors in den transgenen Pflanzen nur in den gerade teilungsaktiven Zellen überwiegend im Meristem, jungen Blättern und sich entwickelnden Blüten exprimiert. Der *HisH4*-Promotor kontrolliert also konstitutiv eine starke *CLV3*-Expression, aber in weitaus weniger Zellen als der 35S-Promotor (Abb.7 C). Trotzdem traten bei den 35S::CLV3-Transgenen vergleichbare Phänotypen auf, wobei starke Klasse-I-Pflanzen weniger häufig waren (Tab. 6).

<i>HisH4::CLV3</i> in	P ⁿ	Anzahl Pflanzen in den Phänotypklassen			
		I	II	III	WT
<i>Col</i>	48	44%	54%	2%	0%
<i>Ler</i>	71	3%	49%	48%	0%
<i>clv3-8</i>	46	4%	61%	35%	0%

Tab. 6: Anzahl transgener *HisH4::CLV3* Pflanzen (T1 Generation) in den drei verschiedenen Phänotypklassen. Analysiert wurde 35S::CLV3 in den wildtypischen Ökotypen *Columbia* und *Landsberg* sowie in *clv3-8* Mutanten. Pⁿ = absolute Anzahl analysierter Pflanzen Phänotypklassen: I = starker Phänotyp, II = intermediärer Phänotyp, III = schwacher Phänotyp, WT = wildtypischer Phänotyp

Überwiegend konnten bei 54% der Pflanzen im *Columbia*-, 49% der Pflanzen im *Landsberg*- und 61% im *clv3-8*-mutanten Hintergrund die Klasse-II-Phänotypen detektiert werden (Abb.7 D,E). Auch die *HisH4::CLV3*-Blüten zeigten die gleichen Defekte wie die 35S::CLV3-Transgene (Abb.7 H, I), die sich im Verlust von Organe in den beiden inneren Wirteln äußerten. Im Gegensatz zum vegetativen Stadium, in dem *HisH4::CLV3*-Pflanzen weniger häufig einen starken Phänotyp zeigten als 35S::CLV3-Pflanzen, waren die Blüten in diesem Genotypen stärker defekt. Lediglich eine einzelne *HisH4::CLV3*-Pflanze im *clv3-8*-Hintergrund bildete einige fertile Blüten, von denen Samen geerntet und zur Keimung gebracht wurden. In der T2-Generation traten keine Klasse-I-Pflanzen auf (Tab. 7). Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Meristeme *HisH4::CLV3*-transgener

Pflanzen ebenso wie der *35S::CLV3*-Transgenen zwar Meristeme initiieren, diese ihre Aktivität aber frühzeitig wieder verlieren.

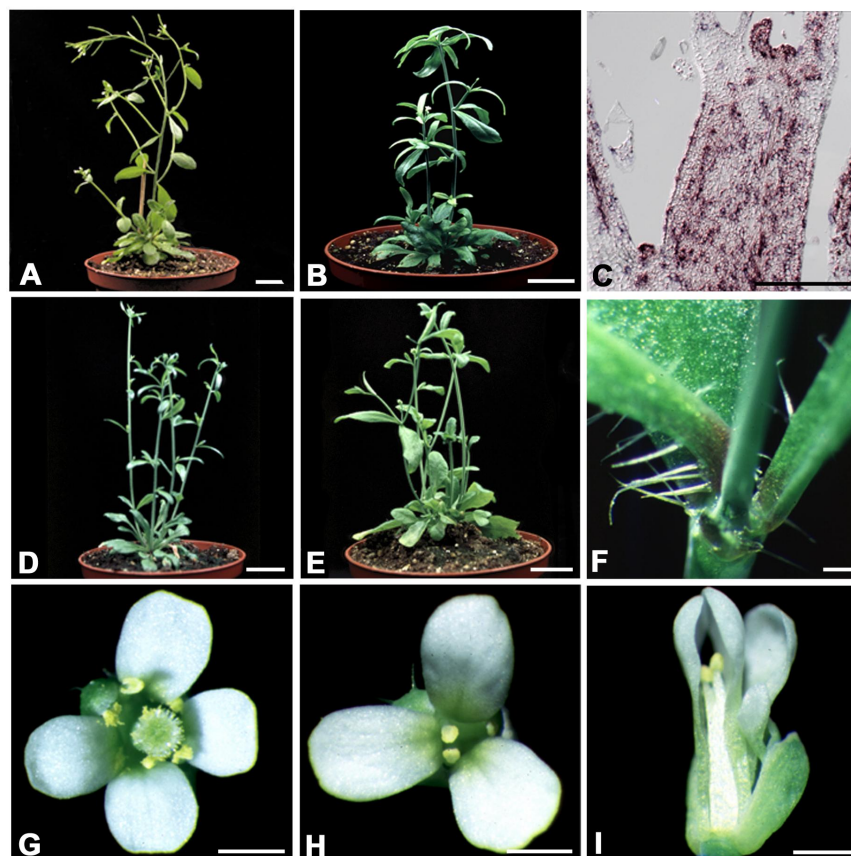


Abb.7: Phänotypische Merkmale *HisH4::CLV3*-transgener Pflanzen. (A) Wildtypische *Columbia*-Pflanze im Alter von 6 Wochen. (B) Klasse-II-Phänotyp einer *35S::CLV3*-Pflanze. (C) *In-situ*-Hybridisierung mit einer *CLV3*-Sonde auf Gewebe einer *HisH4::CLV3*-transgenen *Columbia* Pflanze. Die Pflanze exprimiert *CLV3* im charakteristischen punktförmigen Muster - zwei Adventivmeristeme sind sichtbar. (D) Klasse-II-Phänotyp einer *HisH4::CLV3*-Pflanze im *Columbia* Hintergrund im Alter von 7 Wochen. Die Pflanze zeigt die charakteristischen Luftrosetten und bildet vereinzelt defekte Blüten. (E) Klasse-II-Phänotyp einer *HisH4::CLV3/clv3-8*-Pflanze im Alter von 7 Wochen. (F) Detailaufnahme einer charakteristischen Luftrosette. (G) Wildtypische *Arabidopsis* Blüte. (H, I) Defekte *HisH4::CLV3*-Blüte. Die Organe der inneren beiden Wirtel fehlen ganz oder teilweise. Maßstab: A,B,D,E = 2cm; F,G,H,I = 0,5 cm; C = 30 μ m

<i>HisH4::CLV3</i> in	P ⁿ	Anzahl Pflanzen in den Phänotypklassen der T2 Generation			
		I	II	III	WT
<i>clv3-8</i>	16	0%	38%	38%	25%

Tab. 7: Anzahl transgener *HisH4::CLV3* Pflanzen (T2 Generation) in den drei verschiedenen Phänotypklassen. Analysiert wurde *HisH4::CLV3* in der T2 Generation in *clv3-8* Mutanten. Pⁿ = absolute Anzahl analysierter Pflanzen Phänotypklassen: I = starker Phänotyp, II = intermediärer Phänotyp, III = schwacher Phänotyp, WT = wildtypischer Phänotyp

3.2.3 *UFO::CLV3*: *CLV3*-Expression unterhalb der zentralen Zone führt zum Verlust meristematischer Aktivität

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Richtung des *CLV3*-Signals im Meristem ein wesentlicher Faktor für die Kontrolle der meristematischen Aktivität ist.

Das beschriebene *UFO::CLV3* Transgen wurde deshalb in *Columbia* und in *clv3-8*-Mutanten transformiert. Die transgenen Pflanzen wurden dann in der T1-Generation analysiert und in die phänotypischen Klassen I-III eingeteilt, die bereits für die *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Pflanzen eingeführt wurden.

Die erste Auswertung der *UFO::CLV3*-Pflanzen erfolgte im Alter von knapp 3 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten von insgesamt 280 transgenen Pflanzen nur 18% einen Phänotyp wie er auch schon für *35S::CLV3* beschrieben wurde: die Pflanzen zeigten einen Verlust an meristematischer Aktivität, die Rosettenblätter wurden nicht mehr kontinuierlich gebildet. Die restlichen Pflanzen sahen zu diesem Entwicklungszeitpunkt wildtypisch aus und zeigten erst in der regenerativen Phase die charakteristischen Phänotypen (Abb.8).

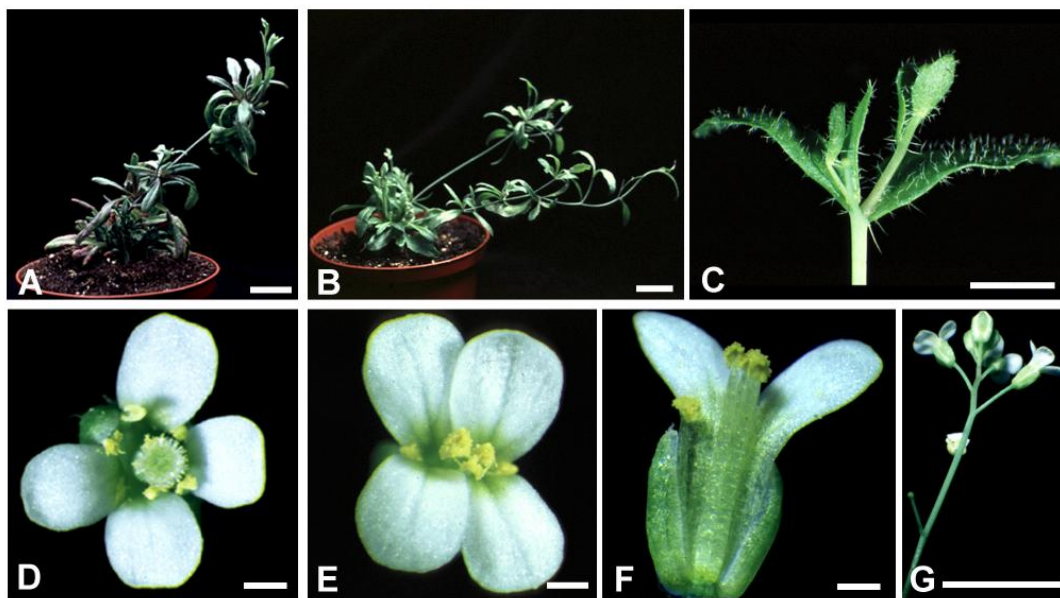


Abb.8: Transgene *UFO::CLV3*-Pflanzen verlieren ihre wildtypische meristematische Funktion. (A) Klasse-II-Phänotyp einer *35S::CLV3*-transgenen Pflanze im Alter von 12 Wochen. (B) Klasse-II-Phänotyp einer *UFO::CLV3*-transgenen Pflanze im Alter von 12 Wochen. (C) Detailaufnahme einer charakteristischen *UFO::CLV3*-Luftrosette. (D) Wildtypische Blüte von *Arabidopsis*. (E, F) Defekte Blüte einer *UFO::CLV3*-transgenen Pflanze. Die Organe der beiden inneren Wirtel fehlen ganz oder teilweise. (G) Typische Infloreszenz einer *UFO::CLV3*-Pflanze mit schwachem Klasse-III-Phänotyp. Es werden kaum Schoten gebildet, da den Blüten die inneren Organe fehlen. Maßstab: A,B = 2 cm; C-G = 0,5 cm

Weder in *UFO::CLV3*- noch in *UFO::CLV3/clv3-8*-Pflanzen traten starke Klasse-I-Phänotypen wie in *35S::CLV3* auf, also Pflanzen die ausschließlich Rosettenblätter bildeten. Der Klasse-II-Phänotyp war in *UFO::CLV3*-Pflanzen mit 13% der Gesamtzahl vertreten (Tab. 8 und Abb.8 B). Die Pflanzen produzierten vergleichbar mit *35S::CLV3* die charakteristischen Luftrosetten (Abb.8 C) und vereinzelte defekte Blüten. Die *UFO::CLV3*-Blüten bildeten im Durchschnitt lediglich 4,3 Stamen und 0,6

Karpelle, im Gegensatz zur wildtypischen Blüte mit 6 Stamen und 2 Karpellen (Abb.8 D-F und Abb.9). Am häufigsten war unter den *UFO::CLV3*- und *UFO::CLV3/clv3-8*-Pflanzen der schwache Klasse-III-Phänotyp mit 73% bzw 57% (Tab. 8) vertreten. Diese Pflanzen produzierten Infloreszenzen (Abb.8 G) mit den schon genannten defekten Blüten, von denen einzelne fertil waren. 14% der *UFO::CLV3*-Pflanzen im *Columbia*- und 43% im *clv3-8*-mutanten Hintergrund waren im Alter von 8 Wochen wildtypisch. Eine *CLV3*-Expression unterhalb der zentralen Zone in der *UFO*-Domäne kann folglich den starken mutanten Phänotyp von *clv3-8* komplementieren und darüber hinaus den charakteristischen Phänotyp einer *CLV3*-Überexpression verursachen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression von *CLV3* unterhalb der endogenen Domäne den Verlust von meristematischer Aktivität bewirkt. Das *CLV3*-Protein kann also auch außerhalb der endogenen Domäne wirken und an den *CLV1/2*-Rezeptor in den darüberliegenden Zellen binden. Die Richtung, aus der das *CLV3*-Protein kommt, spielt folglich keine Rolle. Das Protein wird anscheinend nicht spezifisch modifiziert, wenn es in der wildtypischen Situation von den äußeren Zellschichten in die tieferen Zellen zum *CLV1/2*-Rezeptor sekretiert wird.

Anzahl Pflanzen in den Phänotypklassen					
<i>UFO::CLV3</i> in	P ⁿ	I	II	III	WT
<i>Col</i>	196	0%	13%	73%	14%
<i>clv3-8</i>	7	0%	0%	57%	43%

Tab. 8: Anzahl transgener *UFO::CLV3*-Pflanzen in den verschiedenen phänotypischen Klassen. Die Daten wurden in der T1 Generation im Alter von 8 Wochen erhoben. Pⁿ = Anzahl analysierter Pflanzen Phänotypklassen: I = starker Phänotyp, II = intermediärer Phänotyp, III = schwacher Phänotyp, WT = wildtypischer Phänotyp

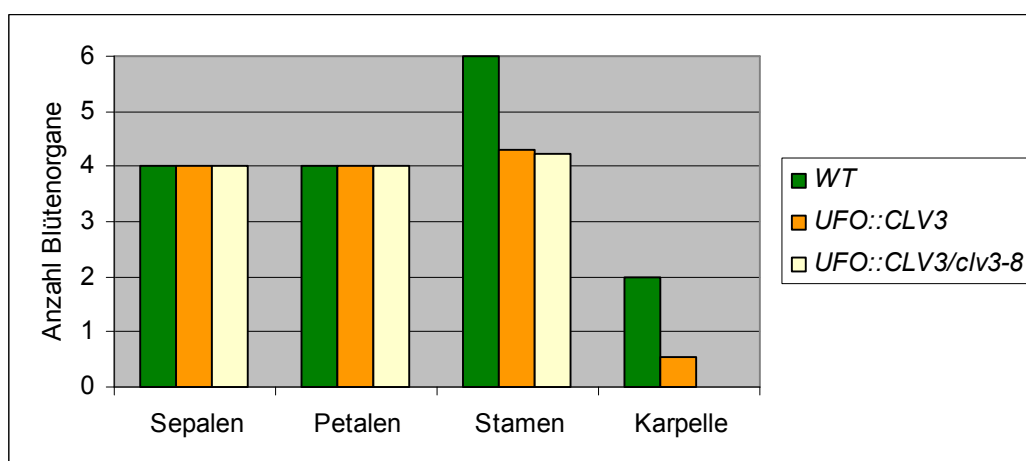


Abb.9: Anzahl Blütenorgane in transgenen *UFO::CLV3*- und *UFO::CLV3/clv3-8*-Pflanzen. Die Anzahl der Stamen und Karpelle in den transgenen Pflanzen war verringert. Es wurden 61 Blüten von *UFO::CLV3*, 22 Blüten von *UFO::CLV3/clv3-8* sowie 15 *Columbia* Blüten ausgewertet.

Die Wirkung von CLV3 als Signalmolekül (Rojo et al., 2002) und die direkte Bindung von CLV3 an den CLV1/2-Rezeptor (Trotochaud et al., 2000) konnte zwischenzeitlich gezeigt werden. Beides wird in den Kapiteln 4.1 und 4.2 ausführlich diskutiert und soll an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden.

Um die Wirkung des *UFO::CLV3*-Transgens näher zu analysieren, wurden *UFO::CLV3*-transgene Embryonen mittels RNA-in-situ-Hybridisierung untersucht. In den nicht transgenen *clv3-8*-Kontrollembryonen (Abb.10 A) konnte *CLV3*-Expression in der zentralen Zone des Meristems nachgewiesen werden. In den transgenen *UFO::CLV3*-Embryonen hingegen wurde *CLV3*-Expression nur unterhalb der normalen *CLV3*-Domäne im *UFO*-Muster detektiert (Abb.10 B). Die Expression von *CLV3* unter Kontrolle des endogenen Promotors war reprimiert und nicht mehr nachweisbar. Das *UFO::CLV3*-Transgen war also in der Lage die endogene *CLV3*-Expression in der zentralen Zone zu reprimieren.

CLV3 wirkt in diesem Fall - anstatt aus den oberen Meristemschichten - von der tiefen L3 des Meristems aus und verursacht bei Expression in der *UFO*-Domäne den Verlust von *CLV3*-Expression in der zentralen Zone. Diese Ergebnis legt nahe, daß *CLV3*-Expression selbst ein indirektes Ziel des *CLV*-Signaltransduktionsweges ist und daß *CLV3* über einen negativen Feedback-Regulationsmechanismus reguliert werden könnte. Eine Erhöhung der *CLV3*-Gendosis, die wie in Kap. 3.2.5 beschrieben keinen Effekt zeigt, unterstützt diese Hypothese.

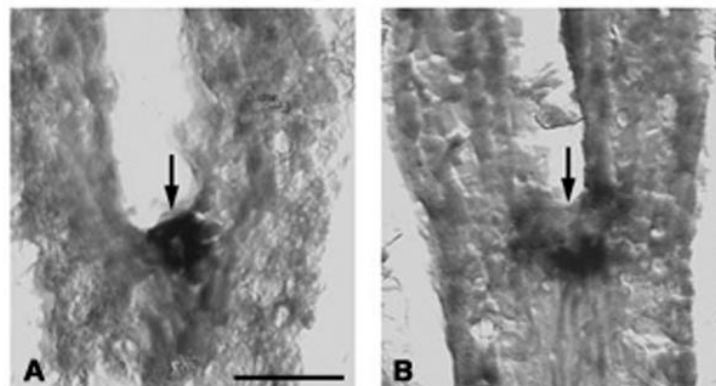


Abb.10: Die Expression von *UFO::CLV3* bewirkt eine Repression von *CLV3* unter Kontrolle des endogenen Promotors. (A) Im nicht transgenen *clv3-8*-Embryo ist *CLV3* in der zentralen Zone des Meristems exprimiert - das *CLV3*-Protein ist in dieser Mutante nicht funktionell. (B) Im transgenen Embryo ist *CLV3* im *UFO*-Muster direkt unterhalb der *CLV3*-Domäne exprimiert. Eine Expression von *CLV3* in der endogenen Domäne konnte nicht detektiert werden (RNA-in-situ-Hybridisierungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Simon). Maßstab: 10 µm

3.2.4 *CLV3* reprimiert die Expression von *WUS*

Die in den letzten drei Kapiteln beschriebenen Phänotypen legen nahe, daß eine starke Aktivierung der *CLV*-Signaltransduktion Stammzellschicksal reprimiert. Dies könnte möglicherweise durch eine Repression von Genen erfolgen, die Stammzellschicksal fördern. Wie beschrieben kopieren sowohl die *35S::CLV3*- als auch die *HisH4::CLV3*-Pflanzen den *wus*-mutanten Phänotyp sehr deutlich.

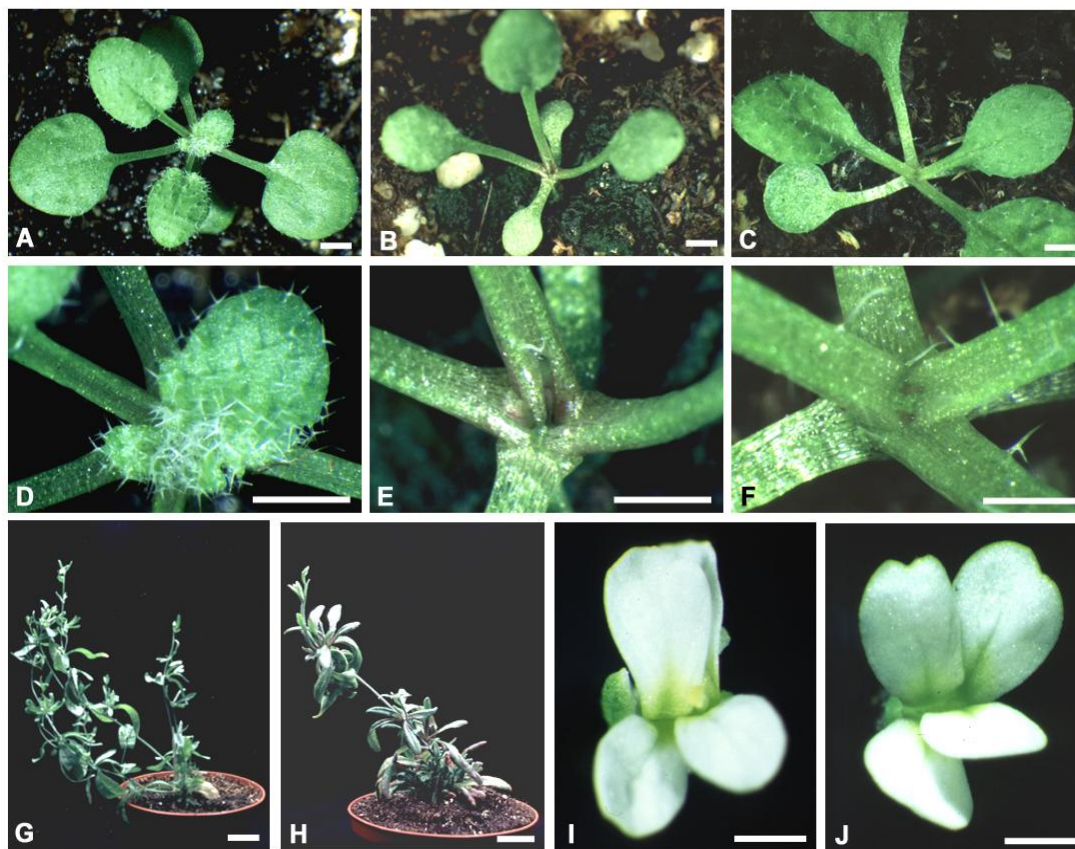


Abb.11: Transgene *35S::CLV3*-Pflanzen kopieren den Phänotyp von *wus*-Mutanten. (A, D) *Columbia* Pflanze im Alter von 3 Wochen. (B, E) In *wus*-Mutanten sind die Meristeme nicht in der Lage eine adäquate Anzahl an Stammzellen aufrecht zu erhalten, daraus resultiert die fehlende, kontinuierliche Anlage neuer Blätter wie im WT. (C, F) In *35S::CLV3*-Pflanzen zeigte sich der gleiche Phänotyp; auch hier verlor das Sproßmeristem verfrüht seine Aktivität. Auch im Alter von 12 Wochen ähneln sich die Phänotypen und die Blüten von *wus-1* (G, I) und *35S::CLV3* Pflanzen (H, J). Beide Genotypen bilden die charakteristischen Luftrosetten und den Blüten fehlen Organe der beiden inneren Wirtel. Maßstab: A,B,C = 2mm; G,H = 2 cm; D-F, I,J = 0,5 mm

Das *WUS*-Gen kodiert einen homeodomänen Transkriptionsfaktor und fördert die Bildung von Stammzellen und deren Erhaltung im Meristem (Mayer et al., 1998). In Abb.11 C und F ist ein starker *35S::CLV3*-Phänotyp im *Columbia* Hintergrund im Vergleich mit einer *wus*-Mutanten (Abb.11 B, E) gleichen Alters dargestellt. In beiden Genotypen kommt es frühzeitig während der Entwicklung zum Stillstand der meristematischen Aktivität. Phänotypisch sichtbar wird dies durch die verminderte und verzögerte Initiierung von neuen Rosettenblättern im Vergleich zum Wildtyp (Abb.11 A, D). Diese phänotypisch starke Ähnlichkeit zwischen *35S::CLV3*- und *wus*-Mutanten legt nahe, daß *WUS* eines der Zielgene von *CLV* sein könnte durch die *CLV*-Gene reprimiert wird.

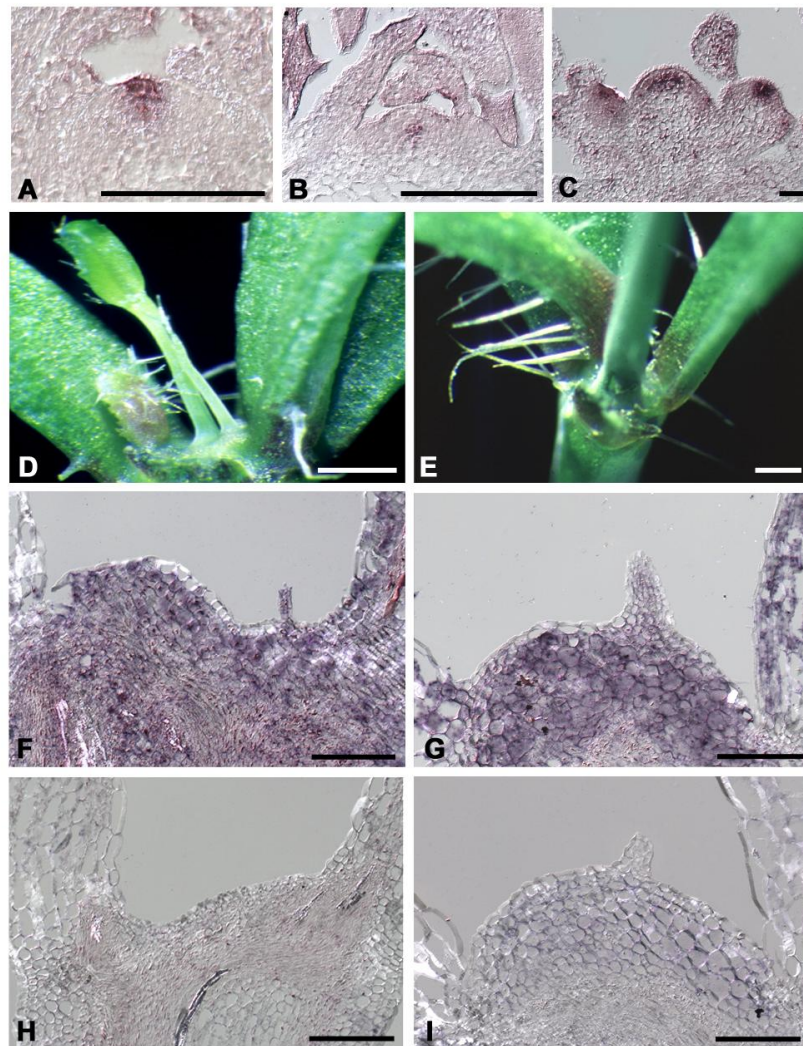


Abb.12: *CLV3*- und *WUS*-Expression in *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgenen Pflanzen. RNA-*in-situ*-Hybridisierung im vegetativen SAM von *Columbia*: (A) *CLV3*- und (B) *WUS*-Expression. (C) Die *WUS*-Expressiondomäne in *clv1-4*-Mutanten ist als Folge der fehlenden Repression durch den *CLV*-Signaltransduktionsweg deutlich vergrößert. Die Meristeme in *35S::CLV3*- (D, F, H) und *HisH4::CLV3*- (E, G, I) transgenen Pflanzen terminieren verfrüht und bilden charakteristische Luftrosetten. In der RNA-*in-situ*-Hybridisierung zeigten diese Meristeme ein starkes *CLV3*-Signal (F, G), während *WUS*-RNA nicht nachweisbar war (H, I). Die *in-situ*-Hybridisierungen mit *CLV3* und *WUS* wurden jeweils auf Schnitten derselben Pflanze durchgeführt. Die verwendete *WUS*-Sonde wurde sowohl für die *in-situ*-Hybridisierung auf *clv1-4* in C, als auch zur Hybridisierung auf den terminierten Meristemen (H, I) eingesetzt, so daß das Signal in C als Positivkontrolle für die verwendete *WUS* Sonde gewertet werden kann. Maßstab: A-C, = 30 µm; D,E = 0,5 mm

Um dies näher zu analysieren wurde einem weiteren Experiment die Expression von *WUS* mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung in *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Pflanzen untersucht.

Im wildtypischen SAM ist die Expression von *WUS* auf wenige Zellen in den tieferen Schichten der L3 im Zentrum des Meristems beschränkt (Abb.12 B; Mayer et al., 1998). In diesen Experimenten konnte dagegen in terminierten Meristemen von *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Pflanzen mit starkem Phänotyp keine *WUS*-RNA nachgewiesen werden (Abb.12 H,I). Im gleichen Experiment wurde das terminierte Meristem derselben Pflanze auch mit einer *CLV3*-Sonde hybridisiert (Abb.12 F,G). Hier wurde ein sehr starkes *CLV3*-RNA-Signal detektiert. Obwohl diese Meristeme ihre wildtypische Ak-

tivität verloren hatten, wurden in einigen Fällen trotzdem filament-artige Strukturen, neue Blätter oder auch Blüten in unregelmäßigen Abständen und Positionen gebildet. Auch im Zentrum des Meristems an der eigentlichen Position der Stammzellen im Wildtypen. Die Meristeme hatten ihre Aktivität also nicht vollkommen eingestellt.

In Pflanzen mit einer Mutation in einem der drei *CLV*-Gene war hingegen die *WUS*-Expressionsdomäne deutlich vergrößert (Abb.12 C). Der *CLV*-Signaltransduktionsweg ist hier außer Kraft gesetzt. Damit geht die Repression von *WUS* verloren und die Expressionsdomäne ist im Vergleich zum Wildtyp vergrößert.

In Adventivmeristemen von transgenen Klasse-II- und III-Pflanzen, die ihre Aktivität noch nicht ganz eingestellt hatten, war das *35S::CLV3*-Transgen nicht so stark exprimiert wie in Klasse-I-Pflanzen. In diesen Pflanzen war dann auch *WUS*-RNA noch detektierbar. Dieses Ergebnis wird in Kap. 3.2.5 genauer beschrieben.

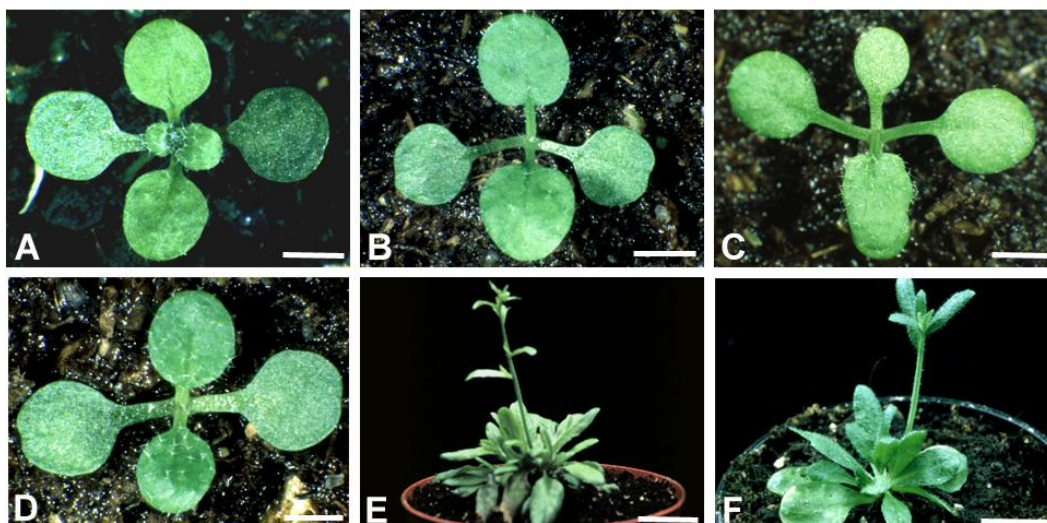


Abb.13: *35S::CLV3/wus-1*-Pflanzen zeigen keinen neuen Phänotyp. (A) *Columbia* im Alter von 14 Tagen mit den gleichmäßig neu gebildeten Blättern. (B) *wus*-Mutanten im gleichen Alter initiieren diese neuen Blätter zunächst nicht, ebenso wie *35S::CLV3* Transgene (C). (D) Der Phänotyp von *35S::CLV3/wus-1*-Pflanzen ist identisch mit dem der jeweils einzelnen Genotypen. Auch im Alter von 6 Wochen gab es keinen Unterschied zwischen *wus-1*- (E) und *35S::CLV3*-Pflanzen (F). Maßstab: A-D = 0,5 cm; E,F = 2 cm

Um zu überprüfen, ob *WUS* tatsächlich von *CLV3* reprimiert wird, wurde in einem weiteren Experiment das *35S::CLV3*-Transgen in heterozygote *WUS/wus-1*-Mutanten gekreuzt. Wenn in *35S::CLV3*-transgenen Pflanzen *WUS* tatsächlich stark reprimiert ist, sollten *35S::CLV3/wus*-Doppelmutanten einen Phänotyp zeigen, der identisch mit dem von *wus*-Einzelmutanten ist. Das würde belegen, daß die Repression von *WUS* für den *35S::CLV3*-Phänotyp verantwortlich ist. Zur Kreuzung wurden Klasse-II *35S::CLV3*-Pflanzen mit Pollen produzierenden Blüten verwendet. Da diese *35S::CLV3*-Keimlinge ihre Primärblätter im Vergleich zu *wus*-Mutanten etwas früher initiieren, konnten beide

Genotypen in diesem frühen Keimlingsstadium voneinander unterschieden werden. Deshalb ließen sich die gesuchten *35S::CLV3/wus*-Doppelmutanten eindeutig identifizieren.

In der F₂-Generation konnten 5 von insgesamt 20 Linien identifiziert werden, die jeweils 16-30% homozygote *wus-1*-Mutanten (erwartet wurden 25%) segregierten. Analysiert wurden die Basta-resistenten und damit *35S::CLV3*-transgenen Pflanzen im wildtypischen, in *wus-1/wus-1*- und *wus-1/WUS*-Hintergrund. *35S::CLV3/wus-1*-Pflanzen sahen wie *wus-1*-Mutanten bzw. *35S::CLV3*-Pflanzen im wildtypischen Hintergrund aus. Es konnte in keiner der 5 Linien ein neuartiger oder additiver Phänotyp gefunden werden (Abb.13).

Als zusammenfassendes Ergebnis dieser drei Experimente kann also festgehalten werden, daß *WUS*-Expression durch die ektoische und konstitutive Expression von *CLV3* stark reprimiert wird und daß die transgenen Pflanzen den *wus*-mutanten Phänotyp kopieren. In *clv*-Mutanten, in denen die *CLV*-Signaltransduktion außer Kraft gesetzt ist, findet diese Repression nicht statt und die *WUS*-Expression domäne ist deutlich vergrößert. Bei konstitutiver und ektoischer Expression von *CLV3* ist die Expressionsdomäne von *WUS* verkleinert oder nicht mehr nachzuweisbar. Zudem lieferten *35S::CLV3/wus-1*-Pflanzen keinen neuen Phänotyp. Die Repression von *WUS* ist somit wahrscheinlich für den Meristemdefekt von *35S::CLV3*-Pflanzen verantwortlich.

3.2.5 Die *CLV3*-Dosis bestimmt die Anzahl an Stammzellen

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, können transgene Pflanzen, die *CLV3* unter Kontrolle des *35S*- und des *HisH4*- Promotors exprimieren, ihre meristematische Aktivität nicht aufrechterhalten. Die starke Expression von *CLV3* in diesen Pflanzen bewirkt eine starke Repression von *WUS*, die in terminierten Meristemen der starken Phänotypen sogar völlig fehlen kann. *WUS* ist für die Etablierung des embryonalen SAM und für die Aufrechterhaltung der Stammzellopopulation in der zentralen Zone des Meristems verantwortlich (Laux et al., 1996). In diesem Kapitel soll nun untersucht werden, inwieweit die *CLV3* Transkript- und Gendosis mit der Anzahl der Stammzellen zusammenhängt.

Dazu wurden transgene Pflanzen der Phänotypklassen I-III einer RNA-in-situ-Hybridisierung unterzogen. Hierbei konnte festgestellt werden, daß ein Klasse-I-Phänotyp mit einer starken Expression des *35S::CLV3*- bzw. *HisH4::CLV3*-Transgens einherging und ein schwacher Klasse-III-Phänotyp auch eine weniger starke Expression des Transgens zeigte (Abb.14 E, F). In solchen Klasse-III-Pflanzen konnte eine *WUS*-Expression (Abb.14 I) detektiert werden. Darüberhinaus konnte *CLV1*-RNA nur in diesen schwachen Klasse-III-Pflanzen nachgewiesen werden, während das Signal in den starken Klasse-I-Phänotypen fehlte (Abb.14 K, L). Diese Ergebnisse wurden als Hinweis darauf gewertet, daß die Anzahl an Stammzellen umgekehrt proportional zur *CLV3*-Aktivität ist.

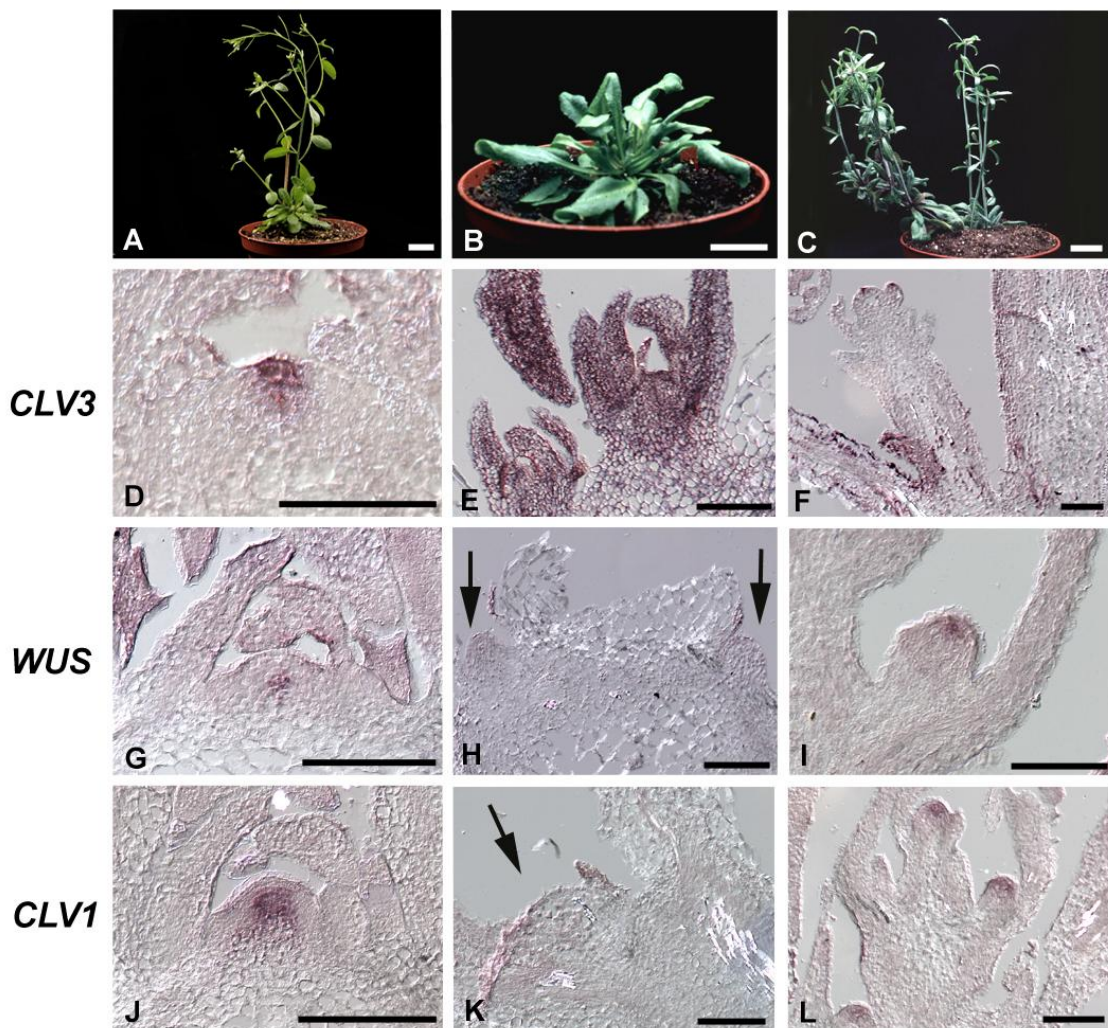


Abb.14: RNA-in-situ-Hybridisierungen mit *CLV3*-, *WUS*- und *CLV1*-Sonden in starken und schwachen *35S::CLV3*-Phänotypen. (A) Wildtypische *Columbia*-Pflanze. (B) Starker und (C) schwacher *35S::CLV3*-Phänotyp. (D) *CLV3*-Expression im wildtypischen SAM. (E) *CLV3*-Expression in starken und (F) schwachen *35S::CLV3*-Phänotypen. Eine starke Expression des *CLV3*-Transgens bedingt einen starken *35S::CLV3*-Phänotyp (G) *WUS*-Expression im wildtypischen SAM. (H) In starken *35S::CLV3*-Phänotypen konnte keine *WUS*-Expression detektiert werden. (I) Schwache *35S::CLV3*-Phänotypen exprimieren *WUS* im SAM und den Achselmeristemen. (J) *CLV1*-Expression im wildtypischen SAM. (K) In starken Phänotypen konnte keine *CLV1*-RNA detektiert werden. (L) Schwache Phänotypen exprimieren *CLV1* im wildtypischen Muster. Maßstab: A-C = 2 cm; D-L = 30 μm

Diese Hypothese wird auch durch einen Vergleich der Situation in *clv3-2*-Mutanten mit der in *35S::CLV3*-transgenen Pflanzen bestätigt (Abb.15). In *clv3-2*-Mutanten (Abb.15 A, D, G) akkumulieren Stammzellen in der zentralen Zone, Sproß- und Blütenmeristeme sind deutlich vergrößert und die Pflanzen bilden eine größere Anzahl an Blatt- und Blütenorganen. In der wildtypischen Situation (Abb.15 B, E, H), also in Pflanzen mit der normalen Dosis an *CLV3*-Protein, halten sich Zellteilung in der zentralen Zone und Zelldifferenzierung in der peripheren Zone die Waage. Sproß- und Blütenmeristeme weisen ihre wildtypische Funktion auf. In transgenen *35S::CLV3*-Pflanzen, in denen ein starkes und konstitutives *CLV3*-Signal wirkt, konnte der gegenteilige Effekt zu den *clv*-Mutanten beobachtet werden (Abb.15 C, F, I). Die Sproß- und Blütenmeristeme waren insgesamt verkleinert,

deutlich abgeflacht und die Anzahl der gebildeten Organe reduziert. In den Blüten der transgenen Pflanzen fehlten die Organe der inneren Wirtel teilweise oder vollständig. Dies wurde als frühzeitiger Verlust der Stammzellen im Meristem interpretiert, wie dies auch in *wus*-Mutanten der Fall ist. Die Dosis an *CLV3* bestimmt also entscheidend die Anzahl an Stammzellen im Meristem.

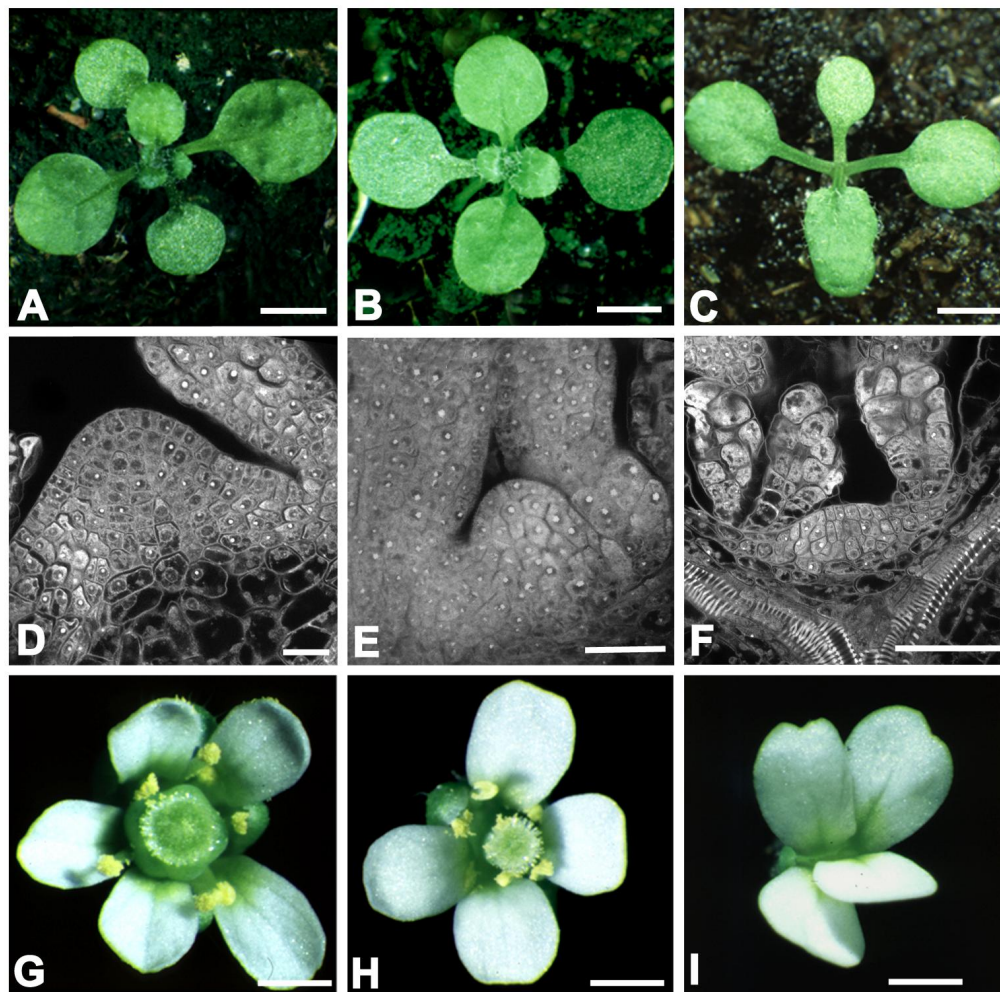


Abb.15: Die Dosis des CLV3-Proteins bestimmt entscheidend die Anzahl an Stammzellen im Meristem. (A, D, G) In *clv3-2*-Mutanten fehlt ein funktionelles CLV3-Protein und es kommt sowohl im SAM als auch im Blütenmeristem zur Akkumulation von Stammzellen in der zentralen Zone. Als Folge werden vermehrt Blätter und Blütenorgane gebildet. (B, E, H) In wildtypischen *Columbia* Pflanzen mit der normalen Dosis an CLV3, halten sich Zellteilung in der zentralen und Zelldifferenzierung in der peripheren Zone im Gleichgewicht. (C, F, I) In *35S::CLV3*-transgenen Pflanzen kommt es zum Verlust der Stammzellen und damit auch zu einer verminderten Anzahl an Blättern und Blütenorganen. (D-F) Dargestellt ist das SAM im Keimlingsstadium mit Hilfe des Konfokalen-Mikroskopes. (F) Die zellulären Strukturen im Hintergrund sind keine Primordien, sondern Teile eines Primärblattes, das nur teilweise in der sichtbaren Ebene liegt. Maßstab: A-C = 0,5 cm; D-F = 20 μ m; G-I = 0,5 mm

Es konnte festgestellt werden, daß eine Erhöhung der *CLV3*-Transkriptdosis zu den o.g. Effekten führt. In einem weiteren Experiment sollte nun untersucht werden, ob eine Erhöhung der *CLV3*-Gendosis ebenfalls zum Verlust der Stammzellen führt. Zur Klärung dieser Frage, wurde die Kopienzahl von *CLV3* unter Kontrolle des endogenen Promotors in transgenen Pflanzen erhöht. Es wur-

den *clv3-2*-Mutanten mit einem Plasmid transformiert, das insgesamt 5,6 kb genomische DNA mit dem *CLV3*-Gen enthielt (pBU9). Das Plasmid pBU9 war in der Lage, den starken mutanten Phänotyp von *clv3-2* vollständig zu komplementieren. Die transgenen pBU9-Pflanzen der T1-Generation wurden daraufhin sowohl mit Wildtypen als auch mit pBU9-transgenen Pflanzen aus unabhängigen Linien rückgekreuzt und in der nächsten Generation geselbstet, um so eine Erhöhung der Gendosis zu erreichen. Insgesamt wurden aus 9 unabhängigen Linien dieser Rückkreuzungen 808 pBU9-transgene Pflanzen phänotypisch ausgewertet: alle Pflanzen sahen wildtypisch aus, keine zeigte den charakteristischen Meristemverlust einer *CLV3*-Überexpression. Eine Erhöhung der *CLV3*-Gendosis auf das 2-4 fache hatte also im Gegensatz zur Erhöhung der Transkriptdosis keinen Effekt auf den Phänotyp der Pflanzen.

Die Expression zusätzlicher *CLV3*-Kopien unter Kontrolle des endogenen Promotors könnte also durch einen Feedback-Mechanismus reguliert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Experimente mit *UFO::CLV3*-transgenen Pflanzen (Kap.3.2.3) überein. Auch hier wurde ein Feedback Mechanismus postuliert, da in transgenen *UFO::CLV3*-Pflanzen die endogene *CLV3*-Expression reprimiert ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß die Transkript-Dosis von *CLV3* entscheidend für die Anzahl an Stammzellen ist. In *clv3-2*-Mutanten ohne funktionelles *CLV3*-Protein akkumulieren Stammzellen in der zentralen Zone, im Wildtypen wird die normale Stammzellpopulation aufrechterhalten und in *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgenen Pflanzen gehen die Stammzellen verloren. Eine Erhöhung der *CLV3*-Gendosis hingegen hat keine Auswirkungen auf die Anzahl der Stammzellen - ein weiterer Hinweis auf einen Feedback-Regulationsmechanismus mit dem *CLV3* kontrolliert wird.

3.2.6 *CLV3* wirkt über den *CLV1/2*-Rezeptorkomplex

Wie im vorangehenden Kapitel gezeigt, bestimmt die *CLV3*-Dosis entscheidend die Anzahl an Stammzellen. Um näher zu analysieren, welche Rolle der *CLV1/2*-Rezeptor in diesem Zusammenhang spielt, wurden die *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Transgene in *clv1-4*- und *clv2-1*- Mutanten transformiert. Wenn das *CLV3*-Protein über den *CLV1/2*-Rezeptor wirkt, sollte konstitutiv exprimiertes *CLV3* im *clv*-mutanten Hintergrund nicht zum Verlust der Stammzellen führen.

Die transgenen Pflanzen wurden in der T1- und der T2-Generation analysiert. Die in Tab. 9 angegebenen transgenen Pflanzen lieferten alle den für *clv*-Mutanten charakteristischen Phänotyp. Die Pflanzen hatten ein vergrößertes Meristem und wiesen daraus resultierend eine erhöhte Anzahl an Organen auf (Abb.16). Besonders deutlich konnte dies anhand der Blütenorgane dargestellt werden: die Blüten der transgenen *clv1-4*- und *clv2-1*-Pflanzen lieferten einen Phänotyp wie die nicht transgenen *clv*-Kontrollen (Abb.16 D,F). Die konstitutive und ektopische Expression von *CLV3* hat also nur dann einen Effekt auf die Anzahl der Stammzellen im Meristem, wenn ein funktioneller *CLV1/CLV2*-Rezeptorkomplex vorhanden ist. Das zeigt, daß der Phänotyp in *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Pflanzen das Resultat der verstärkten *CLV3*-Expression ist. Das *CLV3*-Protein, bzw. ein durch *CLV3* aktiviertes Molekül bindet folglich als Ligand an die *CLV1/CLV2*-Rezeptorkinase und kontrolliert so die Anzahl an Stammzellen.

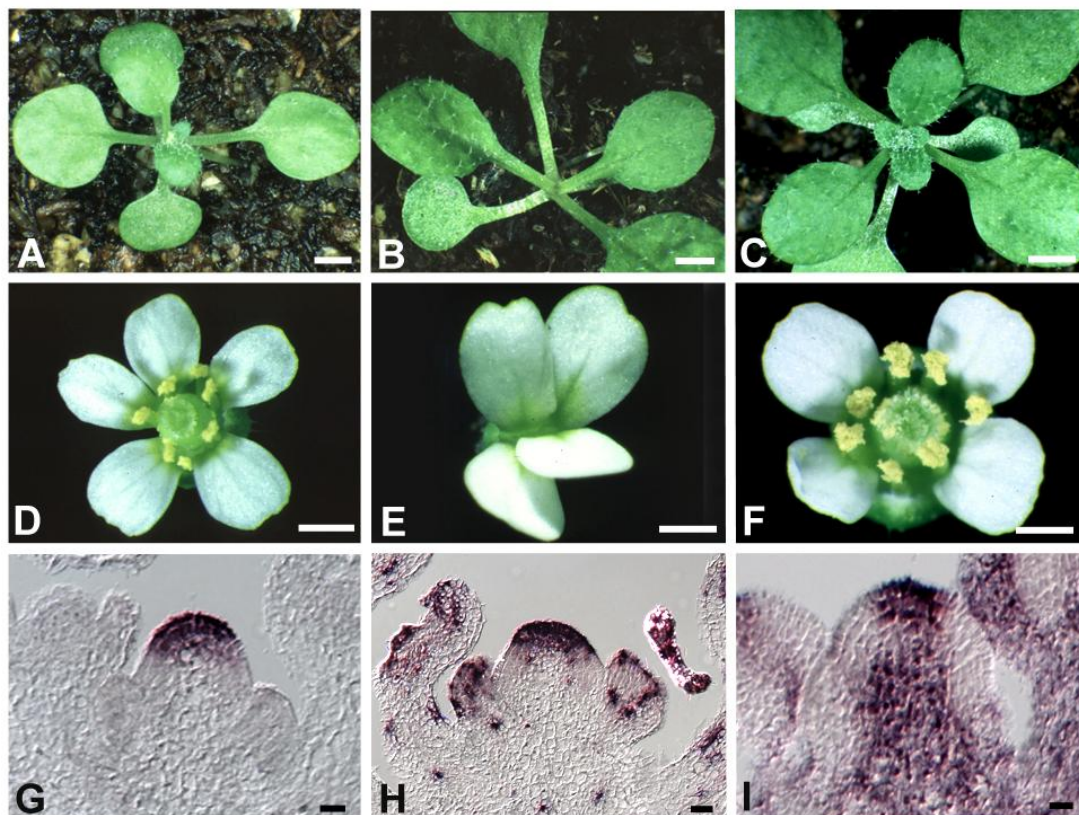


Abb.16: CLV3 benötigt einen funktionellen CLV1/CLV2-Rezeptor. (A) *clv1-4*-Mutante im Alter von 3 Wochen. (B) *35S::CLV3* in *Columbia* mit starkem Klasse-I-Phänotyp im Alter von 3 Wochen. (C) *35S::CLV3* im *clv1-4*-mutanten Hintergrund. Die Pflanzen zeigten keinen Meristemdefekt und sahen aus wie *clv*-Mutanten. (D) *clv1-4*-mutante *Arabidopsis* Blüte mit überzähligen Organen. (E) Blüte einer *35S::CLV3*-transgenen Pflanze. Die Organe der beiden inneren Wirtel fehlten. (F) Blüte einer *35S::CLV3/clv1-4*-transgenen Pflanze. Auch hier fanden sich überzählige Organe, wie in den nicht transgenen *clv1-4*-Mutanten. (G) *CLV3*-Expression in der vergrößerten zentralen Zone im Meristem einer *clv1-4*-Mutanten. *CLV3*-Expression im Meristem einer *HisH4::CLV3/clv1-4*-transgenen Pflanze (H) und einer *35S::CLV3/clv2-1*-transgenen Pflanze (I). Trotz ectopischer *CLV3*-Expression zeigt das *clv*-mutante SAM in beiden Fällen nur den *clv*-mutanten Phänotyp. Maßstab: A-C = 2mm; D-F = 0,5 mm; G-I = 20 µm

	Anzahl Pflanzen mit <i>clv</i> -mutantem Phänotyp	
	<i>35S::CLV3</i>	<i>HisH4::CLV3</i>
<i>clv1-4</i>	22	19
<i>clv2-1</i>	5	8

Tab. 9: Anzahl *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgener Pflanzen im *clv1-4*-und *clv2-1*-Mutanten. Alle transgenen Pflanzen zeigten den *clv*-mutanten Phänotyp.

3.2.7 *35S::CLV3* in *pol*-Mutanten: *35S::CLV3* zeigt einen neuen Phänotyp in *pol*-Mutanten

Da für *POL* und *WUS* eine redundante Wirkung vermutet wird, könnte *POL* ebenfalls ein Zielgen der *CLV*-Signaltransduktion sein (Yu et al., 2000). Homozygote *pol*-Mutanten zeigen einen nahezu wildtypischen Phänotyp, so daß *WUS* möglicherweise die Funktion von *POL* in den Mutanten komplett übernimmt. Um *POL* in der Hierarchie des *CLV*-Signaltransduktionsweges besser positionieren zu können, wurde das *35S::CLV3*-Transgen in homozygote *pol*-Mutanten transformiert. Wenn *WUS* und *POL* die beiden einzigen redundanten Zielgene des *CLV*-Signaltransduktionsweges sind, müssten *35S::CLV3/pol*-Pflanzen wie *wus/pol*-Doppelmutanten aussehen (Yu et al., 2000). Die Autoren beschreiben *wus/pol*-Doppelmutanten als Verstärkung des *wus*-mutanten Phänotyps: die Pflanzen sind insgesamt kleiner, zeigen eine abnorme Blattentwicklung und eine reduzierte Anzahl an Blüten.

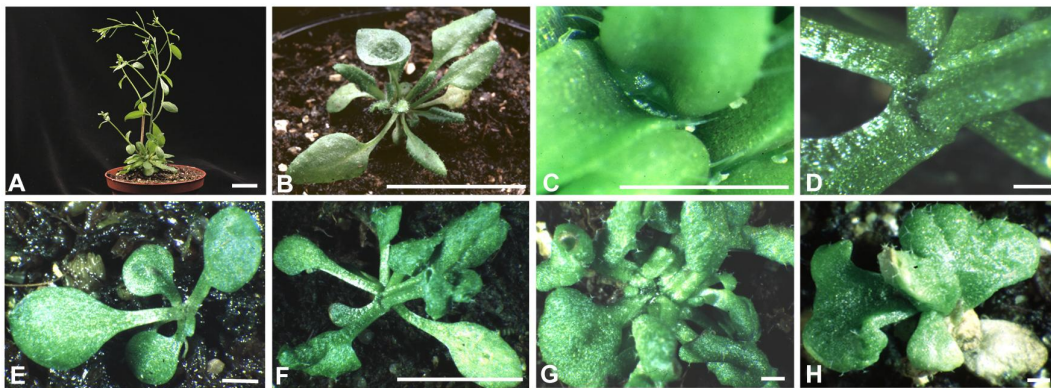


Abb.17: Die Expression von *35S::CLV3* in *pol*-Mutanten führt zu einem neuartigen Phänotyp. (A) Wildtypische *Columbia* Pflanze im Alter von 6 Wochen. (B, C) Starker *35S::CLV3*-Phänotyp im Alter von 6 Wochen. Die Pflanze bildet eine Blattrosette mit endständigem trichterförmigem Blatt. Die Detailaufnahme des SAM zeigt, daß neue Blätter nicht kontinuierlich gebildet werden. (D) *35S::CLV3/pol*-transgene Pflanze. Die Pflanzen zeigten wie in *35S::CLV3*-Transgenen einen Aktivitätsverlust des Meristems. (E-H) *35S::CLV3/pol*-Phänotypen unterschiedlicher Stärke. (E) Schwächere *35S::CLV3/pol*-Phänotypen im Alter von 4 Wochen bzw. (F) 8 Wochen. (G) *35S::CLV3/pol*-Blattrosette mit stark verdickten Rosettenblättern im Alter von 8 Wochen. (H) Stärkster *35S::CLV3/pol* Phänotyp im Alter von 8 Wochen. Die Pflanze hatte kallusartig verdickte Blätter und entwickelte sich nicht weiter. Maßstab: A,B = 2 cm; C,D-H = 2mm

In den Versuchen konnte insgesamt nur eine unterdurchschnittlich geringe Anzahl an transgenen Pflanzen regeneriert werden. Möglicherweise wirkt *35S::CLV3* in *pol*-mutanten Pflanzen letal. Alle *35S::CLV3/pol*-Pflanzen bildeten bis zum Alter von 4 Wochen lediglich 1-6 Rosettenblätter (Abb.17 E). Bis zum Alter von 8 Wochen (Abb.17 F-H) wurden nur rund 15 Rosettenblätter von den Pflanzen gebildet. In diesem Stadium verblieben die Pflanzen bis zum Alter von 20 Wochen, so daß keine zur Blüte kam. Eine T2-Generation konnte folglich nicht etabliert werden. Sehr auffällig war die Blattform, die sich deutlich von den Blättern der *35S::CLV3*-Pflanzen unterschied. In den schwächeren Phänotypen waren die Blätter besonders an den Petiolen deutlich verbreitert, teilweise an der Blattbasis fusioniert und die Blattspreite war stark nach innen verdreht (Abb.17 F). In den stärkeren Phäno-

typen waren die Blätter zudem fast kallusartig verdickt. Zusätzlich wurden an mehreren Positionen filamentartige Blattfortsätze gebildet.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die analysierten *35S::CLV3/pol*-Pflanzen in Bezug auf den Verlust meristematischer Aktivität einen deutlich stärkeren Defekt als *wus*-Mutanten oder *35S::CLV3*-Transgene aufwiesen. Aber die *35S::CLV3/pol*-Pflanzen lieferten nicht den identischen Phänotyp wie *wus/pol*-Doppelmutanten. Die Form der Rosettenblätter konnte eher als neuartig interpretiert werden.

3.2.8 *35S::CLV3* in *stm*-Mutanten: *stm* verstärkt den *35S::CLV3*-verursachten Phänotyp

Neben der Identifizierung der Zielgene von *CLV* wurde untersucht, welche zusätzlichen Gene in die *CLV*-Signaltransduktion und damit in die Repression von *WUS* involviert sind. In diesem Zusammenhang könnte möglicherweise das Gen *STM* relevant sein. *STM* wird im Embryo bereits vom späten globulären Stadium an exprimiert und ist für die Etablierung des embryonalen SAMs essentiell. Während der weiteren Entwicklung erhält *STM* den undifferenzierten Status der meristematischen Zellen (Long et al., 1996).

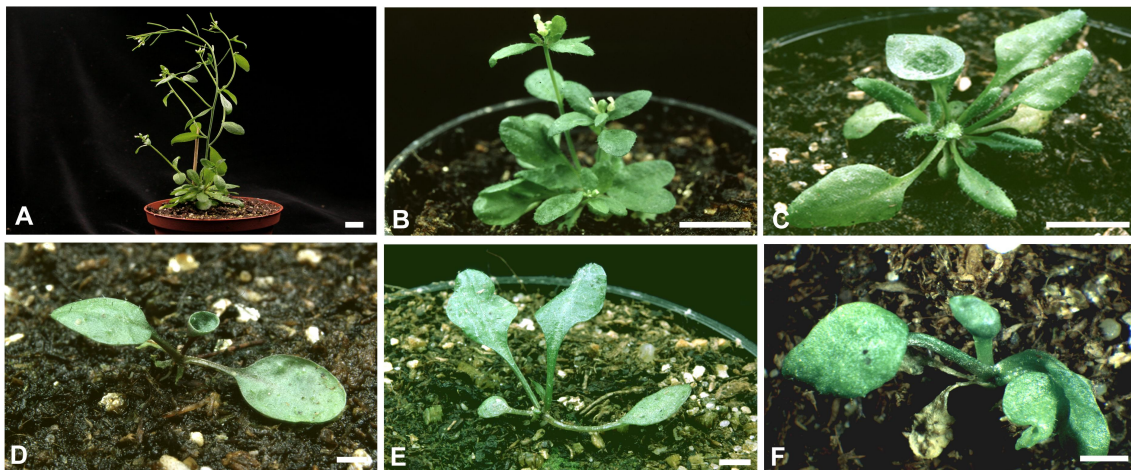


Abb.18: Die Expression von *35S::CLV3* in *stm*-Mutanten führt zu einem additiven Phänotyp. (A) Wildtypische *Columbia* Pflanze im Alter von 6 Wochen. (B) Ebenfalls 6 Wochen alte *stm-2*-Mutante. Die Pflanze produziert neben einer Blattrosette und den charakteristischen Luftrosetten einige defekte Blüten. (C) Starker *35S::CLV3*-Phänotyp im Alter von 6 Wochen. Die Pflanze bildet eine Blattrosette mit endständigem trichterförmigem Blatt. (D-F) Bei der Expression von *35S::CLV3* in homozygoten *stm-2*-Mutanten trat ein additiver Phänotyp auf. Die Pflanzen, hier ebenfalls im Alter von 6 Wochen zeigten einen sehr starken Meristemdefekt und bildeten lediglich 3-5 Rosettenblätter, die in ihrer Form mit *35S::CLV3* vergleichbar waren. Es wurden keine Adventivmeristeme gebildet. Maßstab: 1 cm

Um zu analysieren, ob *STM* für die *CLV*-Signaltransduktion eine Rolle spielt, wurde das *35S::CLV3*-Transgen im *stm-2*-mutanten Hintergrund analysiert. Das gewählte *stm-2*-Allel bewirkt einen schwachen Phänotyp, d.h. die Mutanten bilden Infloreszenzen mit auch für *stm* charakteristischen Luftro-

setzen. Ein großer Teil bildet zudem auch Blütenmeristeme, aus denen defekte, nicht fertile Blüten hervorgehen (Abb.18 B). Falls also beide Gene unabhängig voneinander wirken und *STM* keinen Einfluß auf die *CLV*-Signaltransduktion hat, müßte der Phänotyp von *35S::CLV3/stm*-Pflanzen additiv sein.

Nach der Kreuzung von *35S::CLV3* mit heterozygoten *STM/stm-2*-Mutanten wurden in der F2-Generation 20 Linien analysiert. Davon segregierten 7 Linien zu 18 – 31 % homozygote *stm-2* Mutanten (25% wurden erwartet). In diesen Linien waren 86-91% der Pflanzen Basta-resistent und damit Träger des *35S::CLV3*-Transgens. Von insgesamt 113 Pflanzen segregierten 63% den für *35S::CLV3* Pflanzen charakteristischen Phänotyp (Abb.18 C, Tab. 10), 7% der Pflanzen zeigten den *stm-2*-mutanten Phänotyp (Abb.18 B) und 5% waren wildtypisch. 25% der Pflanzen lieferten einen Phänotyp, der weder für *35S::CLV3*-Transgene noch für *stm-2*-Mutanten typisch war (Abb.18 D-F). Sie bildeten bis zum Alter von 6 Wochen neben den Kotyledonen lediglich 2-3 Rosettenblätter und ein zentrales endständiges Blatt, das oft auch an der Basis fusioniert und trichterförmig war. In seltenen Fällen waren die Rosettenblätter der Pflanzen verdickt. Diese Phänotypen sind weder typisch für *stm-2*-Mutanten noch für *35S::CLV3* Transgene.

Bei beiden Genotypen kam es zum Verlust meristematischer Aktivität. In *35S::CLV3/stm-2*-Pflanzen trat dieser Meristemdefekt verstärkt auf so daß ein additiver Effekt naheliegt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die *CLV*-Signaltransduktion unabhängig von *STM* die Repression von *WUS* bewirken kann.

Phänotypen				
P ⁿ	<i>35S::CLV3</i>	<i>35S::CLV3/stm-2</i>	<i>stm-2</i>	<i>WT</i>
113	63%	25%	7%	5%

Tab. 10: Anzahl *35S::CLV3*- und *35S::CLV3/stm-2*-transgener Pflanzen. pⁿ= absolute Anzahl ausgewerteter Pflanzen

3.3 Zusammenfassung Teil I: Die Funktion von *CLV3*

In den bisherigen Untersuchungen ergab die Analyse periklinaler Chimären einen indirekten Hinweis auf die nicht-zellautonome Wirkung des *CLV3*-Proteins im Meristem. Es wurden Chimären gefunden, die *CLV3* ausschließlich in der L1, L2 oder L3 exprimierten. Eine *CLV3*-Expression in nur einer Zelllage ist ausreichend für die Kontrolle von Zellteilung und Zelldifferenzierung im gesamten Meristem, d.h. *CLV3* wirkt nicht-zellautonom. Es ist also anzunehmen, daß das *CLV3*-Protein von der äußeren Zelllage in die tiefergelegene L3 zur *CLV1* Rezeptorkinase sekretiert wird.

Mit Hilfe verschiedener Fehlexpressions-Experimente wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluß Intensität und Ort der *CLV3*-Expression auf die Kontrolle der meristematischen Aktivität haben. Es konnte gezeigt werden, daß die Meristeme in *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgenen Pflanzen frühzeitig terminieren. Die ektopische Expression von *CLV3* führte zur starken Repression von *WUS* und wie auch in *wus*-Mutanten zum vorzeitigen Verlust der Stammzellen. Es konnte weiterhin ge-

zeigt werden, daß CLV3 über den CLV1/2-Rezeptor wirkt. Mit Hilfe des *UFO::CLV3*-Transgens konnte nachgewiesen werden, daß CLV3 auch unterhalb seiner endogenen Domäne wirken kann. Die Richtung des CLV3-Signals spielt folglich keine Rolle.

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß die Anzahl der Stammzellen durch die Dosis an *CLV3* bestimmt wird. Während die Stammzellen in *clv*-Mutanten ohne funktionelles CLV3-Protein in der zentralen Zone akkumulieren, wird im Wildtypen die normale Anzahl aufrechterhalten. In *35S::CLV3*-Pflanzen hingegen gehen die Stammzellen unter dem Einfluß einer hohen Dosis an CLV3-Protein frühzeitig verloren.

Die Anzahl an Stammzellen ist also abhängig von der *CLV3*-Transkriptdosis. Im Gegensatz dazu hatte eine Erhöhung der *CLV3*-Gendosis keine Auswirkung auf das Stammzellschicksal im Meristem. Zusätzliche Kopien von *CLV3* unter Kontrolle des endogenen Promotors werden also durch einen negativen Feedback-Regulationsmechanismus auf wildtypisches Niveau reprimiert. Diese Hypothese bestätigte auch die Analyse *UFO::CLV3*-transgener Pflanzen, in denen *CLV3*-Expression nur in der *UFO*-Domäne, nicht aber in der endogenen *CLV3*-Domäne detektiert werden konnte.

Teil II: Regulation der *CLV3*-Expression durch meristemspezifische Gene

In diesem zweiten Teil der Arbeit soll mit Hilfe von Expressionsstudien in amorphen und neomorphen Mutanten der Einfluß verschiedener meristemspezifischer Gene auf die Regulation von *CLV3* untersucht werden.

3.4 Etablierung eines *CLV3*-Reportergens

Für die Analyse der Regulation von *CLV3* nimmt das *CLV3::GUS*-Reportergen eine zentrale Rolle ein. Im folgenden wird deshalb zunächst die Klonierung und Verifizierung dieses Reportergens beschrieben.

Wie in Kap. 3.2.5 dargestellt ist das Plasmid pBU9, das 5,6 kb genomische Sequenz mit dem *CLV3*-Gen enthält, in der Lage, den starken mutanten Phänotyp einer *clv3-2*-Mutanten vollständig zu komplementieren. Dies legt nahe, daß die für das Expressionsmuster und die Expressionsstärke von *CLV3* verantwortlichen regulatorischen Elemente in diesen 5,6 kb-Fragment genomischer DNA enthalten sind. Es wurde deshalb ein 1487 bp-Fragment der genomischen Sequenz ab dem Translationsstart von *CLV3* in 5' Richtung (im weiteren bezeichnet als 5-1487) mit dem *GUS*-Gen fusioniert. Ein 1256 bp großes Fragment vom translationalen Stopcodon von *CLV3* in 3' Richtung (im weiteren bezeichnet als 3+1256) wurde hinter das *GUS*-Gen kloniert (Abb.19). Das Plasmid erhielt die laborinterne Bezeichnung pBU16 und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *CLV3*-Reportergen bezeichnet. Die genaue Klonierungsstrategie dieses *CLV3*-Reportergens ist in Kap.2.3.3 dargestellt.

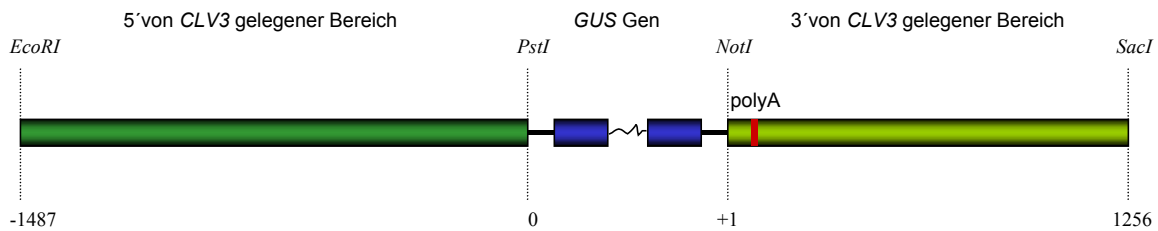


Abb.19: Das *CLV3::GUS*-Reporter gen (pBU16) besteht aus 1487 bp des 5' und 1256 bp des 3' von *CLV3* gelegenen Bereiches. Zwischen beide Fragmente wurde ein *GUS*-Gen kloniert. Das polyA-Additionssignal befindet sich 180 bp hinter dem translationalen Stopcodon.

Das *CLV3::GUS*-Transgen wurde in Pflanzen transformiert, mit denen dann zunächst *GUS*-Färbungen und *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt wurden, um die Eignung von *CLV3::GUS* als Reporter gen festzustellen. In wildtypischen *Arabidopsis*-Pflanzen kann *CLV3*-RNA erstmals im Herzstadium der Embryogenese zwischen den sich entwickelnden Cotyledonen im präsumptiven Sproßmeristem detektiert werden (Fletcher et al., 1999). Während der weiteren Entwicklung bleibt die *CLV3* Expression in den putativen Stammzellen in der zentralen Zone des Sproßmeristems erhalten.

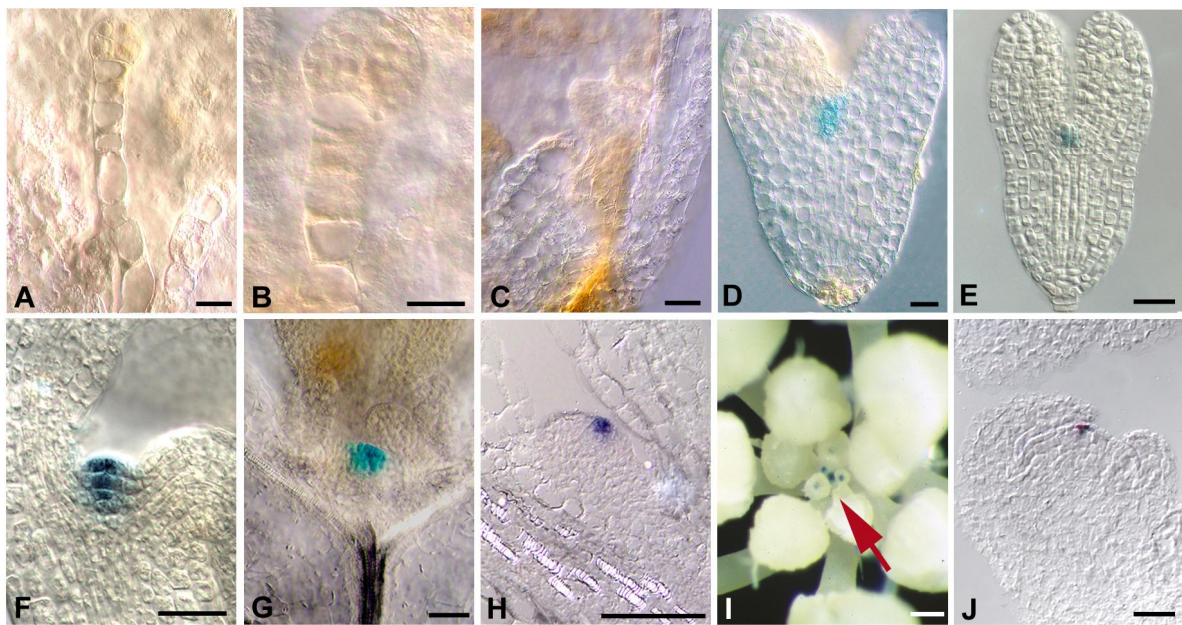


Abb.20: Die Expression des *CLV3::GUS*-Reporter gens in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *Columbia* entspricht der wildtypischen *CLV3*-Expression. *CLV3*-Expression fehlt im 4-Zell-Embryo (A), im globulären Stadium (B) und im ganz frühen Herz-Stadium (C). (D) Erst im eigentlichen Herz-Stadium kann *CLV3::GUS*-Expression im präsumptiven SAM zwischen den Kotyledonen detektiert werden. *CLV3::GUS* ist weiterhin im Torpedo-Stadium (E) und im reifen Embryo (F) im SAM exprimiert. (G) *CLV3::GUS*-Expression im SAM eines 9 Tage alten Keimling. (H) *CLV3::GUS*-Expression in der zentralen Zone im Achselmeristem. (I) Aufsicht auf eine *Columbia*-Infloreszenz mit dem *CLV3::GUS*-Signal im Infloreszenzmeristem und in den jungen Blütenmeristemen. (J) *CLV3::GUS*-Expression in der zentralen Zone des Blütenmeristems. Das Achselmeristem (H) und das Blütenmeristem (J) wurden mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung auf *GUS*-Expression getestet. Alle anderen Abbildungen entstanden durch *x-Gluc*-Färbungen transgener Pflanzen, die das *CLV3::GUS*-Reporter gen enthalten. Maßstab: 20 µm

Für das *CLV3::GUS*-Reportergeren konnte das wildtypische *CLV3*-Expressionsmuster festgestellt werden, indem GUS-Färbungen während verschiedener Stadien der Pflanzenentwicklung durchgeführt wurden. Das GUS-Signal war in transgenen Embryonen vom Herzstadium an im *CLV3*-Muster durchgängig in allen Entwicklungsstadien detektierbar (Abb.20).

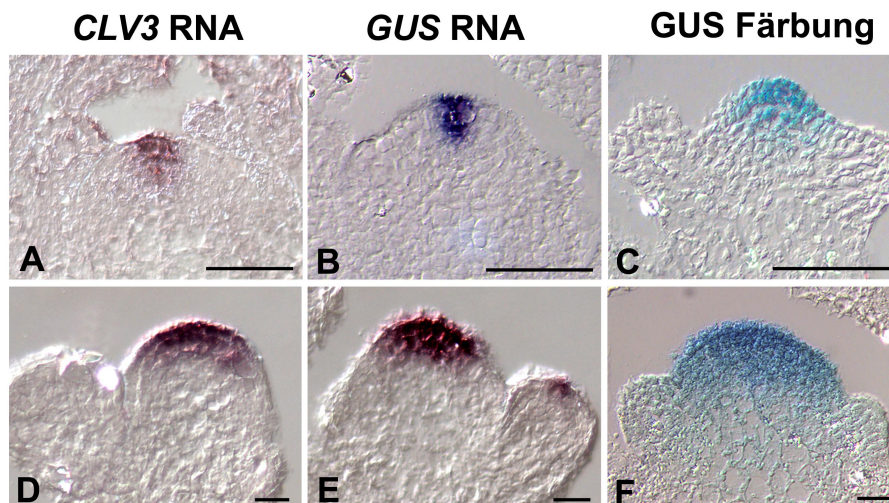


Abb.21: Die Expression des *CLV3::GUS*-Reportergerens entspricht der endogenen *CLV3*-Expression in *Columbia* und *clv2-1*-Mutanten. (A) *CLV3*-Expression im SAM von *Columbia*. (B) *GUS*-Expression im SAM von *Columbia*. Die Expressionsmuster sind identisch. (C) *CLV3::GUS*-Signal im SAM von *Columbia*. (D) *CLV3* Expression im SAM von *clv2-1*. (E) *GUS*-Expression im SAM von *clv2-1*. (F) *CLV3::GUS*-Signal im SAM von *clv2-1*. Die *CLV3::GUS*-Signale in C und F entstanden durch eine β -Glukuronidase-Färbung. Alle anderen Signale wurden durch RNA-in-situ-Hybridisierung ermittelt. Maßstab: 20 μ m

In einem weiteren Experiment wurden *CLV3::GUS*-Färbungen mit RNA-in-situ-Hybridisierungen in *Columbia* und *clv2-1*-Mutanten miteinander verglichen (Abb.21). In der RNA-in-situ-Hybridisierung entsprach das Signal der *GUS*-Sonde sowohl in *Columbia*- als auch in *clv2-1*-Mutanten dem Signal der *CLV3*-Sonde (Abb.21 A, B und D, E). Das Signal in *clv2-1*-Mutanten war dabei erwartungsgemäß in der vergrößerten Domäne detektierbar. Es kann damit festgestellt werden, daß die Expressionsprofile des *CLV3::GUS*-Reportergerens den Expressionsprofilen von *CLV3* entsprechen und daß die vollständige Transkriptions-Kontrollregion von *CLV3* isoliert wurde.

In Abb.21 wird außerdem deutlich, daß die *CLV3::GUS*-Domäne nach der Färbung im Vergleich zur Expressionsdomäne der RNA-in-situ-Hybridisierung deutlich vergrößert ist. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei der enzymatischen Färbereaktion auch Zellen blau angefärbt werden, in denen *CLV3* bereits nicht mehr exprimiert wird, aber dennoch stabiles *GUS*-Enzym vorhanden ist. Bei allen Färbungen wurden deshalb immer wildtypische Kontrollen mitbehandelt, um diese bei einer abweichende Färbung in Bezug setzen zu können.

Mit dem so etablierten *CLV3*-Reportergeren sollten nun zwei Gruppen an Experimenten durchgeführt werden. In diesem Teil der Arbeit wurde zunächst die *CLV3*-Expression und deren Abhängigkeit von verschiedenen meristemspezifischen Genen untersucht. Die regulatorischen Sequenzen von *CLV3* wurden mit Hilfe von Deletionsderivaten dieses Reportergerens im dritten Teil der Arbeit näher charakterisiert.

3.5 Expressionsstudien: Kontrolliert *WUS* die Expression von *CLV3* ?

WUS ist eines der Zielgene der *CLV*-Signaltransduktion und wird von dieser reprimiert. *WUS* seinerseits fördert die Bildung von Stammzellen und somit auch direkt oder indirekt die Expression von *CLV3* in diesen Zellen. Ausgehend von diesem Zusammenhang soll nun untersucht werden, ob *WUS* notwendig zur Aktivierung von *CLV3* ist oder ob es lediglich dessen Expression in den Zellen der zentralen Zone verstärkt. Zur Klärung dieser Frage wurde das *CLV3*-Reportergen sowohl in *wus-1*-Mutanten als auch in transgenen *35S::WUS-GR*-Pflanzen exprimiert und in verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert.

3.5.1 *WUS* ist nur während der Embryogenese für die *CLV3*-Expression essentiell

Das *CLV3::GUS*-Reportergen wurde zunächst in heterozygote *WUS/wus-1*-Mutanten gekreuzt, die als amorphe Mutanten beschrieben sind (Mayer et al., 1998). Nach Selbstung der F1 wurden in der F2 basta-resistente Linien etabliert, die *wus*-Mutanten im Verhältnis 3:1 segregierten. Mit den *CLV3::GUS*-homozygoten Linien wurden GUS-Färbungen in Embryonen, Keimlingen (8 Tage) und adulten Pflanzen (3 Wochen), die jeweils aus *WUS/wus-1*-Pflanzen präpariert wurden, angefertigt.

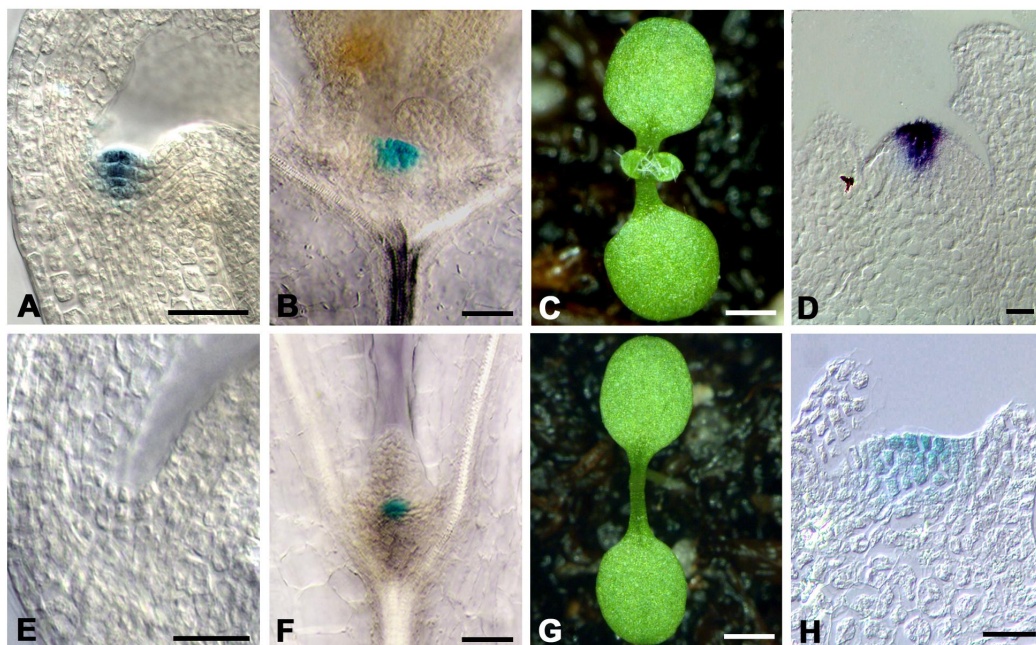


Abb.22: *CLV3::GUS*-Expression im Wildtyp und in *wus*-Mutanten. (A) *CLV3* ist in *Columbia* im reifen Embryo (A) und im 9 Tage alten Keimling (B) in der zentralen Zone des SAMs exprimiert. (C) *Columbia*-Keimling im Alter von 9 Tagen. (D) *CLV3::GUS*-Expression im wildtypischen Achselmeristem. (E) Im reifen *wus*-Embryo fehlt die *CLV3*-Expression. (F) Im 9 Tage alten *wus*-Keimling exprimieren wenige Zellen im SAM *CLV3*. (G) *wus*-Keimling im Alter von 9 Tagen. (H) Die Adventivmeristeme von *wus*-Mutanten exprimieren *CLV3*. Alle *CLV3*-Signale wurden mit Hilfe der β -Glukuronidase-Färbung detektiert - abgesehen von dem Achselmeristem in D, hier handelt es sich um eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung. Maßstab: A,B,D,E,F,H = 20 μ m; C,G = 1mm

Homozygote, reife *wus*-Embryonen sind im Phänotyp deutlich von den wildtypischen Geschwistern zu unterscheiden. Während bei den Wildtypen zwischen den Kotyledonen der typische meristematische Dom mit der *CLV3*-Färbung zu erkennen ist (Abb.22 A), fehlen diese Zellen in *wus-1*-Embryonen (Abb.22 E). Insgesamt wurden 259 Embryonen aus *wus*-heterozygoten Pflanzen präpariert (Tab. 11). Davon konnten 58 Embryonen, (22%, erwartet wurden 25%) anhand des fehlenden Meristems als homozygote *wus*-Mutanten identifiziert werden. Keiner dieser *wus*-mutanten Embryonen exprimierte das *CLV3::GUS*-Reportergen, während von insgesamt 201 wildtypischen Embryonen derselben Linien lediglich 1% in der *GUS*-Färbung negativ waren.

Die Analyse der *CLV3*-Expression im 8-10 Tage alten Keimling zeigte ein anderes Bild. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt haben *wus*-Mutanten ein reduziertes, abgeflachtes Sproßmeristem und die ersten Blattprimordien werden gerade sichtbar (Abb.22 F). Im Wildtypen sind die ersten Blätter jetzt bereits voll ausgebildet (Abb.22 B, C). Von 106 analysierten *wus*-Keimlingen exprimierten 78% *CLV3::GUS* in wenigen Zellen im Zentrum diese Meristems, wobei sowohl die Größe der Expressionsdomäne als auch die Expressionsstärke deutlich reduziert waren. Die *CLV3*-Expression in *wus*-Keimlingen wurde über RT-PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die *wus*-Keimlinge wurden 12 h in der Färbelösung inkubiert; bereits nach 1-2 h war die wildtypische *CLV3::GUS*-Expression sichtbar. Bei den Pflanzen im Alter von etwa 3 Wochen wurde *CLV3*-Expression in den Achselmeristemen sowohl im wildtypischen Muster als auch in einer reduzierten Domäne detektiert (Abb.22 H). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, daß ab einem bestimmten Zeitpunkt die Aufrechterhaltung einer normalen Population von Stammzellen in *wus*-Mutanten problematisch und damit auch die *CLV3*-Domäne reduziert ist.

Insgesamt schien die *CLV3*-Expression während der Entwicklung zunehmend unabhängiger von *WUS* zu werden. So ist *WUS* in der Embryogenese essentiell für die *CLV3*-Aktivierung, d.h. in *wus*-mutanten Embryonen fehlt *CLV3*-Expression vollständig. Nach der Keimung ist *WUS* notwendig zur Verstärkung der *CLV3*-Expression. In Achselmeristemen wird *CLV3* vermutlich nahezu *WUS* unabhängig von anderen Faktoren aktiviert, die redundant mit *WUS* agieren könnten.

	Anzahl Embryonen			Anzahl Keimlinge		
	n gesamt	nicht gefärbt	gefärbt	n gesamt	nicht gefärbt	gefärbt
WT	201	1%	99%	106	1%	99%
<i>wus-1</i>	58	100%	0	106	78%	22%

Tab. 11: Anzahl *CLV3::GUS* gefärbter wildtypischer und *wus*-mutanter Embryonen und Keimlinge. n gesamt = absolute Anzahl gefärbter Pflanzen.

3.5.2 *WUS* verstärkt *CLV3*-Expression nur im Meristem

Nachdem geklärt werden konnte, daß *WUS* nicht essentiell für die Aktivierung von *CLV3* ist, soll im folgenden untersucht werden, ob eine ektopische und konstitutive Expression von *WUS* ausreichend ist, um *CLV3* in der kompletten Pflanze zu exprimieren. Dazu wurde *CLV3*-Expression in transgenen

Pflanzen analysiert, in denen *WUS* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotor exprimiert wird. Das *35S::WUS*-Konstrukt war zusätzlich translational fusioniert mit der hormonbindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptors aus Ratte, so daß das Fusionsprotein erst nach Induktion mit dem Glukokortikoidhormon Dexamethason wirksam wird (Lloyd et al. 1994). Das *35S::WUS-GR* Konstrukt wurde in homozygote, transgene *CLV3::GUS*-Pflanzen transformiert (im weiteren als *WUS-GR* bezeichnet). Die Dex-Induktion und damit die Aktivierung von *WUS* in der gesamten Pflanze erfolgte generell direkt nach der Keimung im Alter von 4 Tagen.

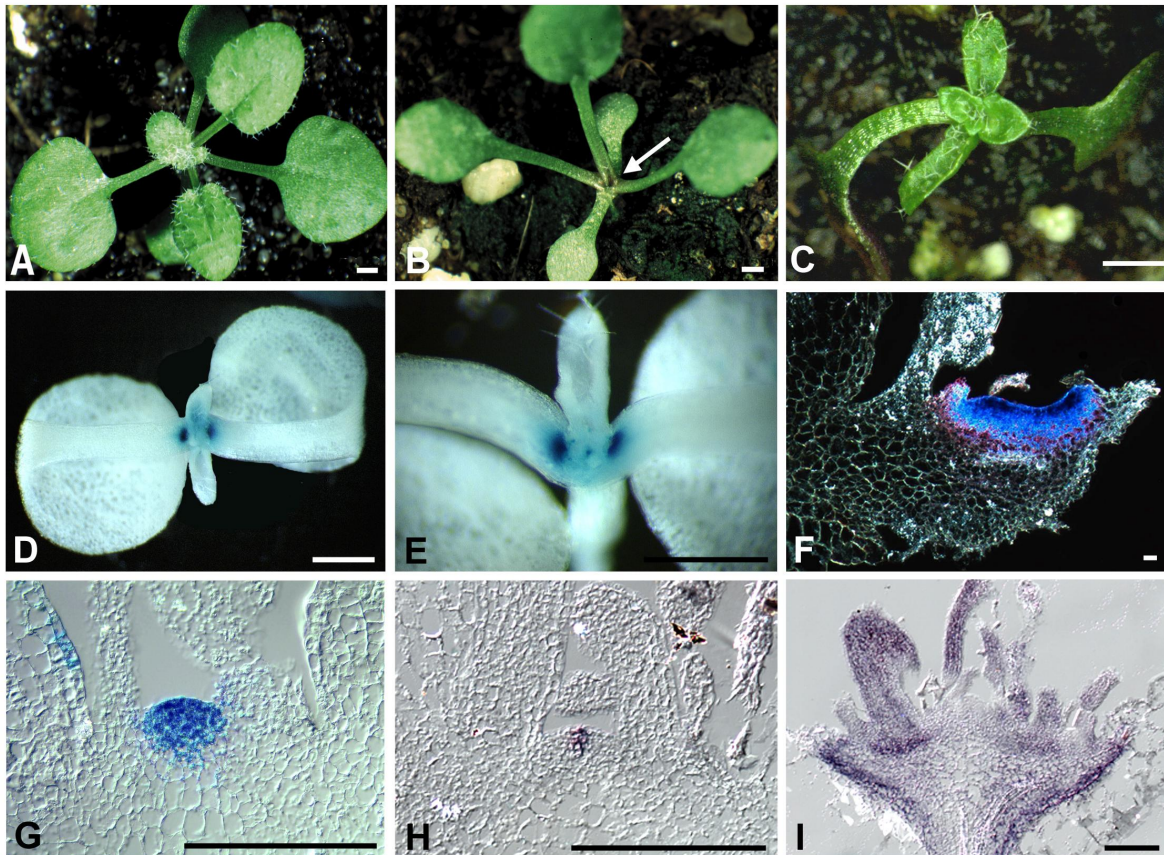


Abb.23: In *35S::WUS-GR* Pflanzen kommt es zur Aktivierung von *CLV3* im Meristem. (A) 3 Wochen alte *Columbia*-Pflanze. (B) *wus*-Mutante im Alter von 3 Wochen. (C) *WUS-GR* Phänotyp (24 Tage alt) nach Dexamethason-Applikation. Die Induktion erfolgte direkt nach der Keimung. Die Kotyledonen sind abwärts eingekollt und die wenigen gebildeten Blätter expandieren nicht. (D) Aufsicht auf eine *WUS-GR*-Pflanze nach der *GUS*-Färbung. *CLV3* ist nur in den Meristemen nachweisbar. (E) Detailaufnahme einer *WUS-GR*-Pflanze nach der *GUS*-Färbung. Die *CLV3*-Expression in den Achselmeristemen ist stärker als im SAM. (F) Longitudinalschnitt durch ein Achselmeristem von *WUS-GR* im Dunkelfeld. *CLV3* ist besonders stark in den äußeren Zellschichten des Meristems aktiviert. (G) *CLV3::GUS* Expression nach einer *GUS*-Färbung im SAM von *WUS-GR*. (H) *CLV3*-Expression im SAM von *WUS-GR* in der RNA-*in-situ*-Hybridisierung. (I) Die RNA-*in-situ*-Hybridisierung zeigt die ektopische Expression von *WUS* in einer *WUS-GR*-Pflanze. Maßstab: A-E = 1mm; F-I = 20 µm

Der Phänotyp von *WUS-GR*-Pflanzen nach Dex-Induktion (24 Tage alt) ist in Abb.23 C dargestellt. Die Kotyledonen der Pflanzen waren nach unten gedreht und die wenigen gebildeten Blätter sind in ihrer Größe stark reduziert, bilden aber Leitbündel und Trichome. Wenn die Dex-Applikation zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung erfolgte, zeigten nur die neugebildeten Blätter den be-

schriebenen Phänotyp. Das *WUS-GR*-Transgen wurde mittels RNA-in-*situ*-Hybridisierung auf seine Funktionalität getestet. Die verwendete *WUS*-Sonde zeigte die für den 35S-Promotor typische ubiquitäre Expression (Abb.23 I). Zudem wurde Blattmaterial der Kotyledonen abgerntet, daraus gesamt RNA präpariert und diese in einer RT-PCR eingesetzt (siehe Kap. 3.6.5). Die ektopische Expression von *WUS* in den untersuchten Pflanzen konnte in beiden Experimenten bestätigt werden.

Wie in Tab. 12 dargestellt, lieferten aus einer Stichprobe von 388 Pflanzen der standardmäßig verwendeten Linie insgesamt 15% den obengenannten Phänotyp. Alle restlichen, nicht induzierbaren Pflanzen sahen wildtypisch aus. Einen wildtypischen Phänotyp lieferten außerdem diejenigen *WUS-GR*-Pflanzen aller verwendeten Linien ohne Dexamethason Applikation. In diesen Fällen war auch das *CLV3::GUS*-Muster wildtypisch.

Insgesamt wurde die *CLV3::GUS*-Expression in 80 *WUS-GR*-Phänotypen aus 3 verschiedenen Linien analysiert. In allen Pflanzen wurde neben der Expression im SAM ein starkes Signal in den Achselmeristemen detektiert. Kein Signal konnte in nicht-meristematischem Gewebe wie Blättern detektiert werden, obwohl diese phänotypisch verändert waren (Abb.23 D,E). Morphologisch waren die auf der adaxialen Seite der Blätter gebildeten Achselmeristeme deutlich von wildtypischen Achselmeristemen zu unterscheiden. Es fehlte der typische meristematische Dom, stattdessen war eine starke seitliche Ausdehnung zu beobachten. *CLV3* war hier besonders stark in den oberen Schichten des Meristems exprimiert wie in der Dunkelfeldaufnahme in Abb.23 F durch die schwarz-blaue Färbung deutlich wird. Die erhaltene *CLV3::GUS*-Färbung wurde durch eine RNA-in-*situ*-Hybridisierung mit *GUS*- und *CLV3*-Sonden bestätigt.

Die Ergebnisse zeigen, daß *WUS* alleine nicht ausreichend ist, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren. Ektopisches *WUS* kann das *CLV3*-Signal lediglich im meristematischen Kontext verstärken, vor allem in den äußeren Zellagen des Meristems. Es läßt sich also spekulieren, daß ein oder mehrere zusätzliche meristemspezifische - vielleicht in der L1/L2 lokalisierte - Faktoren zur *CLV3*-Aktivierung notwendig sind.

P ⁿ	nicht induzierbar		induzierbar	
	BastaS	BastaR	BastaS	BastaR
388	0	85%	0	15%

Tab. 12: Segregation der durch Dexamethason induzierten bzw. nicht induzierten *WUS-GR*-Phänotypen. Dargestellt ist hier die Anzahl an Pflanzen in einer *Columbia* Standardlinie die homozygot für *CLV3-GUS* ist (100% der Pflanzen sind Basta-resistent). In 15% der Pflanzen ist das 35S::*WUS-GR* Konstrukt induzierbar und sie zeigen den oben beschriebenen Phänotyp. Diese Pflanzen exprimierten alle *CLV3::GUS* im Sproßmeristem und in den vergrößerten Achselmeristemen wie in Abb.23 dargestellt. pⁿ = Absolute Anzahl analysierter Pflanzen.

3.6 Expressionsstudien: Kontrolliert *STM* die Expression von *CLV3* ?

STM kodiert ein Homeodomänenprotein und wird im gesamten Sproß- und Blütenmeristem mit Ausnahme der Primordien exprimiert (Long et al.1996). Homozygote *stm*-Mutanten etablieren während der Embryogenese kein sichtbares Meristem (Barton und Poethig,1993). Mutanten mit schwächeren Phänotypen *stm-2*, aber auch amorphe Allele wie *stm-1* und *stm-11* können zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt Adventivmeristeme bilden, die dann aber verfrüht terminieren. Dies legt nahe, daß *STM* auch in der späteren Entwicklung von *Arabidopsis* eine wichtige Rolle bei der Erhaltung einer sich selbst erneuernden Stammzellpopulation spielt (Endrizzi et al., 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften von *STM* soll im folgenden untersucht werden, ob *STM* einen Einfluß auf die Regulation der *CLV3*-Expression hat. Die *CLV3*-Expression wurde deshalb sowohl in *stm*-Mutanten als auch in transgenen Pflanzen mit konstitutiver *STM*-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht.

3.6.1 *STM* ist nicht essentiell für die Aktivierung von *CLV3*

Das *CLV3*-Reportergen wurde auch hier zunächst in die heterozygoten *STM/stm* Mutanten (*stm-1*, *stm-11*, und *stm-5*) gekreuzt. *stm-1* und *stm-11* sind starke Allele ohne funktionelles STM-Protein (Barton und Poethig, 1993; Long und Barton, 1998), während *stm-5* zwar ein starkes Allel ist, aber noch eine Restfunktion des STM-Proteins besitzt (Endrizzi et al., 1996). Die beiden Nullallele lieferten einen höheren Anteil an starken Phänotypen als *stm-5*, bildeten aber zu einem gewissen Prozentsatz auch Adventivmeristeme. Nach Selbstung der F1 wurden F2-basta-resistente Pflanzen von Linien, die 25% *stm*-mutante Phänotypen segregierten, abgeerntet. Hiervon wurden dann homozygote Linien für *CLV3::GUS* etabliert. Mit diesen homozygoten Linien wurden GUS-Färbungen in verschiedenen Entwicklungsstadien angefertigt: aus heterozygoten *STM/stm-11*-mutanten Pflanzen präparierten Embryonen sowie mit mutanten Keimlingen im Alter von 8-10 Tagen und Pflanzen im Alter von ca. 3 Wochen.

Homozygote, reife *stm-11*-Embryonen sind genau wie *wus-1*-Embryonen phänotypisch deutlich von den wildtypischen Geschwistern zu unterscheiden. Während bei den Wildtypen zwischen den Kotyledonen der typische meristematische Dom mit der *CLV3*-Färbung zu erkennen ist (Abb.24 A), fehlen diese Zellen in *stm-11*-Embryonen (Abb.24 E). Insgesamt wurden 309 Embryonen aus *stm-11* heterozygoten Pflanzen präpariert (Tab. 13). Davon konnten 86 Embryonen, d.h. 28% (erwartet werden 25%) phänotypisch als homozygote *stm*-Mutanten identifiziert werden. Von diesen *stm*-Embryonen exprimierten lediglich 7% schwach und nur in 1-3 Zellen das *CLV3::GUS*-Reportergen (Abb.24 E), während in 93% der Embryonen kein Signal detektiert werden konnte. Von insgesamt 223 wildtypischen Embryonen der untersuchten Linien zeigten hingegen 207 (93%) das erwartete *CLV3*-Signal in der *GUS*-Färbung (Tab. 13 und Abb.24 A). *STM* ist während der Embryogenese also nicht absolut essentiell zur Aktivierung von *CLV3*.

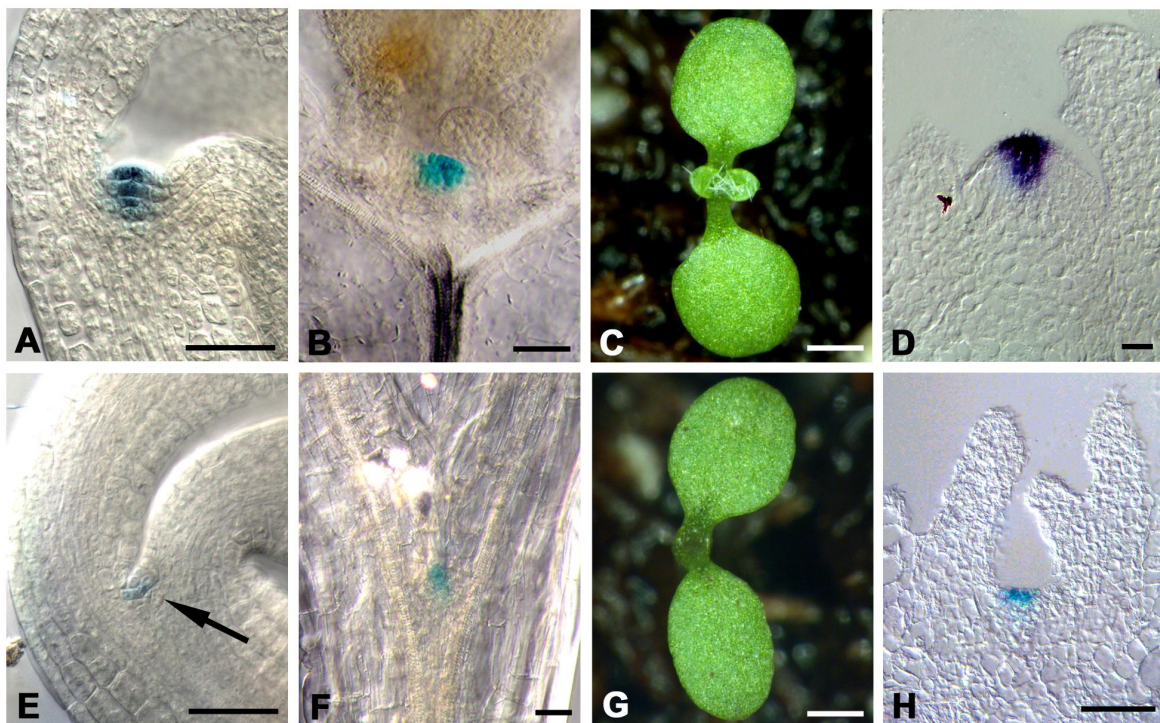


Abb.24: *CLV3::GUS*-Expression im Wildtyp und in *stm-11*-Mutanten. (A) *CLV3* ist in Columbia im reifen Embryo (A) und im 9 Tage alten Keimling (B) in der zentralen Zone des SAM exprimiert. (C) *Columbia*-Keimling im Alter von 9 Tagen. (D) *CLV3::GUS*-Expression im wildtypischen Achselmeristem. (E) Im reifen *stm-11*-Embryo ist *CLV3* in 7% der untersuchten Embryonen exprimiert. (F) Im 9 Tage alten *stm-11*-Keimling exprimieren wenige Zellen im SAM *CLV3*. (G) *stm-11*-Keimling im Alter von 9 Tagen. (H) Die Adventivmeristeme in *stm-11* exprimieren *CLV3*. Alle *CLV3*-Signale wurden mit Hilfe der β -Glukuronidase-Färbung detektiert. Abgesehen von dem Achselmeristem in D, hier handelt es sich um eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung. Maßstab: A,B,D,E,F,H = 20 μ m; C,G = 1mm

Die Analyse der *CLV3*-Expression im 8-10 Tage alten Keimling zeigte ein anderes Ergebnis. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt haben *stm*-Mutanten in der Regel ein reduziertes, abgeflachtes Sproßmeristem. Im Wildtypen waren die ersten Blätter jetzt bereits voll ausgebildet (Abb.24 B,C). Von 59 analysierten *stm-11*, bzw. 27 *stm-1* Keimlingen exprimierten 25% bzw. 22% *CLV3* 3-4 Zellen im Zentrum der defekten Meristeme. Auch diese Färbung wurde ca. 12 Stunden inkubiert, während die wildtypische *CLV3::GUS* Expression bereits nach 1-2 h sichtbar ist.

Ursprünglich stammt das *CLV3::GUS*-Reportergen aus dem *Columbia*-Hintergrund, während die *stm*-Allele im *Landsberg/Ler*-Hintergrund vorliegen. Um auszuschließen, daß die *CLV3*-Färbung in diesen beiden *stm*-Allelen ursächlich mit dem *Ler*-Hintergrund verknüpft ist, wurden zusätzlich *stm-5*-Mutanten analysiert, die unter den hier verwandten Wachstumsbedingungen einen leicht schwächeren Phänotyp lieferten. Von 48 homozygoten *stm-5* Keimlingen exprimierten 56% *CLV3*. Dies erlaubt die Schlußfolgerung, daß die Segregation der *CLV3::GUS*-Färbung in *stm-1* und *stm-11* nicht durch genetische Effekte des *Ler*-Hintergrundes entstanden ist, sondern mit der Stärke des mutanten Phänotyps korreliert. Der Anteil *CLV3*-exprimierender Mutanten korreliert zudem mit den von Clark et al. (1996) gefundenen 14-32% *stm-1*-Mutanten, die neben den Kotyledonen auch Adventivmeristeme und weitere Blätter bilden, also auch Stammzellen erhalten. Die *stm*-Mutanten wurden zudem

im Alter von etwa 3 Wochen gefärbt und es konnte *CLV3*-Expression in einer verkleinerten Domäne in den Adventivmeristeme detektiert werden (Abb.24 H).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß *STM* nicht generell notwendig für die Aktivierung von *CLV3* im Embryo und im Keimling ist. *STM* scheint jedoch die *CLV3*-Expression zu verstärken, da in *stm*-Mutanten die Expressionsstärke von *CLV3* deutlich reduziert ist.

	Anzahl Embryonen			Anzahl Keimlinge		
	n gesamt	nicht gefärbt	gefärbt	n gesamt	nicht gefärbt	gefärbt
WT	223	7%	93%	101	7%	93%
<i>stm-11</i>	86	93%	7%	59	75%	25%
<i>stm-1</i>		n.d.		27	78%	22%
<i>stm-5</i>		n.d.		48	44%	56%

Tab. 13: Anzahl Emryonen und Keimlinge nach *CLV3::GUS*-Färbung. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl und der prozentuale Wert der Pflanzen mit und ohne *CLV3* Expression. Während nur 6% der *stm-11* Embryonen *CLV3* exprimieren, sind es im 8-10 Tage alten Keimling schon 25%. In *stm-5* mutanten Keimlingen, die keine Nullmutanten sind und einen leicht schwächeren Phänotyp liefern, exprimieren sogar 56% der Pflanzen *CLV3*. Die Embryonendaten wurden mit 2 verschiedenen Linien erhoben und anschließend zusammengefasst, die Keimlingsdaten für *stm-11* und *stm-5* aus 5 Linien und für *stm-1* aus 2 verschiedenen Linien. n.d. = nicht detektiert

3.6.2 *STM* aktiviert *CLV3* nicht in der gesamten Pflanze

Die Ergebnisse der Expressionsstudien in *stm*-Mutanten haben gezeigt, daß *STM* weder im Embryo noch zu späteren Entwicklungszeitpunkten zur Aktivierung von *CLV3* essentiell ist. Ebenso wie in den Untersuchungen zu *WUS* soll im folgenden geklärt werden, ob ektopisch und konstitutiv exprimiertes *STM* alleine ausreicht, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu induzieren.

Das *CLV3*-Reportergen wurde deshalb auch hier in transgene Pflanzen gekreuzt, die *STM* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors konstitutiv in der ganzen Pflanze exprimieren. *35S::STM* führt zu stark reduzierten Pflanzen mit extrem fehlorganisierten Meristemen und einem Entwicklungsstop im frühen Keimling (Williams et al., 1998). Um *35S::STM* nun gezielt in bestimmten Entwicklungsstadien durch Dexamethason-Applikation aktivieren zu können, wurde das Konstrukt mit der hormonbindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptor aus Ratte fusioniert. Das *CLV3*-Reportergen wurde durch Kreuzung in die transgenen *35S::STM-GR*-Pflanzen eingebracht (im weiteren als *STM-GR* bezeichnet).

Die *STM-GR*-Pflanzen wurden direkt nach der Keimung im Alter von 4 Tagen mit dem Glukokortikoidhormon Dexamethason induziert. Die Auswertung der Pflanzen wurde ebenfalls im Alter von 24 Tagen vorgenommen, so daß sie physiologisch mit den *WUS-GR*-Transgenen vergleichbar waren. Verwendet wurden hier Linien (F3-Generationen), die noch nicht homozygot für *CLV3::GUS* waren (Tab. 14), aber vor einer Auswertung immer mit Basta auf das Reportergen selektioniert wurden. Eine Selektion auf *STM-GR* konnte anhand des deutlich zu erkennenden Phänotyps erfolgen (Abb.25 C, D). Nicht induzierbare Geschwisterpflanzen und *STM-GR*-Kontrollen ohne Dexamethasonapplikation sahen wildtypisch aus und exprimierten *CLV3::GUS* im wildtypischen Muster. Analysiert wur-

den insgesamt 4 aus verschiedenen Kreuzungen hervorgegangenen Linien, die alle die gleichen Ergebnisse liefern.

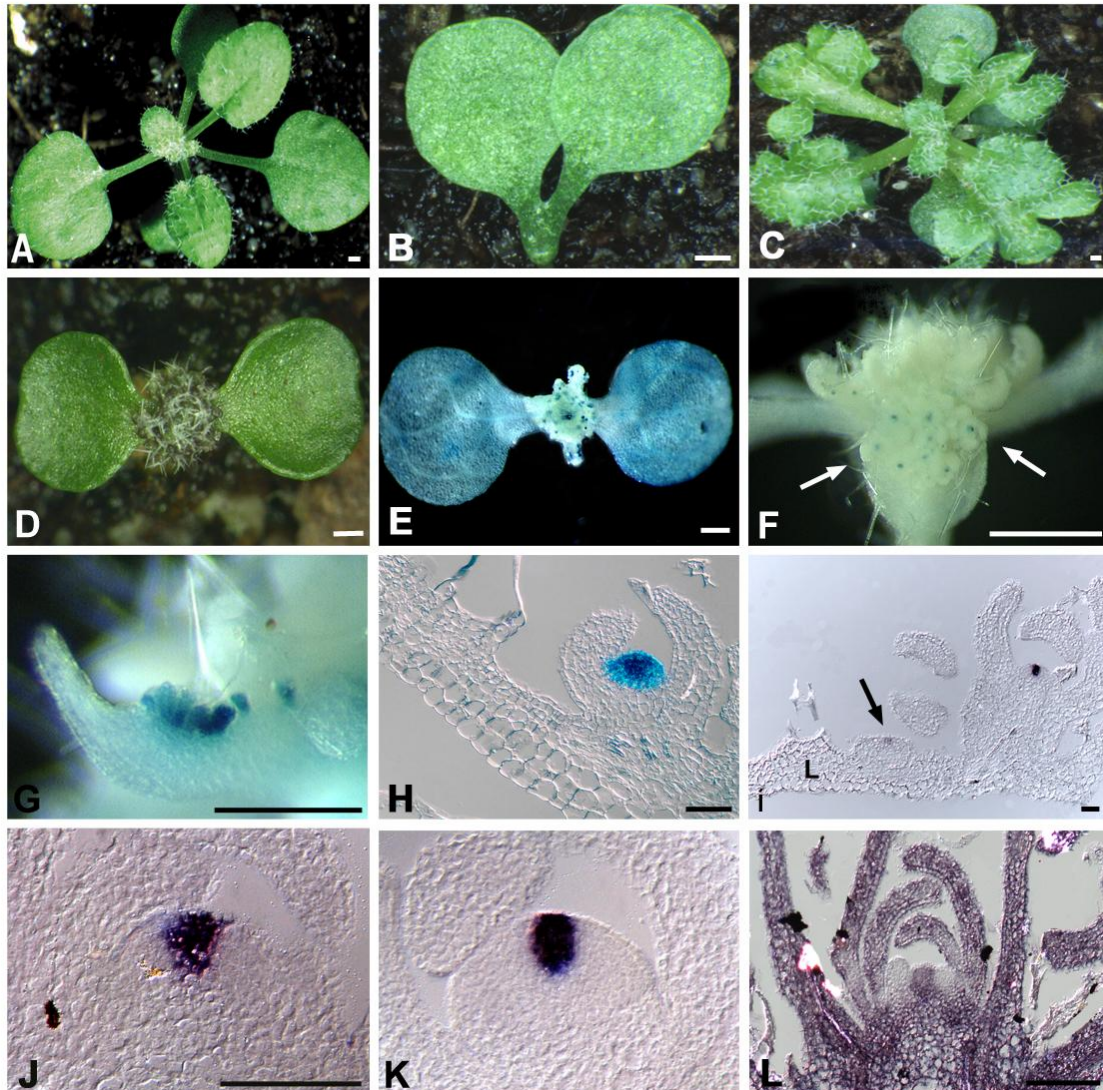


Abb.25: In *STM-GR*-Pflanzen kommt es zur Aktivierung von *CLV3::GUS* im Meristem, Stipulen und Blättern. (A) 3 Wochen alte *Columbia* Pflanze. (B) *stm-11*-Mutante im Alter von 3 Wochen. (C) Schwacher *STM-GR*-Phänotyp. (D) Starker *STM-GR*-Phänotyp, 24 Tage alt, nach Dexamethason Applikation. Die Induktion erfolgte direkt nach der Keimung. Die Kotyledonen wurden normal gebildet und die zahlreich gebildeten Blätter um das SAM herum expandierten nicht. Alle Analysen wurden mit dem starken Phänotyp in diesem Alter gemacht. (E) Aufsicht auf eine *STM-GR* Pflanze nach der *GUS*-Färbung. *CLV3::GUS* ist im SAM, den Stipulen, den ectopischen Meristemen und hier auch in den Kotyledonen nachweisbar. (F) Seitliche Detailaufnahme einer *STM-GR*-Pflanze nach der *GUS*-Färbung. Deutlich sichtbar ist die *CLV3*-Expression in den ectopischen Meristemen auf der Blattoberfläche. (G) Detailaufnahme der GUS-gefärbten ectopischen Stipulen entlang der Blattspreite. (H,I) Longitudinalschnitt durch die ectopischen Meristeme auf der Blattoberfläche von *STM-GR* nach GUS-Färbung (H) und RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit einer *CLV3*-Sonde (I). *CLV3* ist in diesen ectopischen Meristemen im wildtypischen Muster exprimiert. (J) *GUS*-Expression in der *in-situ*-Hybridisierung im SAM von *STM-GR*. (K) *CLV3*-Expression im SAM von *STM-GR* in der RNA-*in-situ*-Hybridisierung. (L) Die RNA-*in-situ*-Hybridisierung zeigt die ectopische Expression von *STM* in einer *STM-GR*-Pflanze. Maßstab: A-G = 1mm; H-L = 20 μ m

Die induzierten *STM-GR*-Pflanzen ließen sich in zwei phänotypische Klassen unterteilen. 21 % der induzierbaren Pflanzen lieferten einen schwachen Phänotyp (Abb.25 C) mit einer normalen Anzahl an stark gelappten Rosettenblättern. Solche Pflanzen bildeten auch eine Infloreszenz mit teilweise fertilen Blüten. 79% der insgesamt induzierbaren Pflanzen zeigten einen starken Phänotyp (Abb.25 D), der für alle weiteren Analysen verwendet wurde. Die korrekte ektopische Expression des *STM-GR*-Transgens wurde mittels RNA-in-*situ*-Hybridisierung (Abb.25 L) und RT-PCR überprüft und bestätigt (s. Kap. 3.6.5). Die Kotyledonen der starken *STM-GR*-Pflanzen waren etwas runder als im Wildtyp und die Pflanzen produzierten eine große Anzahl kleiner, schmaler Blätter, die gelappt waren. Auf diesen Blättern fanden sich voll differenzierte Trichome und die Blattspreite war umrandet von ektopischen Stipulen (Abb.25 G), von denen sich im Wildtyp nur je zwei direkt an der Blattbasis befinden. Sie werden im Wildtyp schon kurz vor dem Blattprimordium sichtbar und grenzen es lateral zum Meristem hin ab. Wenn die Aktivierung von *STM-GR* mittels Dexamethason erst später nach der Bildung einiger Blätter erfolgte, zeigten die darauf gebildeten Blätter den beschriebenen Phänotyp. Auf der adaxialen Blattseite, seltener auch auf den Kotyledonen, bildeten die *STM-GR*-Pflanzen ektopische Meristeme (Abb.25 F). Neben einem starken *CLV3*-Signal in der zentralen Zone des Sproßapikalmeristems (Abb.25 K), ergab die GUS-Färbung mit diesen Pflanzen ebenfalls ein deutliches *CLV3*-Signal im wildtypischen Muster in den ektopischen Meristemen (Abb.25 H, I). Außerdem färbten viele der untersuchten Pflanzen in den oben genannten Stipulen. Diese Stipulen waren hauptsächlich in der unteren Hälfte, also eher im undifferenzierten Teil blau angefärbt (Abb.25 G). Insgesamt wurde die *CLV3*-Expression in 276 einzelnen *STM-GR*-Pflanzen analysiert. Von diesen färbten alle im Sproßmeristem und den ektopischen Meristemen sowie in den Stipulen. In einer weiteren Stichprobe von 191 *STM-GR*-Pflanzen mit starkem Phänotyp wiesen 34% exakt diese Färbungen auf. (Tab. 15). In 52% der Pflanzen war zusätzlich noch eine diffuse blaue Färbung in den Leitündern zu erkennen, die im Wildtyp nicht auftrat und in 15% der Pflanzen waren zusätzlich die Kotyledonen blau angefärbt. Mittels sensitiver fluorometrischer Messungen wurde festgestellt, daß eine GUS-Aktivität in den Blättern erstmals 5-6 Tage nach der Dexamethason-Induktion auftrat (Daten nicht gezeigt). In der RNA-in-*situ*-Hybridisierung und in der RT-PCR konnte die diffuse Blatt- und Leitbündelfärbung jedoch nicht als *CLV3*-Expression bestätigt werden.

Es läßt sich zusammenfassend feststellen, daß eine ektopische Expression von *STM* alleine nicht ausreichend ist, um *CLV3*-Expression in der kompletten Pflanze zu aktivieren. *STM* fördert die Bildung ektopischer Meristeme und damit auch die Expression meristemspezifischer Gene, in deren Folge indirekt *CLV3* in diesen Meristemen aktiviert wird.

P ⁿ	nicht induzierbar		induzierbar	
	BastaS	BastaR	BastaS	BastaR
1226	14%	44%	12%	30%

Tab. 14: Anzahl Dexamethason-induzierter und nicht-induzierter Pflanzen in der standardmäßig verwendeten *STM-GR*-Linie (Generation F3). Insgesamt wurden 1226 Pflanzen ausgewertet. Es waren 30% der Basta-resistenten und damit *CLV3::GUS*-transgenen Pflanzen Dex-induzierbar und lieferten den *STM-GR*-Phänotyp. pⁿ = Absolute Anzahl analysierter Pflanzen, BastaS = Basta sensitiv, BastaR = Basta-resistent.

Intensität der GUS-Färbung in STM-GR				
P ⁿ	keine	I	II	III
191	0%	34%	52%	15%

Tab. 15: Anzahl GUS-gefärbter STM-GR-Pflanzen mit dem CLV3::GUS-Reportergen. Angegeben sind die unterschiedlichen Färbintensitäten I – III. Färbung I zeigte ausschließlich im SAM, in den ektopischen Meristemen und den Stipulen ein CLV3::GUS-Signal. Pflanzen mit der Farbintensität II wiesen zusätzlich eine leichte diffuse Färbung in den Leitbündel auf und Pflanzen der Farbintensität III hatten neben der Meristemfärbung blau angefärbte Kotyledonen. n gesamt = absolute Anzahl analysierter Pflanzen.

3.6.3 WUS ist in 35S::STM-GR-Pflanzen nicht ektopisch exprimiert

Es konnte im vorangehenden Kapitel gezeigt werden, daß CLV3::GUS-Färbung in STM-GR-Pflanzen im SAM, den ektopischen Meristemen, in Stipulen sowie teilweise in Blättern induziert wurde. In einem weiteren Schritt soll nun geklärt werden, ob WUS in diesen STM-GR-Pflanzen ektopisch exprimiert ist. Die STM-GR-Pflanzen wurden dazu 4 Tage nach der Keimung mit Dexamethason induziert und im Alter von 24 Tagen für die RNA-in-situ-Hybridisierung fixiert und dann mit einer WUS-Sonde hybridisiert.

Wie in Abb.26 gezeigt, war WUS in einer kleinen Zellgruppe im Zentrum des Meristems unterhalb der CLV3-Domäne exprimiert. Das Expressionsmuster war sowohl im SAM als auch in den ektopischen Meristemen mit der wildtypischen Situation vergleichbar. Eine ektopische Expression von WUS konnte nicht festgestellt werden. Eine ektopische Expression von STM induziert folglich weder WUS- noch CLV3-Expression im nicht meristematischen Kontext.



Abb.26: WUS ist in STM-GR Pflanzen wildtypisch exprimiert. (A) Starker STM-GR-Phänotyp im Alter von 24 Tagen. (B) Eine RNA-in-situ-Hybridisierung zeigt ein wildtypisches WUS-Signal im SAM von STM-GR Pflanzen. (C) Auch die Achselmeristeme exprimieren WUS wildtypisch. Maßstab: A = 500 µm; B,C = 20 µm

3.6.4 *STM* kann auch in *wus*-Mutanten *CLV3*-Expression aktivieren

Die ektoische Expression von *STM* aktiviert weder *CLV3* noch *WUS* in der gesamten Pflanze. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Aktivität von *WUS* notwendig ist, um den *STM-GR*-Phänotyp mit der dafür charakteristischen *CLV3*-Expression zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde das beschriebene *STM-GR*-Transgen mit heterozygoten *WUS/wus-1*-Pflanzen gekreuzt. Nach der Selbstung der F1 wurden in der nächsten Generation die homozygoten *wus-1*-Pflanzen ca. 7 Tage nach der Keimung identifiziert, mit Dexamethason induziert und mit Basta auf das Vorhandensein des *CLV3*-Reportergens selektioniert. Die Auswertung erfolgte wie bei den oben beschriebenen Pflanzen 3 Wochen nach Dexamethason-Applikation. Phänotypisch ähnelten diese Pflanzen im *wus-1*-Hintergrund in starkem Maße den beschriebenen *STM-GR*-Pflanzen (Abb.27). Die zahlreich gebildeten Blätter expandierten kaum, waren gelappt mit komplett ausdifferenzierten Trichomen und bildeten ebenfalls Stipulen rund um die Blattspreite. Insgesamt wurden 17 solcher Pflanzen einer *GUS*-Färbung unterzogen. Zwei der Pflanzen wiesen kein *GUS*-Signal auf, während die restlichen 15 Pflanzen *CLV3::GUS* im SAM, den Stipulen (Abb.27 C) sowie vereinzelt diffus in den Leitbündeln exprimierten.

Es konnte lediglich in einer der 17 *STM-GR/wus-1*-Pflanzen ein einzelnes ektoisches Meristem auf einem Blatt identifiziert werden, das zusätzlich *CLV3* exprimiert. Auf allen anderen Blättern fanden sich lediglich Stipulen. *STM-GR* in *Columbia*-Hintergrund führt dazu, daß nahezu alle transgenen Pflanzen ektoische Meristeme initiieren. Die stark verminderte Bildung ektoischer Meristeme in *STM-GR/wus*-Pflanzen läßt den Schluß zu, daß *WUS* das Gen *STM* bei deren Initiierung unterstützen könnte. Da aber der Phänotyp von *STM-GR* im Wildtypen und *wus-1*-mutantem Hintergrund vergleichbar ist, scheint *WUS* kein essentielles Zielgen von ektoisch exprimiertem *STM* zu sein. Auch dies legt nahe, daß *CLV3* und *WUS* einerseits und *STM* andererseits unabhängig von einander agieren.



Abb.27: *STM-GR* kann auch im *wus-1*-Mutanten *CLV3*-Expression aktivieren. (A) *STM-GR*-Pflanze im Alter von 3 Wochen. (B) *STM-GR/wus-1*-Pflanzen bildeten im Alter von 3 Wochen zahlreiche Blätter, die nicht expandierten und zeigten einen mit *STM-GR* vergleichbaren Phänotyp. (C) Blatt mit ektoischen Stipulen einer *STM-GR/wus-1*-Pflanze im gleichen Alter nach *GUS*-Färbung. Maßstab: 500 µm

3.6.5 Koexpression von *STM-GR* und *WUS-GR*: *STM* und *WUS* können gemeinsam *CLV3*-Expression in Blättern aktivieren

Es konnte gezeigt werden, daß weder *WUS* noch *STM* alleine *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze, also auch in nicht-meristematischem Gewebe, aktivieren können. Daher sollte in einem weiteren Experiment geprüft werden, ob die Koexpression von beiden Genen ausreichend für eine solche Aktivierung von *CLV3* ist.

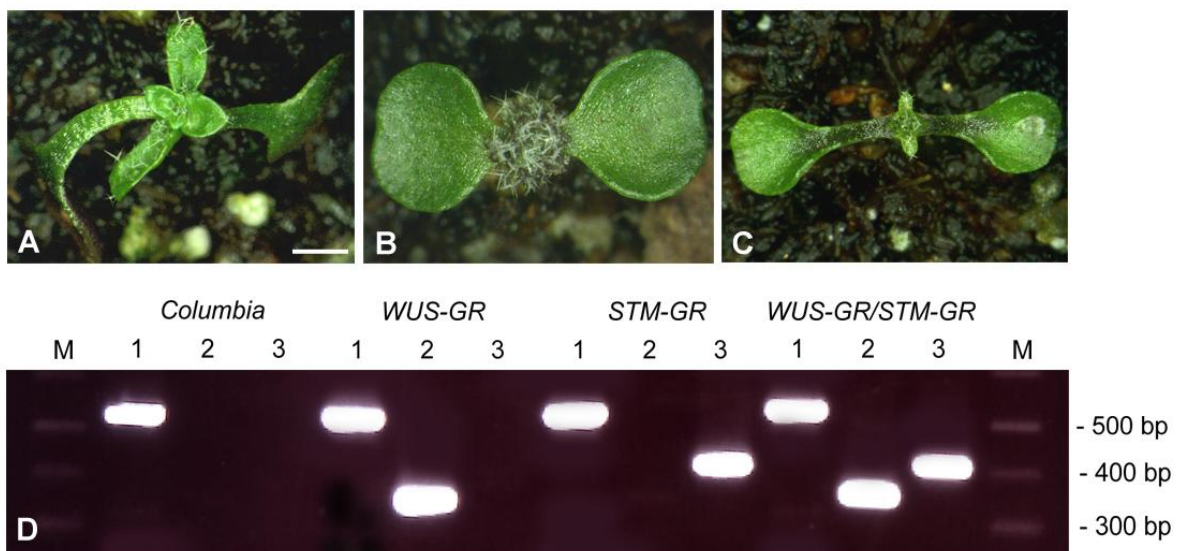


Abb.28: *STM-GR/WUS-GR*-transgene Pflanzen liefern einen neuen Phänotyp. (A) *WUS-GR*-transgene Pflanze. (B) *STM-GR*-transgene Pflanze. (C) *STM-GR/WUS-GR*-Pflanze. Alle Pflanzen sind 24 Tage alt und wurden direkt nach der Keimung mit Dexamethason induziert. (D) RT-PCR zur Kontrolle der Transgen-Expression. M = Marker, 1 = *GAPC*-Transkript, 2 = *WUS*-Transkript, 3 = *STM*-Transkript. Nur *STM-GR/WUS-GR*-Pflanzen exprimieren sowohl *STM* als auch *WUS* in den Kotyledonen. Maßstab: A,B = 1mm

Die Herstellung der doppelt induzierbaren Transgenen erfolgte durch Kreuzung. Nach Selbstung der F1, wurden die Pflanzen in der F2-Generation direkt nach der Keimung mit Dexamethason induziert und ebenfalls im Alter von 24 Tagen ausgewertet. Diese, im weiteren als *STM-GR/WUS-GR* bezeichneten Pflanzen, konnten so als eine neue phänotypische Klasse neben den jeweils einzeln überexprimierenden Geschwisterpflanzen identifiziert werden. Wie in Abb.28 im Vergleich dargestellt, waren die Kotyledonen länglicher als in *STM-GR*-Pflanzen und leicht nach oben gewölbt. Die beiden Primärblätter wurden mit voll ausdifferenzierten Trichomen gebildet, expandierten aber bis zum Alter von 8 Wochen nicht weiter. Ektopische Stipulen bzw. Meristeme auf den Blättern wie in *STM-GR* oder lateral vergrößerte Achselmeristeme wie in *WUS-GR* wurden nicht gebildet. Vielmehr fanden sich Felder aus kleinen, kompakten, meristemartigen Zellen, die sich vom SAM aus bis auf die Petiolen der Kotyledonen zogen (Abb.29 A). Regelmäßig verteilt bildeten sich primordienartige Ausstülpungen, die sich nicht weiter differenzierten. In 4 unabhängigen Linien konnten von insgesamt 558 analysierten Pflanzen 27% als *STM-GR/WUS-GR* identifiziert werden (Tab. 16).

Linie Nr.	n gesamt	Anzahl induzierbarer Pflanzen			nicht induzierbar
		WUS-GR	STM-GR	STM-GR/ WUS-GR	
18	107	17%	29%	10%	44%
10	159	7%	48%	27%	18%
8	112	14%	36%	36%	14%
9	180	16%	39%	32%	13%
gesamt	558	13%	39%	27%	21%

Tab. 16: Anzahl induzierter und nicht-induzierter Pflanzen in 4 verschiedenen F2 Linien. Von insgesamt 558 Einzelpflanzen waren 21% nicht mit Dexamethason induzierbar. Insgesamt 27% der Pflanzen lieferten den neuen *STM-GR/WUS-GR* Phänotyp, während 13% nur *WUS* und 39% nur *STM* ectopisch exprimierten.

Zur Kontrolle der korrekten Transgen-Expression wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden die Oligonukleotide *GAPC1,2*; *WUS2r,f* und *STMr,f* verwendet. Es wurden Kotyledonen von allen drei GR-Genotypen und von *Columbia* abgeerntet, die frei von meristematischen Strukturen waren. Mit diesem Material wurde eine RT-PCR durchgeführt (Abb.28 D). Alle Genotypen wurden sowohl auf *GAPC*- als auch auf *WUS*- und *STM*-Expression hin getestet. Beide Transkripte zusammen waren lediglich in den Kotyledonen der als neu identifizierten phänotypischen Klasse der *STM-GR/WUS-GR*-Pflanzen nachzuweisen. Die jeweils einzeln für *WUS*- bzw. *STM*-induzierbaren Genotypen exprimierten entweder nur *WUS* oder nur *STM* in den Kotyledonen.

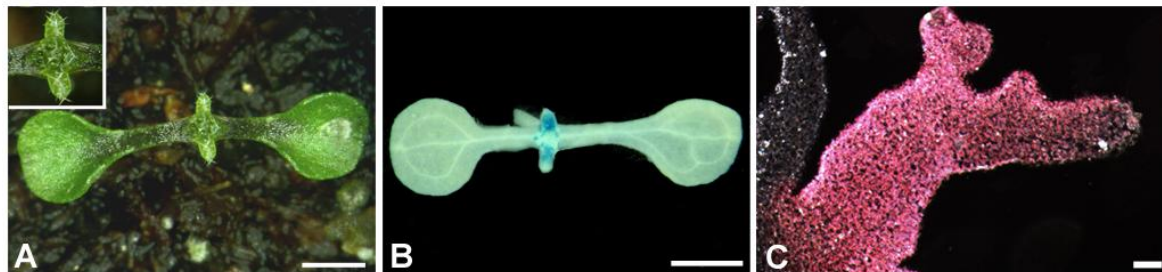


Abb.29: *STM-GR/WUS-GR* aktiviert *CLV3* in geringem Maße in Blättern. (A) *STM-GR/WUS-GR* Pflanze im Alter von 3 Wochen mit einer Detailaufnahme des SAM. (B) *STM-GR/WUS-GR*-Pflanze nach *GUS*-Färbung. Ein starkes *CLV3::GUS*-Signal konnte in den meristematischen Zellen im Bereich des SAM und ein schwächeres in den Primärblättern detektiert werden. (C) Longitudinalschnitt durch ein *STM-GR/WUS-GR*-Primärblatt. Die Dunkelfelddarstellung zeigt die schwache *CLV3*-Expression in hellrot. Maßstab: A,B = 1mm; C = 20 μm

Insgesamt wurden 45 der *STM-GR/WUS-GR*-Pflanzen einer *GUS*-Färbung unterzogen. Im Gegensatz zu *STM-GR*- oder *WUS-GR*-Pflanzen konnte das *CLV3*-Reportergen bei 84% dieser Pflanzen in den Primärblättern deutlich detektiert werden (Abb.29 B, C). Die Expressionsstärke war wesentlich geringer als die *CLV3*-Expression in den meristematischen Strukturen der einzeln induzierten Pflanzen. Diese Pflanzen zeigten ein starkes *CLV3::GUS*-Signal in den meristematischen Zellen im Bereich des SAM. In einer Pflanze wurde kein *CLV3*-Signal detektiert und zwei Pflanzen exprimierten *CLV3* analog zu *WUS-GR* nur in den Blattachsen und nicht im eigentlichen Blattgewebe.

Folglich können *STM-GR* und *WUS-GR* auch gemeinsam eine *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze nicht induzieren. Lediglich in den Primärblättern konnte in fast allen Pflanzen ein schwaches ektopisches *CLV3::GUS*-Signal beobachtet werden.

3.7 Expressionsstudien: Welche weiteren meristemspezifischen Gene kontrollieren die *CLV3*-Expression ?

Neben *WUS* und *STM* könnten noch zahlreiche andere Gene im Zusammenhang mit *CLV3* relevant sein. Einige dieser Gene wurden entsprechend den Kriterien in Kapitel 1.3 ausgewählt und durch Expressionsstudien mit dem *CLV3*-Reportergen bezüglich ihres Einflusses auf die Regulation der *CLV3*-Expression näher analysiert.

3.7.1 *CLV3*-Expression fehlt in *cuc1/cuc2*-Doppelmutanten

Zunächst soll die Abhängigkeit der *CLV3*-Expression von den beiden funktionell redundanten Genen *CUC1* und *CUC2* analysiert werden. Die Expressionsdomänen beider Gene flankieren die Expressionsdomäne von *WUS* und sind notwendig zur Etablierung des embryonalen SAM. *CUC1* ist als ein positiver Regulator von *STM* identifiziert worden (Takada et al., 2001). In *cuc1/2*-Doppelmutanten sind die Kotyledonen an der Basis fusioniert, welches dem Keimling ein tassenförmiges Aussehen verleiht. Ein SAM wird während der Embryogenese nicht etabliert und die Pflanzen entwickeln sich nur bis zum Keimlingsstadium (Abb.30 F).

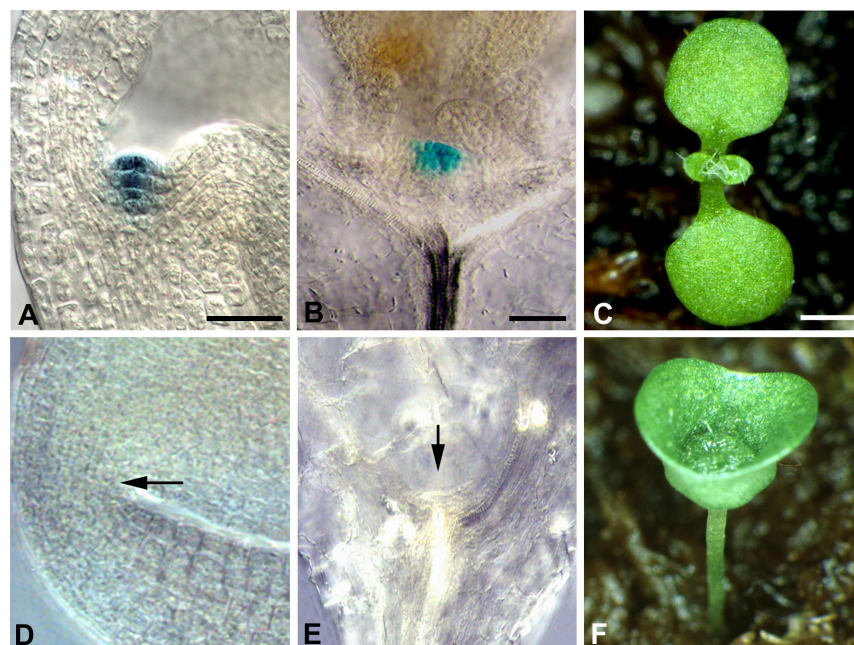


Abb.30: *CLV3* ist in *cuc1/cuc2*-Doppelmutanten nicht exprimiert. *CLV3* ist im reifen wildtypischen Embryo (A) und im Keimling (B) in der zentralen Zone des SAM exprimiert. (C) Wildtypischer Keimling im Alter von 9 Tagen. (D) *CLV3*-Expression konnte weder im *cuc1/cuc2*-mutanten Embryo, noch im Keimling (E) nachgewiesen werden. (F) *cuc1/cuc2*-mutanter Keimling im Alter von 9 Tagen. Maßstab: A,B,D,E = 20 µm; C,F = 1mm

Zunächst wurde die *CLV3*-Expression in *cuc1/2*-mutanten Embryonen untersucht, die aus heterozygoten Pflanzen präpariert wurden. Insgesamt wurden 24 homozygote *cuc1/2*-Embryonen einer GUS-Färbung unterzogen. In keinem war ein *CLV3*-Signal detektierbar (Abb.30 D), während alle wildtypischen Geschwisterpflanzen *CLV3::GUS* im SAM exprimierten. *CLV3*-Expression konnte auch in keinem von insgesamt 21 untersuchten *cuc1/2*-Keimlingen im Alter von 9-14 Tagen nachgewiesen werden (Abb.30 E).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß *cuc1/2*-Doppelmutanten kein SAM etablieren und zu keinem Entwicklungszeitpunkt *CLV3* exprimieren.

3.7.2 *PNH* ist während der Embryogenese für die Expression von *CLV3* essentiell

Das Gen *PNH* ist bei der Entwicklung des embryonalen SAM notwendig für die Aufrechterhaltung der undifferenzierten Stammzellpopulation. Um die *CLV3*-Expression in *pnh*-Mutanten zu untersuchen, wurde das *CLV3*-Reportergen direkt in die homozygoten Mutanten transformiert. Zur Analyse wurden T3-*CLV3::GUS/pnh-2*-Pflanzen verwendet, die klar als *pnh*-Mutanten zu identifizieren waren. Zunächst wurde die *CLV3*-Expression in reifen Embryonen aus 5 verschiedenen Linien untersucht.

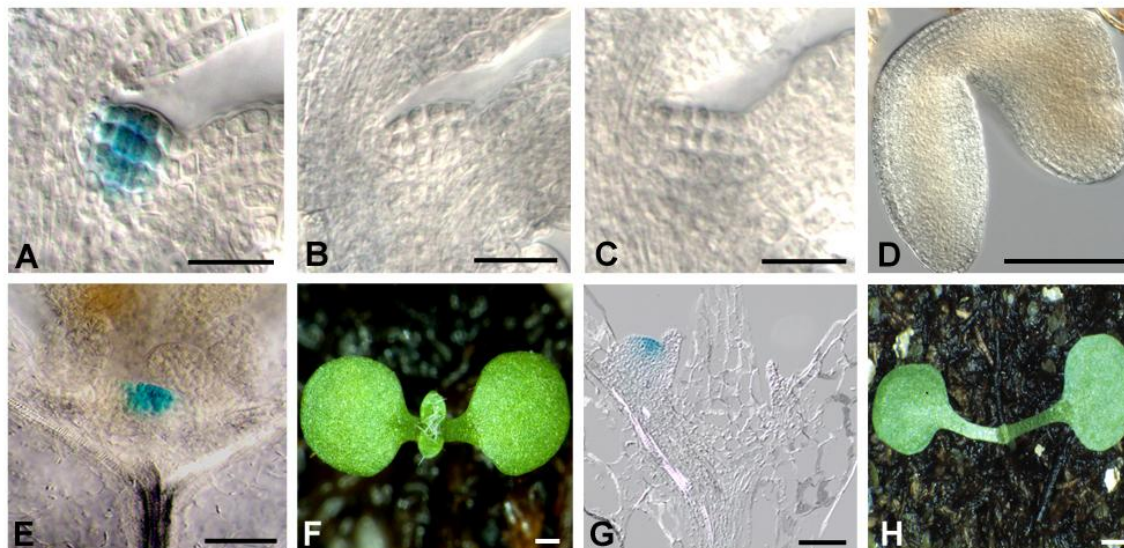


Abb.31: *CLV3*-Expression fehlt in *pnh*-mutanten Embryonen. (A) *CLV3*-Expression im reifen wildtypischen Embryo. Weder *pnh*-mutante Embryonen mit wildtypischem SAM (B) noch mit abgeflachtem SAM (C) exprimieren *CLV3*. (D) 24% der *pnh*-Embryonen waren morphologisch völlig abnorm. Auch hier konnte keine *CLV3* Expression detektiert werden. (E) *CLV3*-Expression nach GUS-Färbung in *Columbia*. (F) *Columbia* Keimling. (G) *CLV3* ist in *pnh*-Keimlingen in den Adventivmeristemen wildtypisch exprimiert. Diese Adventivmeristeme werden rechts und links der filamentartigen Struktur initiiert. (H) *pnh*-mutanter Keimling. Zwischen den Kotyledonen wird eine filamentartige Struktur gebildet. Maßstab: 20 µm; F,H = 1mm

Wie bereits bei Lynn et al. (1999) beschrieben, zeigten die *pnh*-Embryonen nicht generell ein defektes SAM (Abb.31 B). Von insgesamt 124 analysierten Embryonen sahen 44% wildtypisch aus, d.h. zwischen den Kotyledonen wurde ein histologisch normales Meristem gebildet. In 32% der Embryonen war das SAM deutlich abgeflacht, wies im Gegensatz zu *wus*- oder *stm*-Mutanten jedoch meristemartige Zellen auf (Abb.31C). 24% der Embryonen waren völlig abnorm und nicht keimfähig (Abb.31 D). Ihre Kotyledonen waren fusioniert, stark verkürzt oder es wurde nur ein Keimblatt gebildet. Keiner der *pnh* Embryonen in den drei verschiedenen phänotypischen Klassen exprimierte *CLV3*.

Im nächsten Schritt wurden die Samen der 5 Pflanzen, die zur Präparation der Embryonen verwendet wurden, abgeerntet und zur Keimung gebracht. Dadurch konnte die *CLV3*-Expression im *pnh*-Keimling derselben Generation wie der Embryonen untersucht werden. Zunächst wurden diese Pflanzen mit Basta auf Anwesenheit des *CLV3*-Reportergens selektioniert. 75% der Pflanzen erwiesen sich als Basta-resistent, so daß auch auch 75% der zuvor analysierten Embryonen tatsächlich Träger des *CLV3::GUS*-Reportergens waren. Die Keimlinge der 5 *pnh*-mutanten Linien, die sich zuvor als Basta-resistent erwiesen hatten, wurden erstmals im Alter von 8 Tagen auf *CLV3*-Expression hin untersucht. Zu diesem Zeitpunkt konnte *CLV3* in keiner *pnh*-Mutanten detektiert werden. Im Alter von 14 Tagen dann exprimierten lediglich die *pnh*-Pflanzen mit wildtypischen Phänotyp *CLV3*. Erst im Alter von 20 Tagen konnte auch in den starken *pnh*-Phänotypen *CLV3*-Expression detektiert werden (Tab. 17 und Abb.31 G, H). Diese Pflanzen bildeten zunächst zwischen den Kotyledonen ein einzelnes Blatt oder eine filamentartige Struktur. Einige Tage später wurden Adventivmeristeme in den Achseln der Kotyledonen gebildet, die *CLV3* meist im wildtypischen Muster exprimierten. Teilweise waren die Adventivmeristeme auch fasziiert und wiesen dann eine entsprechend verbreiterte *CLV3*-Expressionsdomäne auf. Insgesamt exprimierten 62% der 157 analysierten Pflanzen in diesem Entwicklungsstadium *CLV3*.

Es konnte somit gezeigt werden, daß *PNH*-Aktivität im reifen Embryo und im jungen Keimling für die Aktivierung der *CLV3*-Expression essentiell notwendig ist, auch wenn ein histologisch gesehen wildtypisches SAM gebildet wurde. Unabhängig von der *PNH*-Aktivität exprimierten Keimlinge im Alter von 14-20 Tagen, wenn Adventivmeristeme in den *pnh*-Mutanten initiiert wurden, *CLV3* im wildtypischen Muster.

Anzahl Embryonen und Pflanzen							
Alter	n gesamt	nicht gefärbt			gefärbt		
		WT SAM	pnh SAM	abnorm	WT SAM	pnh SAM	abnorm
Embryo	124	44%	32%	24%	0%	0%	0%
Keimling	157	14%	30%	-	27%	35%	-
	n gesamt	BastaS	BastaR				
Keimling	161	35%	75%				

Tab. 17: Anzahl *CLV3::GUS*-gefärbter *pnh*-Mutanten im Embryonalstadium und als Keimling im Alter von 20 Tagen. In 8 Tage alten Keimlingen konnte *CLV3*-Expression grundsätzlich nicht und in 14 Tage alten Keimlingen nur in den wildtypischen Phänotypen detektiert werden. Weiterhin dargestellt ist die Anzahl Basta-sensitiver und -resistenter Pflanzen in diesen Linien. n gesamt = absolute Anzahl analysierter Pflanzen, BastaS = Basta sensitiv, BastaR = Basta-resistent, WT SAM = wildtypisches SAM, pnh SAM = abgeflachtes SAM

3.7.3 *CLV3* ist in *mgo*-Mutanten im wildtypischen Muster exprimiert

Die Gene *MGO1* und *MGO2* kontrollieren das Zellschicksal in der peripheren Zone des SAM. In *mgo*-Mutanten kommt es dort zur Akkumulation von Zellen und damit zur Vergrößerung des Meristems, da weniger Organe gebildet werden (Abb.32 E). Auch in diesem Fall wurde das *CLV3*-Reportergen in den *mgo*-mutanten Hintergrund eingekreuzt und entsprechende Linien etabliert. Die *CLV3*-Expression war sowohl im SAM eines 9 Tage alten Keimlings (n = 15) als auch im Achselmeristem (Abb.32 D,F) mit der wildtypischen Expression vergleichbar. Gut sichtbar ist in Abb.32 D ein etwas hochgestrecktes SAM, das durch die vergrößerte periphere Zone verursacht wird.

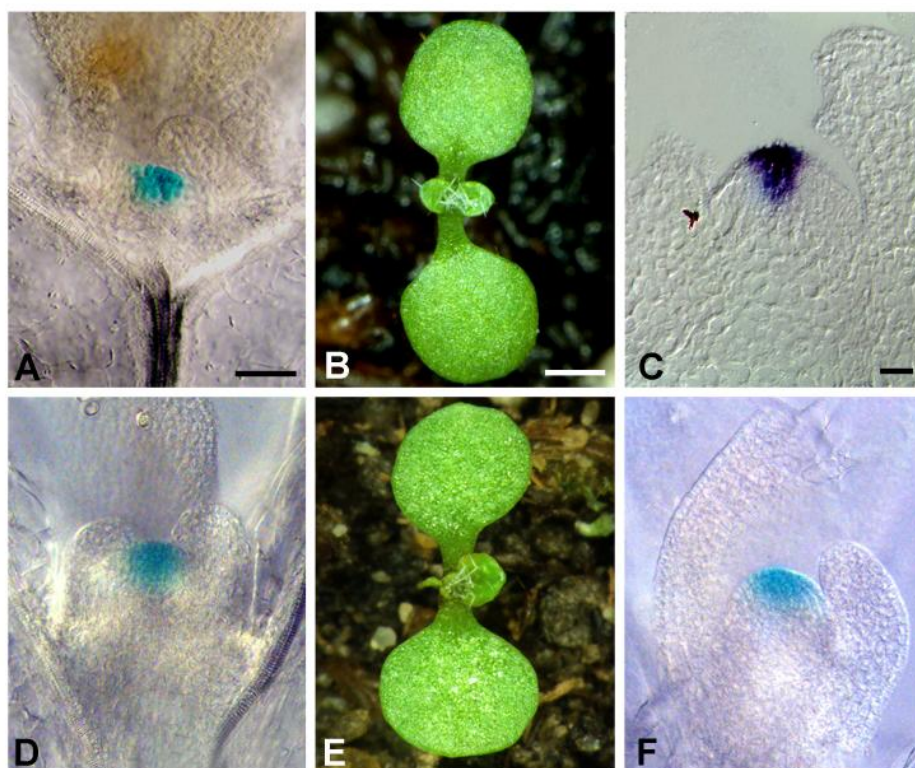


Abb.32: *CLV3* ist in *mgo1*- und in *mgo2*-Mutanten wildtypisch exprimiert. (A) *CLV3* ist im wildtypischen Keimling in der zentralen Zone des SAM exprimiert. (B) Wildtypischer Keimling im Alter von 9 Tagen. (C) *CLV3*-Expression im wildtypischen Achselmeristem in der RNA-in-*situ*-Hybridisierung. (D) *CLV3* ist im *mgo1*-mutanten Keimling (9 Tage alt) wildtypisch exprimiert. Die periphere Zone ist hier vergrößert und das SAM ist nach oben gestreckt. (E) *mgo1*-mutanter Keimling im Alter von 9 Tagen. Die Mutanten zeigen eine verzögerte Organbildung, hier sichtbar am fehlenden 2. Primärblatt. (F) *CLV3*-Expression im Achselmeristem einer *mgo2*-Mutanten. Maßstab: A,C,D,F = 20 µm; B,E = 1mm

3.7.4 *CLV3* ist in den Adventivmeristemen von *phb*-Mutanten wildtypisch exprimiert

Die *CLV3*-Expression wurde neben den Mutanten, deren Gene für die Etablierung und Funktion des Meristems verantwortlich sind, auch in *phb*-Mutanten analysiert. Bei diesen Mutanten kommt es zur Adaxialisierung lateraler Organe. *PHB* ist im Wildtypen sowohl in der zentralen Zone als auch im

adaxialen Bereich der lateralen Organe exprimiert und kodiert einen Transkriptionsfaktor (McConnell et al., 2001). Wie einleitend dargestellt, ist *phb* in der mutanten Situation ektopisch in der Pflanze exprimiert und aktiv. Dies legt nahe, daß das Gen auch im Zusammenhang mit *CLV3* relevant sein könnte. Um den Einfluß von *PHB* auf die Regulation von *CLV3* zu analysieren, wurde das *CLV3*-Reporter gen in den *phb*-mutanten Hintergrund eingekreuzt und in der F2 auf seine Expression hin untersucht.

Wie in Abb.33 dargestellt, war die *CLV3* Expression in den ektopischen Meristemen von *phb* Mutanten vergleichbar mit der im Wildtyp. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß *CLV3* von *PHB* nicht direkt reguliert wird.

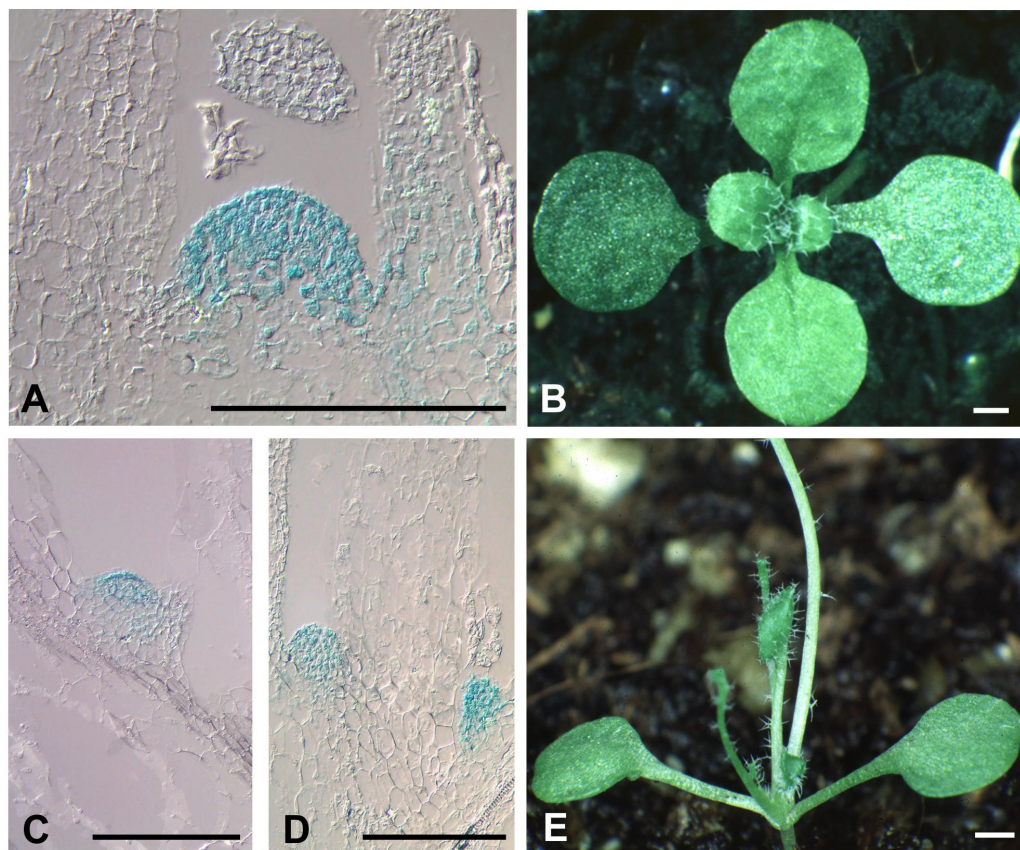


Abb.33: *CLV3* ist in *phb*-Mutanten wildtypisch exprimiert. (A) *CLV3*::GUS-Signal im wildtypischen SAM einer 20 Tage alten Pflanze. (B) *Columbia*-Pflanze im Alter von 20 Tagen. (C,D) Das *CLV3*-Reporter gen ist in den ektopischen Meristemen von *phb*-Mutanten wildtypisch exprimiert. (E) Typische *phb*-Mutante mit den adaxialisierten Blättern im Alter von 20 Tagen. Maßstab: A,C,D = 20 µm; B,E = 1mm

3.7.5 *CLV3* ist in *as1*-Mutanten wildtypisch exprimiert

Auch die Analyse des *CLV3*-Reporter gens in *as1*-Mutanten zeigte eine wildtypische Expression. Die Blätter von Pflanzen mit einer Mutation im *ASI*-Gen sind stark gelappt. Die Expression von *ASI* wird im wildtypischen Meristem von *STM* reprimiert und auf die Organprimordien begrenzt. In *as1*-Mutanten ist das meristemspezifische Gen *KNATI* ektopisch in Organen exprimiert (Byrne et al.,

2000). Daran anknüpfend sollte nun analysiert werden, ob das Fehlen der wildtypischen Organidentität in *as1*-Mutanten einen Einfluß auf die Regulation der *CLV3*-Expression hat.

Dazu wurde das *CLV3*-Reportergen in den *as1*-mutanten Hintergrund eingekreuzt. In der F2-Generation konnte weder im SAM noch in den Achselmeristemen der analysierten Pflanzen eine vom wildtypischen Muster abweichende *CLV3*-Expression detektiert werden (Abb.34). Die Primordien und Organe in den *as1*-Mutanten waren wie im Wildtypen frei von *CLV3*-Expression; das Fehlen der wildtypischen Organidentität scheint somit in *as1*-Mutanten keinen Einfluß auf die *CLV3*-Expression zu haben.

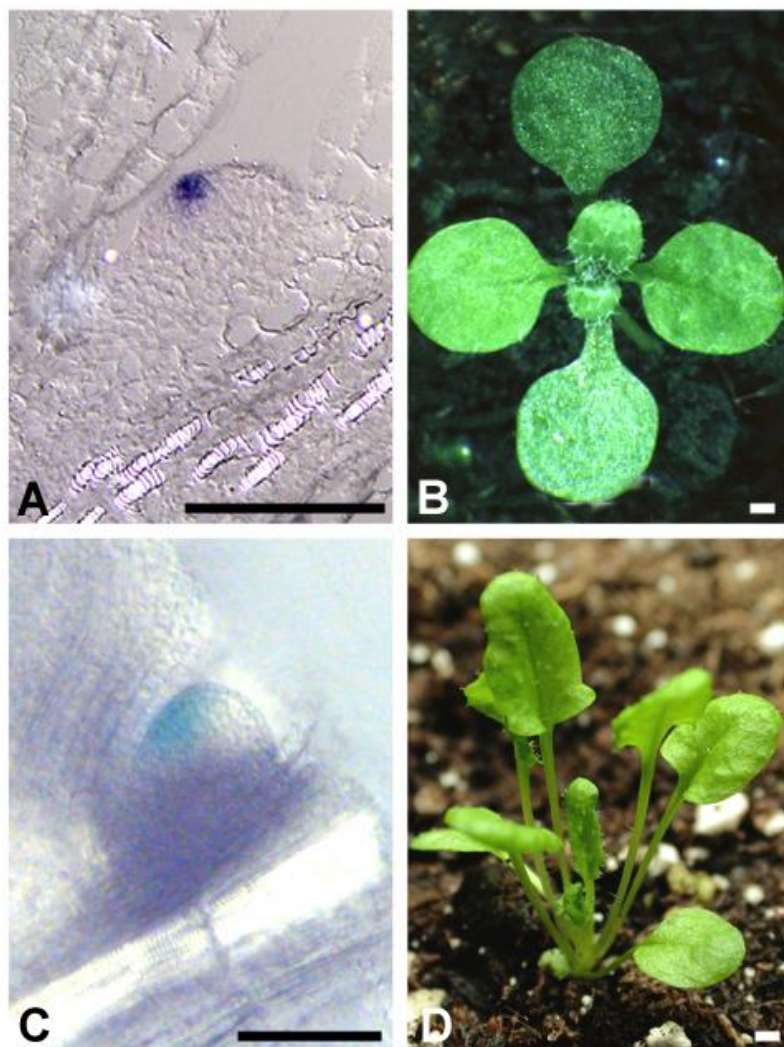


Abb.34: *CLV3* ist in *as1*-Mutanten wildtypisch exprimiert. (A) *CLV3::GUS* ist im wildtypischen Achselmeristem in der zentralen Zone exprimiert. Hier dargestellt ist eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit einer *GUS*-Sonde. (B) *Columbia*-Pflanze im Alter von 20 Tagen. (C) *CLV3::GUS* ist in *as1*-Mutanten wildtypisch exprimiert. Hier dargestellt ist ein Achselmeristem nach GUS-Färbung. (D) Typische *as1*-Mutante mit den deutlich gelappten Blättern im Alter von 20 Tagen. Maßstab: A,C = 20 µm; B,D = 1mm

3.8 Zusammenfassung Teil II: Die Kontrolle der *CLV3*-Expression im Meristem

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Expressionsstudien in amorphen und neomorphen Mutanten durchgeführt, um den Einfluß verschiedener meristemspezifischer Gene auf die Regulation der *CLV3*-Expression zu untersuchen. Es konnte ein *CLV3*-Reportergen etabliert werden, das die für das Expressionsmuster und die Expressionsstärke von *CLV3* verantwortlichen regulatorischen Sequenzen enthielt. Die Expressionsstudien zeigten, daß die *CLV3*-Expression während der Embryogenese abhängig von *WUS*-Aktivität ist. In späteren Entwicklungsstadien hingegen wird *CLV3* unabhängig von *WUS* aktiviert. *WUS* ist dann nur noch für die Regulation der Expressionsstärke des *CLV3*-Signals verantwortlich. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß *35S::WUS-GR* nicht ausreichend ist, um *CLV3* in der gesamten Pflanze zu aktivieren. Ein verstärktes *CLV3*-Signal konnte nur im meristematischen Kontext - besonders in den äußeren Zelllagen - nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, daß ein oder mehrere möglicherweise in der L1/L2 lokalisierte Faktoren zur *CLV3*-Aktivierung notwendig sind.

Weiterhin ergaben die Untersuchungen, daß *STM* weder in der Embryogenese noch in späteren Entwicklungsstadien zur Aktivierung der *CLV3*-Expression grundsätzlich notwendig ist, sondern diese nur verstärkt. Auch ist ektopisch exprimiertes *STM* nicht ausreichend, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren. Es konnte gezeigt werden, daß die Koexpression von *WUS* und *STM* gemeinsam zu einer schwachen *CLV3*-Expression in jungen Blättern führt.

Ein Einfluß der Gene *CUC1/CUC2*, *MGO1* und *MGO2*, *PHB* und *ASI* auf die Regulation von *CLV3* konnte nicht nachgewiesen werden. Das Gen *PNH* hingegen ist während der Embryogenese essentiell notwendig für eine Aktivierung von *CLV3*. In der späteren Entwicklung erfolgt die *CLV3*-Aktivierung in den Adventivmeristemen *PNH* unabhängig.

Teil III: Regulation von *CLV3* durch eigene regulatorische Sequenzen

3.9 Deletionsanalyse: Welche regulatorischen Elemente sind für die Expression von *CLV3* essentiell ?

Nachdem die regulatorischen Sequenzen von *CLV3* kloniert und das *CLV3*-Reportergen etabliert werden konnte, sollte mit Hilfe verschiedener Deletionsderivate analysiert werden, welche regulatorischen Elemente essentiell notwendig für Expressionstärke und Expressionsmuster von *CLV3* sind.

Hierzu wurden jeweils etwa 300 bp große Abschnitte aus den 5' und den 3' von *CLV3* gelegenen Regionen deletiert und mit dem *GUS*-Gen fusioniert. Die einzelnen Deletionskonstrukte mit den Bezeichnungen *Del1-Del7*, sowie *Del3x5* und *Del3x4* sind mit ihren jeweiligen Fragmentlängen in Kurzbezeichnung in Abb.35 A dargestellt. Die Deletionsfragmente aus dem 5' von *CLV3* gelegenen

Bereich sind mit 5- und aus dem 3' von *CLV3* gelegenen Bereich mit 3+ sowie der jeweiligen Anzahl an Basenpaaren angegeben (z.B. 5-1166/3+1256 für Deletionsderivat *Del1*).

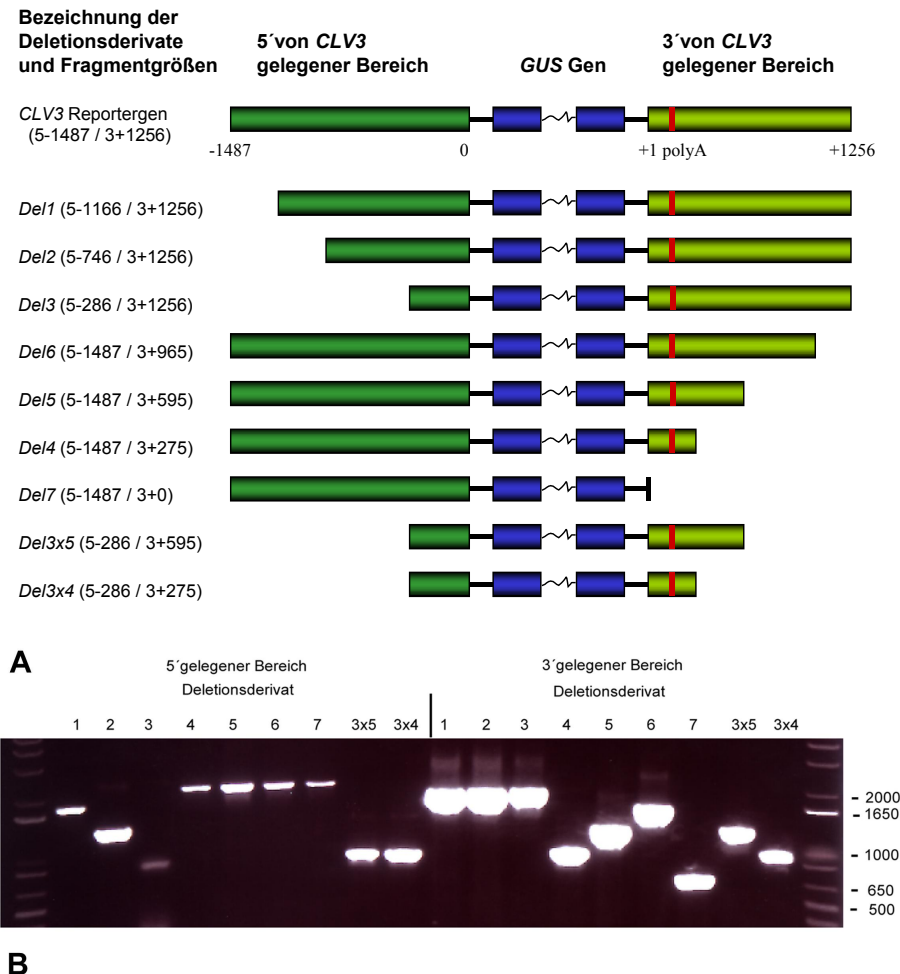


Abb.35: (A) Das *CLV3::GUS*-Reporter gen und die verschiedenen Deletionsderivate. Angegeben sind die Kurzbezeichnungen der Konstrukte und die Fragmentgrößen der 5' und der 3' von *CLV3* gelegenen Bereiche (B) Von den transgenen Pflanzen mit den Deletionsderivaten wurde genomische DNA präpariert und in der PCR amplifiziert. Es wurden jeweils der 5' und der 3' gelegene Bereich in *Del 1-Del7* sowie *Del3x5* und *Del3x4* amplifiziert und die korrekten Fragmentgrößen der Deletionsderivate damit bestätigt.

Die *GUS*-Expression im Embryo, Keimling (6-8 Tage alt) und in den Achselmeristemen von adulten Pflanze (21 Tage alt) wurde in einem weiteren Schritt analysiert. Für alle Deletionsderivate wurden RNA-in-situ-Hybridisierungen mit *GUS*-Sonden an Infloreszenzmeristemen durchgeführt. Um festzustellen, ob es entwicklungsbedingte Abweichungen im Expressionsmuster der Deletionsderivate gibt, wurde die Analyse zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten durchgeführt. Hinweise auf solche Abweichungen geben z.B. die unterschiedlichen *CLV3*-Expressionsprofile in *wus*-mutanten Embryonen und Keimlingen. Die Analyse der Deletionsderivate in Achselmeristemen wurde untersucht, weil *CLV3* grundsätzlich im wildtypischen SAM etwas schwächer exprimiert wird als in den Achselmeristemen. Auch in *wus*- und *stm*-Mutanten ist *CLV3* in den Adventivmeristemen stärker expri-

miert als im SAM. Die Embryonen wurden in der T3-Generation, die Keimlinge und adulten Pflanzen in der T2 analysiert.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung der zu analysierenden transgenen Pflanzen auf die Anwesenheit des entsprechenden Deletionsderivates. Dazu wurde genomische DNA von jeweils mindestens 10 Einzellinien präpariert und die deletierten 5' und 3' Sequenzen in der PCR mit zwei spezifischen Transgen-Primern amplifiziert. Das Ergebnis für je eine Linie ist in Abb.35 B exemplarisch dargestellt. Eine Southern-Hybridisierung konnte ebenfalls das Vorhandensein der Deletionsderivate in den entsprechenden Pflanzen bestätigen.

3.9.1 Ergebnisse der Deletionsanalysen der regulatorischen Sequenzen von CLV3

Die GUS-Expression der beschriebenen Deletionskonstrukte, die die regulatorischen Sequenzen von CLV3 umfassen, wurde in den verschiedenen Entwicklungsstadien im Wildtyp untersucht. Die Anzahl untersuchter Pflanzen und die prozentualen Ergebnisse der Färbungen sind in Tab. 18 zusammengefasst. In den Abb.36, Abb.37 und Abb.38 sind exemplarische GUS-Färbungen für alle Deletionsderivate und Entwicklungsstadien dargestellt. Zunächst sind die Ergebnisse der GUS-Färbungen der Deletionsderivate aus dem 5' von CLV3 gelegenen Bereich dargestellt.

Deletion	Embryo				Keimling				adulte Pflanze			
	L ⁿ	P ⁿ	SAM F ⁺	SAM F ⁻	L ⁿ	P ⁿ	SAM F ⁺	SAM F ⁻	L ⁿ	P ⁿ	AXM F ⁺	AXM F ⁻
Del 1	1	12	100%	0%	5	64	77%	23%			n.d.	ja
Del 2	8	156	93%	7%	40	303	78%	22%	15	85	100%	0%
Del 3	3	35	86%	14%	40	405	71%	29%			n.d.	ja
Del 6	4	51	73%	27%	37	365	72%	28%	15	74	95%	5%
Del 5	11	194	35%	65%	19	191	49%	51%			n.d.	ja
Del 4		n.d.			22	467	0%	100%			n.d.	
Del 7	3	40	0%	100%	40	460	0%	100%	10	46	63%	37%
Del 3x5		n.d.			30	786	1%	99%			n.d.	
Del 3x4		n.d.			20	585	0%	100%			n.d.	

Tab. 18: CLV3::GUS Deletionsderivate im Columbia-Embryo (T3), Keimling und im Achselmeristem der drei Wochen alten Pflanze (T2). Angegeben ist jeweils die Gesamtzahl der gefärbten Embryonen und Pflanzen sowie der prozentuale Anteil, bei denen ein GUS Signal detektiert bzw. nicht detektiert wurde. Für Del1, Del3 und Del5 in der adulten Pflanze ist hier nicht die Anzahl an Individuen angegeben, die auf GUS-Färbung im Achselmeristem hin untersucht wurden. Es wurde lediglich analysiert, ob die Achselmeristeme grundsätzlich färben. Lⁿ = Anzahl der gescreenten Linien, Pⁿ = Anzahl der gescreenten Einzelpflanzen aus Lⁿ Linien, SAM F⁺ = CLV3::GUS-Färbung im SAM, SAM F⁻ = keine CLV3::GUS-Färbung im SAM, AXM F⁺ = CLV3::GUS-Färbung im Achselmeristem, AXM F⁻ = keine CLV3::GUS-Färbung im Achselmeristem, n.d. = nicht detektiert.

GUS-Färbungen mit den Deletionsderivaten aus dem 5' von CLV3 gelegenen Bereich

Deletionsderivat *Del1* (5-1166 / 3+1256)

Deletionsderivat *Del1* exprimierte *GUS* im SAM sowohl im Embryo, Keimling, der adulten Pflanze als auch in den Achselmeristemen in einem mit dem kompletten *CLV3::GUS* Reporter gen vergleichbaren Muster (Abb.36 B, F, J, N). Von den insgesamt 64 analysierten T2-Keimlingen zeigten 77% dieses Ergebnis, während 23% kein *GUS* Signal lieferten. Dieses Ergebnis konnte aufgrund der 3:1 Segregation bezüglich des *GUS*- Transgens in der T2-Generation erwartet werden (Tab. 18).

Daraus resultiert, daß 1166 bp aus dem 5' gelegenen Bereich zusammen mit 1256 bp aus dem 3' gelegenen Bereich von *CLV3* ausreichend sind, um eine wildtypische Expression von *CLV3* zu ermöglichen. Das Fragment zwischen -1487 bp und -1166 bp enthält also keine entscheidenden regulatorischen Elemente.

Deletionsderivat *Del2* (5-746 / 3+1256)

Die *GUS*-Expression des Deletionsderivats *Del2* variierte sowohl im Embryo als auch im Keimling. Von insgesamt 156 gefärbten Embryonen zeigten 93% ein *GUS*-Signal. 66% davon wiesen eine im Vergleich mit dem *CLV3*-Reporter gen deutlich stärkere Expression in einer vergrößerten Domäne auf (Tab. 18, Abb.36 C), während die restlichen 34% ein schwächeres oder mit der wildtypischen Situation vergleichbares Signal lieferten. Einige davon zeigten *CLV3::GUS*-Färbung nur in der L1 oder aber zusätzlich in der L3, während die L2 ungefärbt erschien. Im Keimling fand sich eine ähnliche Situation. Von 303 gefärbten Pflanzen waren 78%, also 236 Keimlinge *CLV3::GUS*-positiv (Tab. 18). Auch hier zeigte sich eine variable Färbung. Von diesen 236 Keimlingen exprimierten 58% *CLV3::GUS* in einer ebenfalls vergrößerten Domäne (Abb.36 G), während 42% der Pflanzen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Signal lieferten. Diese Signale konnten in der RNA-*in-situ*-Hybridisierung im Infloreszenzmeristem bestätigt werden (Abb.38 K). Im frühen Achselmeristem hingegen war die *GUS*-Expression von *Del2* *CLV3*-typisch.

Die verstärkte *GUS*-Expression des Deletionsderivates *Del2* deutet darauf hin, daß sich im 5' gelegenen Bereich von *CLV3* zwischen -1166 und -746 bp ein Repressorelement befinden könnte, das deletiert wurde.

Deletionsderivat *Del3* (5-286 / 5+1256)

Das Deletionsderivat *Del3* lieferte nach der *GUS*-Färbung in 86% der embryonalen SAM ein *GUS*-Signal (Abb.38 D). Die Expression war hier im Vergleich zum *CLV3::GUS*-Reporter gen insgesamt schwächer und das SAM war lediglich hellblau angefärbt. Zudem war die Domäne deutlich verkleinert, wobei die Expression in der L1 etwas stärker als in der L2 und L3 erschien. Die Analyse von insgesamt 405 Keimlingen bestätigte dieses Ergebnis (Tab. 18). 71% exprimierten *GUS* im SAM in einer ebenfalls verkleinerten Domäne (Abb.36 H). Die 3:1 Segregation des Transgens in der T2 spiegelt sich hier wider. Das Ergebnis konnte durch eine *in-situ*-Hybridisierung im Infloreszenzmeristem mit der *GUS*-Sonde bestätigt werden (Abb.36 L). Die Expression im Achselmeristem erschien eher wildtypisch.

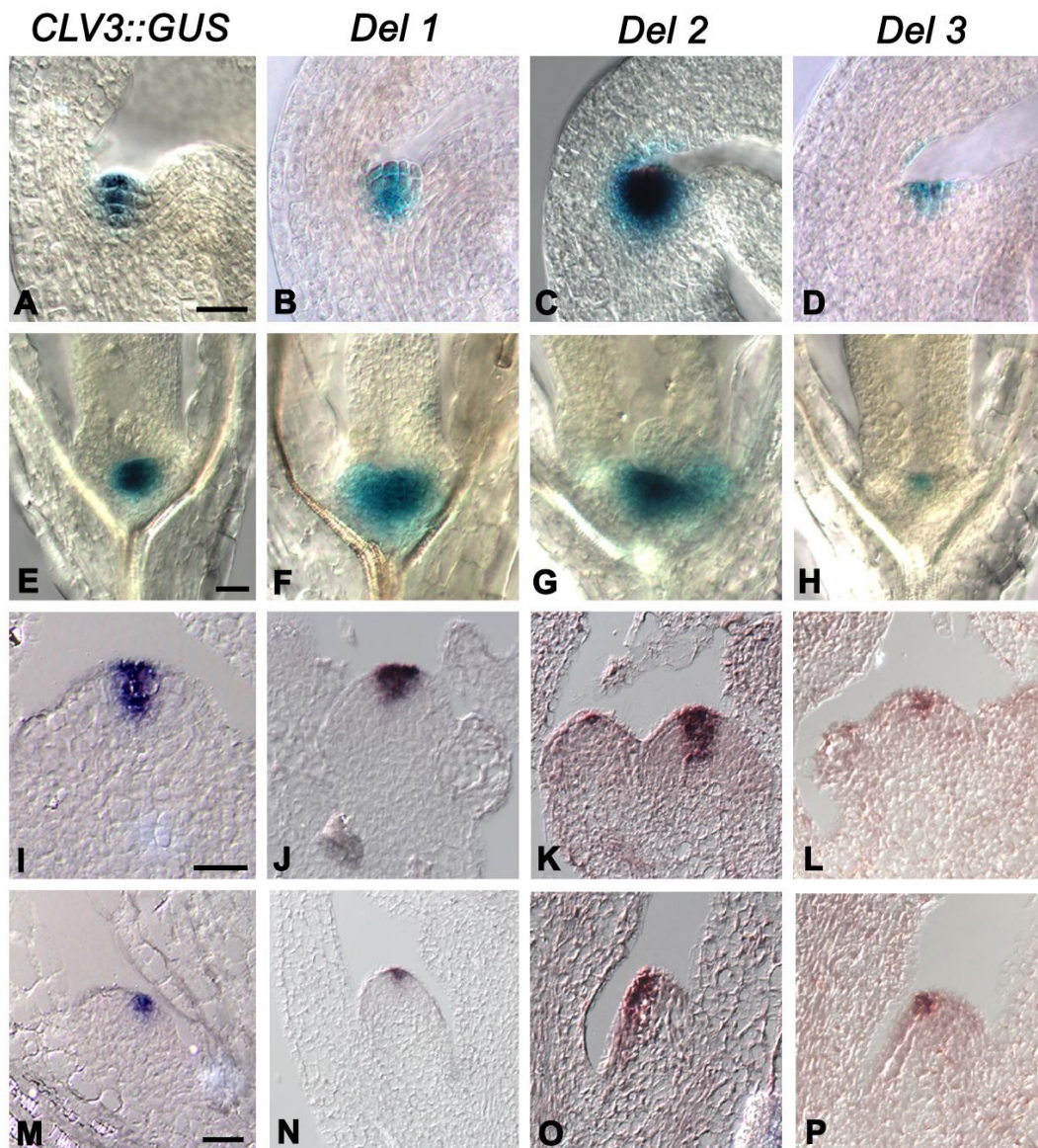


Abb.36: GUS-Färbungen der Deletionsderivate der 5' von *CLV3* gelegenen Sequenzen. Expression des kompletten *CLV3::GUS*-Reportergens im reifen Embryo (A), im 9 Tage alten Keimling (E) im Infloreszenzmeristem (I) und im Achselmeristem (M). Die Daten wurden mittels *GUS*-Färbung (im Embryo und im Keimling) und RNA-*in-situ*-Hybridisierung (Infloreszenzmeristem und Achselmeristem) erhoben. Die *GUS*-Expression war in *Del1*-Pflanzen nahezu unverändert im Vergleich zum *CLV3*-Reportergen (B, F, J, N). Für *Del2*-Pflanzen wurde ein verstärktes *GUS*-Signal detektiert (C, G, K, O). In *Del3*-Pflanzen war die Expressionsstärke des *GUS*-Signals vermindert, das Expressionsmuster aber nicht beeinträchtigt (D, H, L, P). Maßstab: 20 µm

Daraus resultiert, daß 286 bp des 5' in Kombination mit 1256 bp 3' von *CLV3* gelegenen Bereiches eine schwache Expression von *CLV3* im wildtypischen Muster in der zentralen Zone des Meristems ermöglichen. Die musterbildenden Elemente scheinen also im 5' Bereich bis -286 bp zu liegen. Das unterstützen auch die Färberegebnisse von Deletionsderivat *Del7*, die weiter unten detailliert beschrieben werden.

GUS-Färbungen mit den Deletionsderivaten aus dem 3' von CLV3 gelegenen Bereich

Deletionsderivat *Del6* (5-1487 / 3+965)

Das Deletionsderivat *Del6* zeigt in 73% von 51 analysierten transgenen Embryonen ein im Vergleich zum Reporter gen schwächeres *GUS*-Signal in einer etwas verkleinerten Domäne im SAM (Abb.37 B, Tab. 18). Bei der Analyse von insgesamt 365 Keimlingen war in 72% der Pflanzen ein *GUS*-Signal im gleichen Muster wie im Embryo detektierbar, während in 28% der Pflanzen die *GUS*-Expression fehlte. Auch hier zeigt sich die 3:1 Segregation des Transgens in der T2. Von den also insgesamt 264 *GUS*-positiven Keimlingen exprimierten 46% *GUS* im etwa wildtypischen Muster und 54% der Pflanzen deutlich schwächer als im Wildtyp. Die Expression im Achselmeristem war auch hier von der Deletion nicht wesentlich betroffen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß 1487 bp aus dem 5' gelegenen Bereiches in Kombination mit 965 bp aus dem 3' Bereich von *CLV3* ausreichend sind, um die *GUS*-Expression im *CLV3*-Muster zu kontrollieren. Die Stärke der Expression ist bei diesem Deletionsderivat allerdings vermindert, so daß von einer Deletion eines allgemein verstärkenden Elementes ausgegangen werden kann.

Deletionsderivat *Del5* (5-1487 / 3+595)

Für das Deletionsderivat *Del5* konnte in 35% der 194 präparierten Embryonen aus 11 Linien ein *GUS*-Signal lediglich in der L1 detektiert werden (Abb.37 C, Tab. 18), während 65% *GUS*-negativ waren. Von insgesamt 191 analysierten Keimlingen konnte in 49% der Pflanzen *GUS* Expression festgestellt werden, 51% der Pflanzen zeigten kein *GUS*-Signal (Abb.37 G, Tab. 18). Das *GUS*-Signal im SAM war deutlich schwächer als das des *CLV3*-Reportergens und die Expression war auch hier in der äußeren Zell-Lage besonders prägnant. Im Achselmeristem war die *GUS*-Expression vergleichbar mit der wildtypischen *CLV3*-Expression (Abb.37 P).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß das Deletionsderivat *Del5* nicht ausreicht, um das Expressionsprofil von *CLV3* im SAM zu kontrollieren. Da *Del5* nur in der L1 exprimiert ist, könnte sich im 5' gelegenen Bereich von *CLV3* bis 595 bp eine L1 spezifische Box befinden.

Deletionsderivat *Del4* (5-1487 / 3+275)

Die *GUS*-Expression von Deletionsderivat *Del4* wurde in insgesamt 467 Keimlingen analysiert. In keinem Keimling ließ sich ein *GUS*-Signal im Meristem detektieren (Abb.37 H, Tab. 18). In einigen der Pflanzen war lediglich eine leichte diffuse Färbung in den Leitbündeln sichtbar. Die Expression im Embryo und in Achselmeristemen wurde nicht untersucht. Das legt die Schlußfolgerung nahe, daß 275 bp 3' von *CLV3* in Kombination mit 1487 bp im 5' gelegenen Bereich die Expression von *GUS* und damit auch von *CLV3* nicht adäquat kontrollieren können.

Deletionsderivat *Del7* (5-1487 / 3+0)

Auch für Deletionsderivat *Del7* konnte weder im embryonalen SAM noch im SAM der insgesamt 460 analysierten Keimlinge und im Infloreszenzmeristem eine *GUS*-Expression festgestellt werden (Abb.37 D, I, M, Tab. 18). Anders war die Situation im Achselmeristem. Es wurden 46 Pflanzen (Alter 2,5 Wochen) auf ihre Färbung im Achselmeristem hin analysiert und in 63% wurde eine sehr schwache Färbung im *CLV3*-Muster beobachtet. Das unterstützt die Hypothese, daß die musterbildenden Elemente in der 5' Region lokalisiert sind. Das Ergebnis konnte in der RNA-in-situ-

Hybridisierung bestätigt werden (Abb.37 Q). Zusätzlich wurden transgene Pflanzen mit dieser Deletion noch einer GUS-Färbung unterzogen, bei der im Gegensatz zur standardmäßig verwendeten *x-Gluc*-Färbelösung lediglich 0,5mM statt 5mM $K_3Fe(CN)_6$ und $K_4Fe(CN)_6$ verwendet wurden. Beide Substanzen sorgen für ein zellulär lokalisiertes *GUS*-Signal, hemmen aber gleichzeitig die Färbereaktion. Um auszuschließen, daß deshalb ein sehr schwaches Signal im SAM nicht sichtbar wird, wurde deren Konzentration reduziert. Zusätzlich wurde die Färbung von *Del7* im *clv1-4*-Mutanten untersucht, um eine evtl. vorhandene Färbung im vergrößerten SAM dieser Mutanten besser detektieren zu können. Aber auch auf diese Weise war in beiden Fällen kein *GUS*-Signal im SAM zu detektieren. Es kann anhand dieser Ergebnisse vermutet werden, daß die Sequenz im 3' Bereich von *CLV3* als transkriptionaler Enhancer fungiert und für die *CLV3*-Expression essentiell ist.

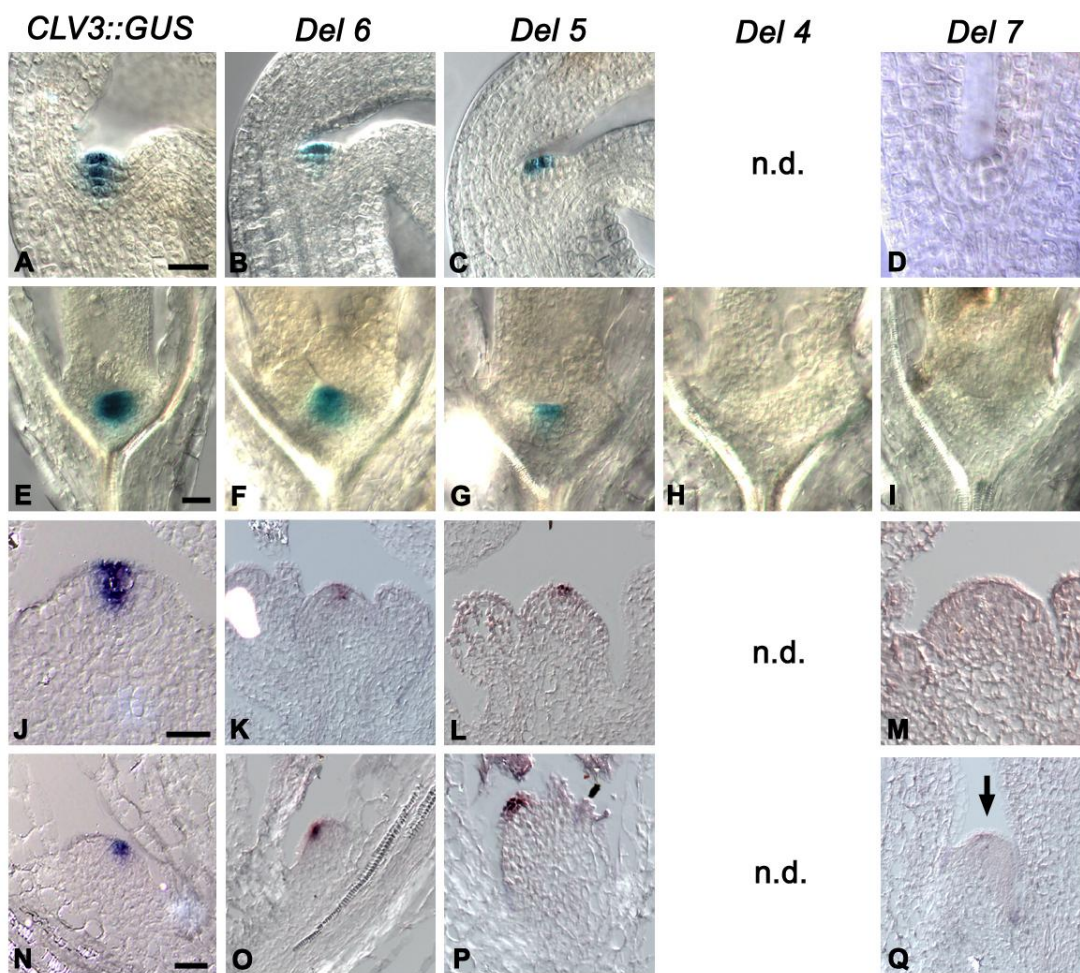


Abb.37: GUS-Färbungen der Deletionsderivate der 3' von *CLV3* gelegenen Sequenzen. Expression des kompletten *CLV3*-Reportergens im reifen Embryo (A), im 9 Tage alten Keimling (E) im Infloreszenzmeristem (J) und im Achselmeristem (N). Die Daten wurden mittels GUS-Färbung (im Embryo und im Keimling) und RNA-in-situ-Hybridisierung (im Infloreszenzmeristem und Achselmeristem) erhoben. In *Del6* Pflanzen war die Expressionsstärke des *GUS*-Signals vermindert, das Expressionsmuster aber nicht beeinträchtigt (B, F, K, O). Das *GUS*-Signal in *Del5*-Pflanzen beschränkte sich auf die Expression in der L1. Nur im Achselmeristem exprimierte auch die L2 deutlich *GUS* (C, G, L, P). Für *Del4*-Pflanzen konnte keine *GUS*-Expression im Keimling detektiert werden (H). Die anderen Stadien wurden in diesem Falle nicht untersucht. In *Del7*-Pflanzen fehlte das *GUS*-Signal komplett im SAM (D, I, M). Lediglich im Achselmeristem konnte eine schwache *GUS*-Expression in der zentralen Zone detektiert werden (Q). n.d. = nicht detektiert, Maßstab: 20 µm

Deletionsderivat *Del3x5* (5-286 / 3+595)

In einem letzten Klonierungsschritt wurden nun Deletionensfragmente miteinander kombiniert. Es wurden 786 Keimlinge mit Deletionsderivat *Del3x5* untersucht und in lediglich 1% konnte ein *GUS* Signal im Meristem detektiert werden (Abb.38 B), obwohl die Deletionskonstrukte *Del3* und *Del5* ein *GUS*-Signal im SAM lieferten. Da aber auch *Del3* und *Del5* nur eine schwache Expression zeigten, führt möglicherweise die Kombination aus beiden Fragmente ohne verstärkende Elemente aus der jeweils anderen Region nicht zur *GUS*-Färbung.

Deletionsderivat *Del3x4* (5-286 / 3+275)

Auch das letzte Deletionsderivat *Del3x4* führte bei keinem der insgesamt 585 analysierten Keimlinge zu einer *GUS*-Expression im SAM (Abb.38 C). In diesem Fall war das Ergebnis erwartungsgemäß, da auch schon Deletionsderivat *Del4* *GUS*-negativ im SAM war.

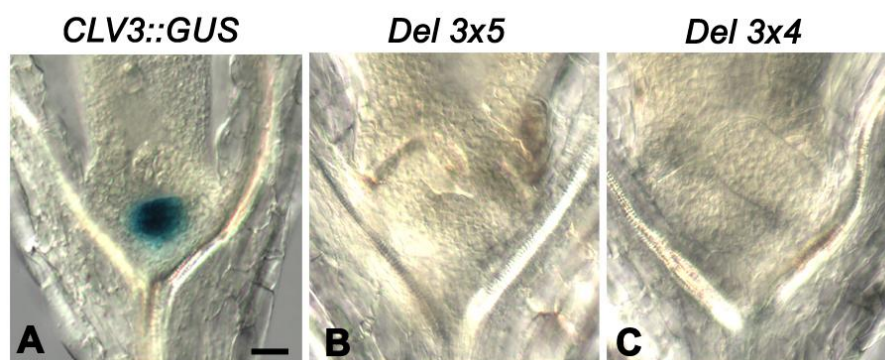


Abb.38: Die *GUS*-Expression fehlt im SAM bei einer Kombination der kürzesten Deletionsfragmente. (A) Expression des kompletten *CLV3::GUS*-Reportergens im wildtypischen SAM eines Keimlings (9 Tage alt). In *Del3x5*- (B) und *Del3x4*- (C) Keimlingen konnte keine *GUS*-Expression im SAM detektiert werden. Maßstab: 20 μ m

3.9.2 Aktivierbarkeit der *CLV3*-Deletionsderivate durch *WUS* und *STM*

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich im *WUS-GR* und *STM-GR* Hintergrund ein nur schwach im Wildtypen färbendes Deletionskonstrukt stark aktivieren läßt. Die Ergebnisse wurden sowohl mit den unterschiedlichen *GUS*-Färbungen der Deletionsderivate im wildtypischen Hintergrund verglichen als auch mit den *GUS*-Färbungen des *CLV3*-Reportergens in *WUS-GR* und *STM-GR*. In *WUS-GR*-transgenen Pflanzen ist das *CLV3*-Reporter gen nicht in der gesamten Pflanze aktiviert, sondern nur im meristematischen Kontext und dort besonders in den äußeren Zell-Lagen. In *STM-GR*-transgenen Pflanzen ist ein *CLV3::GUS*-Signal im SAM, den ektopischen Meristemen, den Stipulen und teilweise in den Leitbündeln und Blättern detektierbar.

Während in *WUS-GR* die Deletionsderivate *Del1*, *Del2*, *Del5*, *Del6* und *Del7* untersucht wurden, beschränkte sich die Analyse im *STM-GR*-Hintergrund auf die Deletionen *Del2*, *Del6* und *Del7*. Die entsprechenden Pflanzen wurden miteinander gekreuzt, in der F1 über Basta-Selektion und Dexamethason-Induzierbarkeit auf Vorhandensein der beiden Transgene überprüft und dann geselbstet.

Die GUS-Färbungen wurden mit verschiedenen unabhängigen Linien in der F2 durchgeführt (Tab. 19).

Deletion	WUS-GR					STM-GR				
	L ⁿ	P ⁿ	F ⁺	F ⁻	Bemerkung	L ⁿ	P ⁿ	F ⁺	F ⁻	Bemerkung
<i>Del1</i>	1	10	100%	0%	F stark					n.d.
<i>Del2</i>	3	28	100%	0%	F stark	2	40	100%	0%	F stark
<i>Del3</i>					n.d.					n.d.
<i>Del6</i>	7	67	88%	12%	F stark	8	113	88%	12%	F schwach
<i>Del5</i>	1	18	100%	0%	F mittel					n.d.
<i>Del4</i>					n.d.					n.d.
<i>Del7</i>	7	63	87%	13%	F schwach	10	172	84%	16%	F schwach

Tab. 19: Anzahl GUS-gefärbter Pflanzen der Deletionsderivate des *CLV3*-Reportergens im *WUS-GR*- und *STM-GR*-Hintergrund. Lⁿ = Anzahl der analysierten Linien, Pⁿ = Anzahl der analysierten Einzelpflanzen aus Lⁿ Linien, F⁺ = GUS-Färbung detektierbar, F⁻ = keine GUS-Färbung detektierbar; F stark = GUS-Färbung so stark wie das *CLV3* Reportergen; F mittel = GUS-Färbung etwas schwächer als das *CLV3* Reportergen; F schwach = GUS-Färbung sehr schwach, n.d. = nicht detektiert.

Die Färbung von Deletionsderivat *Del 1* wurde in 10 Pflanzen einer Linie im *WUS-GR*-Hintergrund analysiert. Es konnte festgestellt werden, daß das Konstrukt im Vergleich zum *CLV3*-Reportergen und *Del1* im Wildtypen die gleiche Färbung zeigte.

Für *Del 2* wurde die GUS-Färbung sowohl in *WUS-GR* (28 Pflanzen von 3 Linien) als auch in *STM-GR* (40 Pflanzen von 2 Linien) analysiert. Für beide genetische Hintergründe wurde wie für *Del2* im Wildtypen eine starke Färbung detektiert. *Del2* war also - trotz eines möglicherweise deletierten Repressor-Elementes - weder durch ektopisches *WUS* noch durch *STM* stärker aktivierbar als im wildtypischen Hintergrund.

Deletionsderivat *Del6* wurde sowohl in *WUS-GR* als auch in *STM-GR* Pflanzen untersucht. Von insgesamt 67 *WUS-GR* Pflanzen aus 7 unabhängigen Linien ließ sich in 88% der Pflanzen ein GUS-Signal detektieren, das vergleichbar mit dem Signal des *CLV3*-Reportergens war. Damit zeigte *Del6* in *WUS-GR* ein deutlich stärkeres GUS-Signal als in Wildtypen. Von den 113 *STM-GR*-Pflanzen, die aus 8 verschiedenen Linien stammten, zeigten 88% nur ein schwaches GUS-Signal. Für Deletionsderivat *Del6* wurde demnach bei ektopischer Expression von *WUS* ein deutlich stärkeres GUS-Signal als in *STM-GR* Pflanzen und im Wildtypen detektiert. Die Expression von *Del6* war vergleichbar mit der Expression des *CLV3*-Reportergens in *WUS-GR*. Dieses Ergebnis konnte in drei unabhängigen Farbe-Reaktionen reproduziert werden. Möglicherweise läßt sich das Konstrukt *Del6* somit von *WUS* aktivieren. Um allerdings gesichert beurteilen zu können, ob es sich hier um eine Aktivierung durch *WUS* handelt, müssten von den gefärbten Pflanzen noch Schnitte angefertigt werden. Andererseits könnte die starke GUS-Färbung auch nur ein indirektes Resultat der vergrößerten Meristeme in *WUS-GR*-Pflanzen sein.

Von Deletionsderivat *Del5* wurden insgesamt 18 Pflanzen einer Linie in *WUS-GR* gefärbt. Auch *Del5* lieferte in *WUS-GR* eine stärkere GUS-Färbung als im Wildtypen. Sie war aber etwas schwächer als die Färbung des *CLV3*-Reportergens in *WUS-GR*.

Außerdem wurde die *GUS*-Färbung von *Del 7*, der Deletion ohne den 3' von *CLV3* gelegenen Bereich, in *WUS-GR* und in *STM-GR* analysiert. In *WUS-GR* wurden insgesamt 63 Pflanzen untersucht, mit dem Ergebnis, daß 87% ein sehr schwaches *GUS*-Signal in den Achselmeristemen zeigten. Ein Signal im SAM konnte bei diesen Pflanzen nicht detektiert werden. Im *STM-GR* Hintergrund ergab sich das gleiche Ergebnis. 84% der 172 Pflanzen zeigten nur in den ektopischen Meristemen ein kaum sichtbares *GUS*-Signal. In Stipulen und Leitbündel, bzw. Blätter war kein Signal detektierbar. Deletionsderivat *Del7* verhielt sich in *WUS-GR* und *STM-GR* somit wie im Wildtypen und war durch *WUS* und *STM* nicht aktivierbar.

3.10 Zusammenfassung Teil III: Wesentliche regulatorische Elemente zur Kontrolle der Expression von *CLV3*

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die regulatorischen Sequenzen von *CLV3* mit Hilfe von Deletionsderivaten näher analysiert. Dazu wurden sowohl Fragmente aus dem 5'- als auch aus dem 3'-gelegenen Bereich des *CLV3*-Reportergens deletiert. Die Ergebnisse der *GUS*-Färbungen der einzelnen Deletionsderivate sind in Abb.39 schematisch dargestellt.

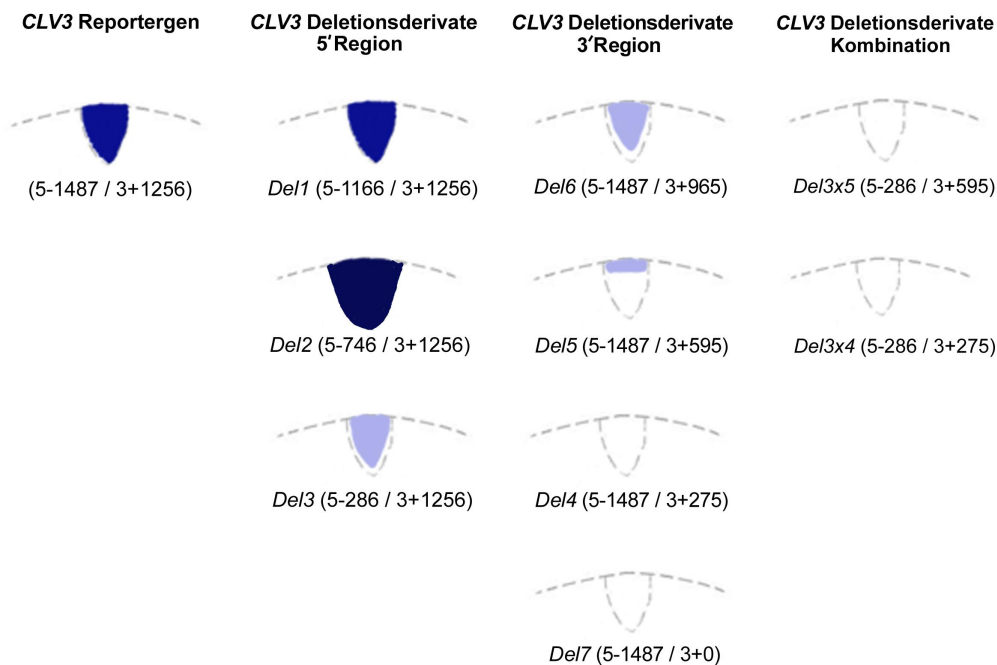


Abb.39: Schematische Darstellung der GUS-Färbungen mit den einzelnen Deletionsderivaten. Dargestellt sind die *GUS*-Signale in der zentralen Zone des SAM im Vergleich zum *CLV3*-Reportergen. Neben der Kurzbezeichnungen der Deletionsderivate sind auch die Fragmentlängen des 5' und 3' von *CLV3* gelegenen Bereiches angegeben. starkes Signal = dunkelblau; WT-Signal = blau; schwaches Signal = hellblau

Es konnte gezeigt werden, daß Deletionsderivat *Del1* für die wildtypische Kontrolle von Expressionsstärke und Expressionsmuster von *CLV3* ausreichend ist. Die im Vergleich zum *CLV3*-

Reporterger verstärkten GUS-Färbungen von Deletionsderivat *Del2* deuten hingegen darauf hin, daß sich im 5' Bereich von *CLV3* ein Repressorelement befindet. Die Musterbildung von *CLV3* wird vermutlich durch ein oder mehrere Elemente bestimmt, die zwischen dem Translationsstart und -286 bp in 5'-Richtung zu finden sind. Deletionsderivat *Del3* lieferte eine schwache GUS-Färbung im normalen *CLV3*-Muster.

Deletionsderivat *Del6* führte zu einer schwachen GUS-Färbung im wildtypischen *CLV3*-Muster, die auf ein verstärkendes Element im 3' Bereich zwischen 965 und 1256 bp hindeutet. In Deletionsderivat *Del5* hingegen beschränkte sich das GUS-Signal auf die L1 des SAM. Dieses Ergebnis weist auf ein in diesem Konstrukt noch verbliebenes L1-spezifisches Element hin. Für die Deletionsderivate *Del4* und *Del7* wurde kein GUS-Signal im SAM detektiert. Der 3' von *CLV3* gelegenen Bereich hat also entscheidende regulatorische Funktionen.

Insgesamt waren die Deletionsderivate im Achselmeristem eher stärker exprimiert als im SAM. Auch für *Del7* war im Achselmeristem im Gegensatz zum SAM ein schwaches Signal nachweisbar. Dies lässt vermuten, daß die *CLV3*-Expression in Sproß- und Achselmeristemen unterschiedlich kontrolliert wird.

4 Diskussion

Teil I: Die Funktion von *CLV3* im SAM

4.1 *CLV3* wirkt nicht-zellautonom als Signalmolekül im Meristem

Um zu klären, ob *CLV3* als sekretiertes Signalprotein im Meristem wirkt, wurden in einem klassisch genetischen Ansatz periklinale Chimären analysiert. Dazu wurden *clv3-7*-Mutanten mit einem instabil inserierten *En-1*-Transposon verwendet. Dieses Transposon wird mit einer zufallsbedingten Häufigkeit spontan remobilisiert und die wildtypische Expression von *CLV3* in den entsprechenden Zellen damit wiederhergestellt. Anhand der Segregation in der nächsten Generation wurden periklinale Chimären identifiziert, die *CLV3* ausschließlich in der L1, L2 oder der L3 exprimierten, so daß Zellteilung und Zelldifferenzierung im gesamten Meristem wildtypisch kontrolliert waren. Eine *CLV3*-Expression ausschließlich in der L1, deren Erwartungswert 50% der Fälle beträgt, erfüllt diese Funktion also folglich auch. Dieses Ergebnis kann als indirekter Hinweis auf die nicht-zellautonome Wirkung des *CLV3*-Proteins gewertet werden.

Die Immunlokalisierung des *CLV3*-Proteins mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern lieferte hingegen kein eindeutiges Ergebnis. Es konnte lediglich ein Unterschied zwischen der Hintergrundfärbung des Präimmunsersums und der Reaktion mit den aufgereinigten *CLV3*-GST Antikörpern festgestellt werden. Möglicherweise waren sowohl die Antikörper gegen das Peptid als auch gegen das *CLV3*-GST Fusionsprotein unspezifisch, oder aber die Immunlokalisierung hätte methodisch, z.B. bezüglich der Gewebeeinbettung, noch weiter optimiert werden müssen. Eine weitere Erklärung für das unklare Ergebnis der Immunlokalisierung könnte aber auch sein, daß mit den Peptid-Antisera gegen die konservierten C-terminalen Sequenzen auch weitere Mitglieder der sogenannten *CLE*-Familie (*CLAVATA3/ESR* related genes) detektiert wurden.

Nachdem das *Arabidopsis* Genom komplett sequenziert wurde, konnte *CLV3* als Mitglied dieser *CLE*-Familie identifiziert werden (Cock und McCormick, 2001). Es gibt mehr als 20 *CLE*-Proteine in *Arabidopsis*, Mais, Reis, Tomate und anderen Pflanzen. Diesen kleinen Proteinen ist sowohl eine konservierte Region in der Nähe des C-Terminus als auch eine putativ sekretorische Signalsequenz am N-Terminus gemeinsam.

Ein weiterer experimenteller Ansatz war die translationale Fusion von *CLV3* mit GFP, um zu klären, ob *CLV3* nicht-zellautonom wirkt. Im Plasmid pNB3 wurde die komplette cDNA mit GFP fusioniert, im Plasmid pNB3a das Signalpeptid von *CLV3* entfernt und die verbleibende cDNA mit GFP fusioniert. Das GFP-Signal beider Fusionsproteine wurde erst in Zwiebelzellen, dann in BY2 Protoplasten miteinander verglichen. In beiden Versuchsansätzen ließ sich aber kein Unterschied zwischen vorhandener und nicht vorhandener Signalsequenz feststellen. Offensichtlich waren die gewählten Systeme für diese Experimente nicht geeignet.

Inzwischen konnten Rojo et al. (2002) zeigen, daß *CLV3*-GFP mit Signalsequenz sekretiert wird. *CLV3*-GFP ohne Signalsequenz konnte sowohl in transformierten Lauchzellen als auch in den Wurzeln transgener *Arabidopsis*-Pflanzen im kompletten Cytoplasma detektiert werden. Bei Fusion der

kompletten cDNA von *CLV3* mit GFP hingegen läßt sich das GFP Signal nur im Apoplasten nachweisen. Die Experimente zeigten, daß die N-terminale Signalsequenz von *CLV3* tatsächlich eine sekretorische Funktion hat und bestätigten die Ergebnisse, der Analyse der periklinalen Chimären. *CLV3* wirkt als nicht-zellautonomes Signalmolekül im Meristem.

4.2 *CLV3* reguliert das Stammzellschicksal durch die Repression von *WUS*

Die Expression von *CLV3* in der zentralen Zone des Meristems führt zu der Frage, welchen Einfluß eine Erhöhung des *CLV3*-Signals auf die Kontrolle der meristematischen Funktion hat. Um diese Frage zu klären, wurde *CLV3* unter Kontrolle des *CaMV35S*- und des *HistonH4*-Promotors in *Arabidopsis* exprimiert. Diese Promotoren bewirken eine konstitutive Expression von *CLV3* in der gesamten Pflanze (*35SCaMV*) bzw. in allen teilungsaktiven Zellen (*HisH4*).

Die Sproß- und Blütenmeristeme in beiden Genotypen verloren verfrüht ihre Aktivität und neue Organe wurden nicht kontinuierlich gebildet. Die transgenen Pflanzen bildeten im Verlauf ihrer Entwicklung häufig Adventivmeristeme, die nach Bildung einiger Blätter oder auch defekter Blüten ihre Funktion immer wieder einstellten. Die beschriebenen Phänotypen traten auch im *clv3-8*-mutanten Hintergrund auf. Die *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgenen Pflanzen komplementierten den mutanten Phänotyp also nicht nur, sondern lieferten darüber hinaus auch den Phänotyp einer ektopischen Expression von *CLV3*. Die transgenen Pflanzen insgesamt lieferten eine Spannweite an starken bis schwachen Phänotypen. Es konnte gezeigt werden, daß die Stärke des Phänotyps mit der Menge des *CLV3*-Transgens korreliert (Kap.3.2.5).

Die aufgetretenen Phänotypen legen nahe, daß eine starke Aktivierung des *CLV*-Signaltransduktionsweges durch ein starkes *CLV3*-Signal Stammzellschicksal reprimiert. Dies könnte durch Repression von Genen erfolgen, die Stammzellschicksal fördern. Die beschriebenen *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgenen Pflanzen kopieren den *wus*-mutanten Phänotyp sehr deutlich. Diese starke phänotypische Ähnlichkeit kann als erster Hinweis darauf gewertet werden, daß *WUS* eines der Zielgene von *CLV* ist und durch die *CLV*-Gene reprimiert wird.

WUS wurde - wie einleitend bereits erläutert - aufgrund genetischer Analysen schon früher als Zielgen des *CLV*-Signaltransduktionsweges vorgeschlagen (Laux et al., 1996), da *wus*-Mutanten epistatisch zu *clv*-Mutanten sind. Zudem konnte in terminierten Meristemen von *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-Pflanzen mit starkem Phänotyp keine *WUS*-RNA nachgewiesen werden. Im gleichen Experiment wurden dieselben terminierten Meristeme auch mit einer *CLV3*-Sonde hybridisiert, wobei ein sehr starkes *CLV3*-RNA-Signal detektiert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die *WUS*-Expressionsdomäne in Pflanzen mit einer Mutation in einem der drei *CLV*-Gene im Gegensatz dazu deutlich vergrößert ist. Ist der *CLV*-Signaltransduktionsweg außer Kraft gesetzt, geht damit auch die Repression von *WUS* verloren und die Expressionsdomäne ist im Vergleich zum Wildtyp vergrößert. Eine hohe Dosis an *CLV3* bei konstitutiver Expression bewirkt also eine starke Repression von *WUS* und die transgenen Pflanzen weisen den gleichen Phänotyp wie *wus*-Mutanten auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Dosis an *CLV3* entscheidend für die Anzahl an Stammzellen ist.

In *35S::CLV3/wus-1*-Pflanzen konnte kein neuer Phänotyp festgestellt werden. Das bestätigt, daß die Repression von *WUS* tatsächlich für die beschriebenen Phänotypen von *35S::CLV3*-Pflanzen verantwortlich ist und bestätigt *WUS* als Zielgen des *CLV*-Signaltransduktionsweges.

Wie in Kap.3.5.1 gezeigt werden konnte, ist *CLV3* aber schwach in *wus*-Mutanten exprimiert. Das legt nahe, daß weitere Faktoren in die Förderung des Stammzellschicksals und in die Aktivierung von *CLV3* involviert sind.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das *CLV3*-Signal nur in Gegenwart eines funktionellen *CLV1/2* Rezeptorkomplexes wirken kann. Bei Expression von *35S::CLV3* und *HisH4::CLV3* in *clv1-4-* und *clv2-1*-Mutanten zeigten die transgenen Pflanzen trotz hoher *CLV3*-Dosis einen *clv*-mutanten Phänotyp. Die beschriebenen *35S::CLV3* und *HisH4::CLV3* Phänotypen sind folglich das Resultat eines verstärkten, über den *CLV1/2* Rezeptor wirkenden *CLV3*-Signals.

Der *CLV*-Rezeptorkomplex – ein aktuelles Modell

Anknüpfend an die Ausführungen in Kap.1.3.1.1, die den Kenntnisstand zu Beginn der vorliegenden Arbeit darstellten, sollen im folgenden die seitdem erzielten Erkenntnisse kurz zusammengefasst werden.

In der Zwischenzeit wurden die drei *CLV*-Gene kloniert und biochemische Arbeiten verschiedener Autoren haben gezeigt, wie die *CLV*-Proteine im Meristem interagieren, um das Stammzellschicksal im Meristem zu kontrollieren (Abb. 40).

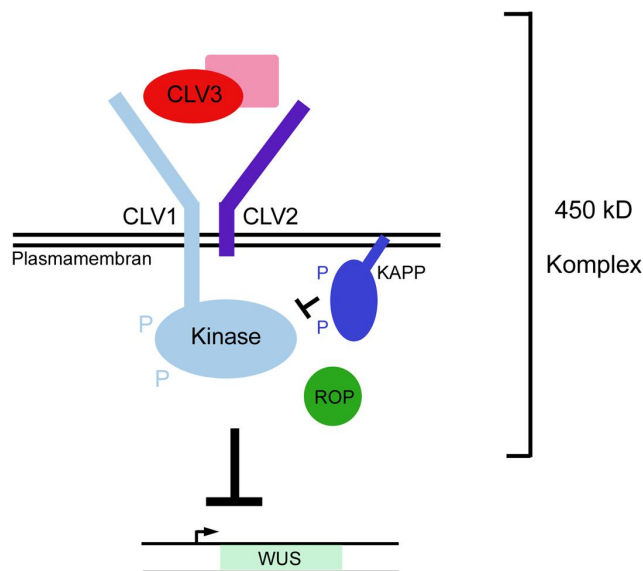


Abb. 40: Der *CLV*-Signalkomplex. Die Leucin-reiche Rezeptorkinase *CLV1* bildet ein membranständiges Heterodimer mit *CLV2*. Die Bindung des *CLV3*-Multimers bewirkt die Anlagerung einer Phosphatase (*KAPP*) und einer GTPase (*ROP*) - die weiteren Bestandteile des Multimers sind bislang nicht charakterisiert. Der aktivierte *CLV* Komplex bewirkt eine Repression der Expression von *WUS*.

Das *CLV1*-Protein ist eine Rezeptorkinase, die aus einer extrazellulären Domäne mit sich wiederholenden Leu-reichen Motiven als putativen Rezeptor sowie einer cytoplasmatischen Serin-Kinase-Domäne besteht. Beide sind durch eine Transmembran-Domäne miteinander verbunden (Clark et al., 1997). *CLV2* ist strukturell ähnlich, nur die cytoplasmatische Domäne ist kleiner als bei *CLV1* und beinhaltet keine Kinase (Jeong et al., 1999).

CLV1 und *CLV3* werden in distinkten Domänen des SAM exprimiert. *CLV1*-mRNA ist in einer zentralen Region in der tiefen L3 nachzuweisen (Clark et al., 1997), während *CLV3* in der zentralen Zone in der L1-L3 detektiert wird (Fletcher et al., 1999). *CLV2* hingegen ist ubiquitär exprimiert und könnte weitere Funktionen in anderen Signaltransduktionswegen haben (Kayes und Clark, 1998; Jeong et al., 1999).

In *Arabidopsis* ist *CLV1* Bestandteil eines 185- und eines 450-kD-Komplex (Trotochaud et al., 1999). Die Autoren konnten zeigen, daß der 185-kD-Komplex ein über Disulfid-Brücken verbundenes Heterodimer aus *CLV1* und *CLV2* ist. *CLV2* hat hierbei als Dimerisierungspartner von *CLV1* wahrscheinlich eine stabilisierende Funktion und/oder ist notwendig für die Ligandenbindung (Jeong et al., 1999). Der größere 450-kD-Komplex beinhaltet *CLV1*, *CLV2* und *CLV3* sowie zwei weitere Proteine. Diese Proteine sind eine Kinase-assoziierte-Protein-Phosphatase (KAPP) sowie ein Rho-GTPase verwandtes Protein (Rop) (Trotochaud et al., 1999, 2000). KAPP ist wahrscheinlich ein Regulator der *CLV1*-Kinase-Aktivität, während Rop im weiteren Verlauf der Signaltransduktion eine Rolle bei der Signal-Weitervermittlung zukommt - analog zur tierischen Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Kaskade (Hirt et al., 1997; Williams et al., 1997; Stone et al., 1998; Trotochaud et al., 1999). Die Bildung des 450-kD-Komplexes kommt offensichtlich nur bei Anwesenheit eines funktionellen *CLV3*-Proteins zustande, da Trotochaud et al. (1999) den Komplex nicht in starken *clv3*-Mutanten detektieren konnten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß 76% des *CLV3*-Proteins an den 450-kD-Komplex gebunden vorliegen. Die restlichen 24 % sind nicht an den Rezeptor gebunden und als Bestandteil eines 25-kD-Multimers bzw. Heteromultimers mit einem unbekanntem Faktor assoziiert (Trotochaud et al., 2000). Die weiteren Bestandteile dieses Multimers sind bislang unklar.

Die Ergebnisse legen nahe, daß das *CLV3*-Multimer an den 185-kD *CLV1/CLV2*-Komplex bindet, dieser dann durch Autophosphorylierung aktiviert wird und zusammen mit KAPP und Rop den 450-kD-Komplex bildet (Abb. 40). KAPP und *CLV1* binden *in vitro* in Abhängigkeit von der *CLV1*-Kinase-Aktivität und der Phosphorylierung von KAPP, aneinander. Transgene Pflanzen, die KAPP überexprimieren, kopieren den *clv1*-mutanten Phänotyp. Das legt nahe, daß KAPP den *CLV*-Signaltransduktionsweg - möglicherweise durch Dephosphorylierung - von *CLV1* oder anderen Komponenten negativ reguliert (Stone et al., 1998). Wahrscheinlich interagiert KAPP auch mit anderen Rezeptorkinasen und ist so in die Regulation von ganz verschiedenen Signaltransduktionswegen involviert.

Ishiguro et al. (2002) klonierten das Gen *SHEPERD (SHD)* aus *Arabidopsis*. *SHP* kodiert ein Ortholog des GRP94-Proteins, ein HSP90-ähnliches Protein und ist im ER lokalisiert. Die Autoren vermuten, daß das SHD-Protein für die korrekte Faltung und/oder Komplex-Bildung des *CLV*-Rezeptors notwendig ist. Der Phänotyp von *shp*-Mutanten ist pleiotrop. Das Sproß- und die Blütenmeristeme sind stark vergrößert und lassen sich von *clv*-Mutanten nicht unterscheiden. Ferner zeigen sie eine fehlerhafte Zellorganisation im Wurzelmeristem und Defekte beim Wachstum des Pollenschlauchs. In Übereinstimmung mit dem pleiotropen mutanten Phänotyp ist *SHP* ubiquitär in der Pflanze exprimiert. Sproß- und Blütenmeristeme von *shp/clv*-Doppelmutanten sind von *clv*-Einzelmutanten nicht zu unterscheiden, zudem ist *wus* epistatisch über *shp*. Da außerdem eine Überexpression von *CLV3* in *shp*-Mutanten keine Auswirkungen hat, ist zu vermuten, daß die Funktion von *CLV* von *SHP* abhängig ist.

4.3 CLV3 ist feedback reguliert

Im Rahmen der Fehlexpressions-Experimente wurde festgestellt, daß eine Erhöhung der Gendosis von *CLV3* auf bis zu 4 Kopien keinen Einfluß auf den Phänotyp der transgenen Pflanzen hatte. Dieses Ergebnis legt eine Feedback-Regulation von *CLV3* nahe.

Um dies genauer zu analysieren, wurden *UFO::CLV3* transgene Embryonen einer RNA-*in-situ*-Hybridisierung unterzogen. In den nicht-transgenen Kontrollembryonen konnte *CLV3*-Expression in der zentralen Zone des Meristems nachgewiesen werden. In den transgenen *UFO::CLV3*-Embryonen hingegen wurde *CLV3*-Expression nur unterhalb der endogenen Domäne im *UFO*-Expressionsmuster detektiert. *CLV3*-Signale aus der *UFO*-Domäne können folglich zum einen eine Repression der *CLV3*-Transkription in der zentralen Zone bewirken und zum anderen kann das *CLV3*-Signal auch von unterhalb der *CLV3*-Domäne aus in den oberen Meristemschichten am *CLV1/2* Rezeptor wirken. Möglicherweise wird dies durch Verhinderung von Zellteilung oder durch Initiierung von Zelldifferenzierung in der zentralen Zone des Meristems bewirkt.

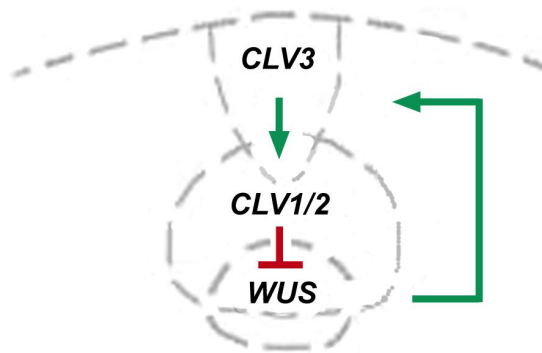


Abb. 41: Modell zur Feedback-Regulation zwischen den *CLV*-Genen und *WUS* im SAM. *CLV3* wird aus den äußeren Zellschichten des Meristems sekretiert und aktiviert den *CLV1/2*-Rezeptor in der zentralen Zone in der L3. Die Aktivierung führt zur Repression von *WUS* in den tieferen Zellschichten des Meristems. *WUS* seinerseits fördert Stammzellschicksal in der zentralen Zone und damit die Expression von *CLV3*, das in diesen Zellen exprimiert ist. In *clv*-Mutanten ist der *CLV*-Signaltransduktionsweg nicht funktionell und *WUS* wird nicht reprimiert. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Stammzellen in der zentralen Zone des Meristems. Bei Erhöhung der *CLV3* Dosis in transgenen Pflanzen ist im Gegensatz dazu *WUS* stark reprimiert und die Stammzellen gehen ebenso wie in *wus* Mutanten verloren.

Die Ergebnisse indizieren, daß Zielgene des *CLV*-Signaltransduktionsweges Faktoren enthalten, die die Transkription von *CLV3* oder die Zellidentität bzw. Zellteilung in der zentralen Zone des Meristems kontrollieren. *CLV3* würde dann als Repressor solcher regulatorischer Faktoren wirken, die ihrerseits *CLV3*-Expression bzw. Stammzellschicksal fördern.

Wie in Kap. 4.2 diskutiert, ist *WUS* eines der Gene, die von den *CLV*-Genen reprimiert werden und stellt damit ein Zielgen des *CLV*-Signaltransduktionsweges dar. Diese gegenseitige Regulation mit positiven und negativen Interaktionen zwischen *CLV* und *WUS* deutet auf einen feedback-Mechanismus hin, der für die Aufrechterhaltung einer stabilen Stammzellpopulation im SAM von *Arabidopsis* verantwortlich ist (Abb. 41).

CLV3 aktiviert den CLV1/2-Rezeptor in der zentralen Zone in der L3 und führt so zur Repression von *WUS* in den tieferen Zellschichten des Meristems. *WUS* seinerseits fördert Stammzellschicksal und damit die Expression von *CLV3*. In *clv*-Mutanten ist der *CLV*-Signaltransduktionsweg nicht funktionell und *WUS* wird somit nicht reprimiert. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Stammzellen in der zentralen Zone des Meristems und zur starken Expression von *CLV3*. Eine Erhöhung der *CLV3* Expression in transgenen Pflanzen bewirkt hingegen die starke Repression von *WUS* und damit den Verlust von Stammzellen wie dies auch in *wus*-Mutanten der Fall ist.

Fehlexpressionsexperimente mit *WUS* bestätigten die hier erzielten Ergebnisse und zeigten ebenfalls, daß die *CLV*-Gene und *WUS* durch einen regulatorischen Feedback-Mechanismus die Anzahl an Stammzellen kontrollieren (Schoof et al., 2000). Die ektopische Expression von *WUS* unter Kontrolle des *CLV1*-Promotors führte zu einer massiven Vergrößerung des Meristems und einer erhöhten Anzahl an Stammzellen, also einer prinzipiellen Phänokopie des *clv*-mutanten Phänotyps. Dies bestätigt, daß der *clv*-mutante Phänotyp das Resultat einer Fehl-Regulation von *WUS* ist und daß im Wildtypen *CLV*-Gene durch eine Repression von *WUS* die Meristemgröße kontrollieren. Weiterhin wurde *WUS* unter Kontrolle des *AINTEGUMENTA*-Promotors (*ANT*) in den Organprimordien und sich entwickelnden Organen exprimiert (Schoof et al., 2000; Elliot et al., 1996). Die *ANT::WUS*-Pflanzen bildeten keine Organe. Stattdessen war der Apex zwischen den Kotyledonen durch eine Ansammlung meristematischer Zellen stark vergrößert. In diesem Apex exprimierten die äußeren 3 Zellschichten *CLV3* im wildtypischen Muster. Die Autoren interpretierten das Ergebnis als Indiz dafür, daß *WUS* die *CLV3*-Expression und damit auch das Stammzellschicksal induzieren kann.

Der regulatorische Feedback-Mechanismus zwischen den *CLV*-Genen und *WUS* kontrolliert auch in den Blütenmeristemen bis zur Differenzierung der Karpelle und der damit verbundenen Beendigung der *WUS*-Expression die Aufrechterhaltung der Stammzellen. Die Kontrolle der *WUS*-Expression unterliegt in Blütenmeristemen einem weiteren regulatorischen Feedback-Mechanismus mit *AGAMOUS* (Lohmann et al., 2001; Lenhard et al., 2001). Diese Feedback-Regulation soll im folgenden erläutert werden.

Der MADS-Box-Transkriptionsfaktor *AG* repräsentiert die C-Funktion im ABC-Modell der Blütenentwicklung und scheint nur im Blütenmeristem eine Funktion zu haben (Coen und Meyerowitz, 1990). Während späterer Stadien der Blütenentwicklung wird *AG* in der zentralen Zone der Blütenmeristeme exprimiert und definiert die Identität der Organe des dritten und vierten Wirtels (Yanofsky et al., 1990; Bowman et al., 1991). Mutationen in *AG* führen neben dem Verlust der Identität dieser Organe zur Indetermination der Blütenmeristeme. Ähnlich wie in *clv*-Mutanten bleibt hier ein Reservoir an Stammzellen erhalten und die Mutanten produzieren eine weitere Blüte in der ersten, eine dritte innerhalb der zweiten und so fort. *WUS*-Expression wird in *ag*-mutanten Blütenmeristemen nicht abgeschaltet, mit der Folge, daß diese nicht terminieren. In *wus/ag*-Doppelmutanten hingegen ist die Terminierung der Blüte wiederhergestellt. Das deutet darauf hin, daß die ektopische Aktivität von *WUS* für die nicht terminierten Blüten in *ag*-Mutanten verantwortlich ist.

AG wird im Zentrum des Blütenmeristems exprimiert und direkt von *LEAFY* (*LFY*) aktiviert (Parcy et al., 1998; Busch et al., 1999). *LFY* kodiert einen Transkriptionsfaktor und wird in der gesamten jungen Blüte exprimiert. Lohmann et al. (2001) konnten nun zeigen, daß auch *WUS* direkt an den *AG* Promotor bindet und so die Expression von *AG* im Zentrum der Blütenmeristeme kontrolliert wird. *LFY* übernimmt also die blüten-spezifische und *WUS* die region-spezifische Aktivierung von *AG*. Die

Ergebnisse verdeutlichen die Feedback-Regulation im Blütenmeristem: *WUS* wird von *AG* reprimiert und aktiviert seinerseits *AG*.

4.4 Welche anderen Faktoren spielen in der *CLV*-Signaltransduktion eine Rolle?

Wie bereits dargestellt, könnte das Gen *POL* neben *WUS* als Zielgen für die *CLV*-Gene wirken. Für beide Gene wurde eine redundante Wirkung in Bezug auf die Förderung von Stammzellschicksal vermutet (Yu et al., 2000). Zum einen ist *POL* zum Teil verantwortlich für die Akkumulation von Stammzellen in *clv*-Mutanten. Weiterhin liegt eine enge Verknüpfung der Genaktivität von *POL* und *CLV* nahe, da schon eine 50%ige Reduktion der *POL* Aktivität den *clv* mutanten Phänotyp partiell supprimiert. Zum anderen verhalten sich die normalerweise rezessiven Mutationen im *WUS*-Gen im *pol*-mutanten Hintergrund semi-dominant. Dies wird dadurch deutlich, daß *pol*- Mutanten nur bei voller *WUS*-Aktivität einen nahezu wildtypischen Phänotyp zeigen, im heterozygoten *WUS/wus-1* Hintergrund jedoch nicht. *WUS* und *POL* könnten also bei der Regulation der meristematischen Entwicklung gemeinsam wirken. *pol* verstärkt den *wus*-mutanten Phänotyp, das ebenfalls darauf hindeutet, daß beide Gene redundant im *CLV*-Signaltransduktionsweg agieren könnten und gemeinsam das Stammzellschicksal fördern.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurde in der vorliegenden Arbeit das *35S::CLV3*-Transgen in *pol*-mutante Pflanzen transformiert. Wenn *WUS* und *POL* beide Zielgene des *CLV*-Signaltransduktionsweges sind und eine redundante Wirkung haben, müßten *35S::CLV3/pol*-Pflanzen erwartungsgemäß einen verstärkten *wus*-mutanten Phänotyp aufweisen, wie dies auch für *wus/pol*-Doppelmutanten der Fall ist (Yu et al., 2000).

Wegen der sehr schlechten Transformationseffizienz konnten insgesamt nur 8 *35S::CLV3/pol*-transgene Pflanzen regeneriert werden. Möglicherweise war ein Teil der Pflanzen letal. Die transgenen Pflanzen verloren sehr früh ihre meristematische Aktivität. Alle *35S::CLV3/pol*-Pflanzen bildeten bis zum Alter von 8 Wochen nur rund 15 Rosettenblätter und kamen nicht zur Blüte. Die Blattform unterschied sich deutlich von den Blättern der *35S::CLV3*-Pflanzen. Die Blätter waren besonders an den Petiolen signifikant verbreitert, teilweise an der Blattbasis fusioniert und die Blattspreite war stark nach innen verdreht. In den stärkeren Phänotypen waren die Blätter zusätzlich kallusartig verdickt.

Insgesamt wiesen die analysierten *35S::CLV3/pol*-Pflanzen also einen deutlich stärkeren Phänotyp auf als *wus*-Mutanten, *35S::CLV3* oder *35S::CLV3/wus*-Transgene. Die extreme Form der Rosettenblätter allerdings ist nicht ein klar verstärkter Effekt des *wus*-Phänotyps, sondern kann eher als neuartig interpretiert werden und ist in dieser Form bislang nicht für *wus/pol* beschrieben (Yu et al., 2000). Möglicherweise hat *35S::CLV3* noch einen zusätzlichen Effekt auf andere unbekannte Faktoren, der einerseits weder im wildtypischen noch im *wus*-mutanten Hintergrund ausgeprägt wird, andererseits nur in *35S::CLV3/pol* sichtbar wird, wenn *WUS* und *POL* funktionslos sind. Mit den hier erzielten Ergebnissen läßt sich diese Frage aber nicht abschließend beantworten. Zusätzliche Erkenntnisse müssen durch weitere Experimente sowie mit einer höheren Anzahl transgener Pflanzen erzielt werden. Insgesamt widerlegen diese Ergebnisse jedoch nicht die Hypothese von Yu et al. (2000), die für *POL* eine mit *WUS* redundante Wirkung vermuten.

Um zu analysieren, ob *STM* für die *CLV*-Signaltransduktion eine Rolle spielt, wurde das *35S::CLV3*-Transgen im *stm-2*-mutanten Hintergrund analysiert. *STM* ist vom späten globulären Stadium an exprimiert und ist für die Etablierung des embryonalen SAM essentiell. Während der weiteren Entwicklung erhält *STM* den undifferenzierten Status der meristematischen Zellen. Wie bereits einleitend beschrieben ist es wahrscheinlich, daß die Gene unabhängig voneinander agieren. Wenn dies zutreffend ist, müßte der Phänotyp von *35S::CLV3/stm*-Pflanzen im Vergleich zur Einzelmutanten additiv sein.

Die Pflanzen bildeten bis zum Alter von 6 Wochen neben den Kotyledonen lediglich 2-3 Rosettenblätter und ein zentrales endständiges Blatt, das oft auch an der Basis fusioniert und trichterförmig war. Vereinzelt waren die Rosettenblätter der Pflanzen verdickt. Sie zeigten tatsächlich in Bezug auf den Verlust meristematischer Aktivität additive Effekte. Dies bestätigten auch die Ergebnisse von Endrizzi et al. (1996), die zeigten, daß *wus*-Mutanten in schwachen *stm*-Linien den *stm*-mutanten Phänotyp verstärken. In starken *stm*-Linien hingegen ist der *stm*-mutante Phänotyp epistatisch über *wus*-Mutanten. Das legt eine unabhängige Wirkung des *CLV*-Signaltransduktionsweg und *STM* nahe. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind also ein weiterer Hinweis auf eine unabhängige Wirkung von *STM* und *CLV3* bei der Regulation der meristematischen Entwicklung.

Teil II: Regulation der *CLV3*-Expression durch meristemspezifische Gene

4.5 *WUS* verstärkt die Expression von *CLV3* im Meristem

Wie in Kap. 4.3 dargestellt, wird das Stammzellschicksal durch einen Feedback-Regulationsmechanismus der *CLV*-Gene und *WUS* kontrolliert. *WUS* fördert dabei sowohl Stammzellschicksal als auch die *CLV3*-Expression. *CLV3* bindet an den *CLV1/2* Rezeptor und der aktivierte Komplex bewirkt die Repression von *WUS* (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Es konnte bislang nicht gezeigt werden, ob die Aktivierung von *CLV3* durch *WUS* direkt oder indirekt erfolgt. *WUS* und *CLV3* sind in getrennten Domänen im SAM exprimiert. Die Aktivierung von *CLV3* könnte also direkt durch eine nicht-zellautonome Signalwirkung des Transkriptionsfaktors *WUS* oder indirekt durch die Aktivierung eines weiteren Signals erfolgen. Beispiele für nicht-zellautonom wirkende Transkriptionsfaktoren in Pflanzen sind *FLORICAULA* aus *Antirrhinum* sowie *LEAFY* aus *Arabidopsis* (Handtke et al., 1995; Sessions et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob *WUS* zum einen notwendig zur Aktivierung von *CLV3*-Expression und zum anderen hinreichend ist, um *CLV3* in der gesamten Pflanze zu aktivieren. Zur Klärung der ersten Fragestellung, wurde das *CLV3*-Reportergen in *wus*-Mutanten gekreuzt. Die Analyse der *CLV3*-Expression in *wus*-Mutanten zeigte, daß diese während der Entwicklung zunehmend unabhängiger von *WUS* wird. Während der Embryogenese scheint *WUS* essentiell für die *CLV3*-Aktivierung zu sein, da in keinem der untersuchten *wus*-mutanten Embryonen ein *CLV3*-Signal nachgewiesen werden konnte. In *wus*-mutanten Keimlingen hingegen war *CLV3*-Expression in einer kleineren Domäne und schwächer als im Wildtyp detektierbar. In diesem Entwicklungsstadium hat *WUS* anscheinend nur noch die Funktion Stammzellen zu erhalten und die Stärke der *CLV3*-

Expression zu fördern. In den Achselmeristemen *wus*-mutanter Pflanzen war *CLV3* in einigen Fällen ebenso stark wie im Wildtyp exprimiert. Demgegenüber war in anderen *wus*-mutanten Achselmeristemen nur eine schwache *CLV3*-Expression detektierbar. Möglicherweise waren die Stammzellen dieser Achselmeristeme bereits wieder verbraucht, so daß zum einen die Meristeme terminierten und zum anderen die *CLV3*-Expression stark reduziert war.

Das Fehlen der *CLV3*-Expression in *wus*-Embryonen könnte somit indizieren, daß *WUS* in der Embryogenese als direkter Aktivator von *CLV3* essentiell ist. Andererseits könnte die fehlende *CLV3*-Expression aber auch nur eine indirekte Konsequenz des Nichtvorhandenseins der Stammzellen in *wus*-Embryonen sein.

Die Aktivität von *WUS* ist nicht nur auf das embryonale SAM beschränkt (Laux et al., 1996). In *wus*-Mutanten sind auch Infloreszenz- und Blütenmeristeme defekt und können ihre Stammzellpopulation nicht aufrechterhalten. Sie terminieren nach der Bildung weniger Organe verfrüht. Trotzdem bilden *wus*-Mutanten Meristeme, was auf zusätzliche Faktoren schließen läßt, die Meristembildung fördern. Der Einfluß einiger weiterer Faktoren auf die Regulation von *CLV3* – wie *STM*, *CUC*, *PHB* und *POL*, wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Gene, die möglicherweise redundant mit *WUS* agieren, könnten dann auch *CLV3*-Expression in *wus*-Mutanten aktivieren. Mehrere Ergebnisse sprechen dafür, daß *POL* zusammen mit *WUS* Stammzellschicksal fördern könnte (Kap.4.4). Mutationen im *POL*-Gen supprimieren den *clv*-mutanten Phänotyp und verstärken den *wus*-mutanten Phänotyp (Yu et al., 2000). Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß *WUS* in die transkriptionelle Kontrolle von *CLV3* involviert zu sein scheint, *CLV3* aber nicht vollständig abhängig ist von *WUS*-Aktivität. Nur während der Embryogenese ist *WUS* für die Aktivierung von *CLV3* notwendig (Brand et al., 2002).

Daran anschließend wurde untersucht, ob die ektopische Expression von *WUS* hinreichend ist, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu induzieren. Die Fehlexpression von *WUS* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors führte nicht zur Aktivierung von *CLV3* in der gesamten Pflanze. Eine *CLV3*-Aktivierung konnte nur im SAM und in den Achselmeristemen der transgenen Pflanzen, besonders stark in deren äußeren Zellschichten, detektiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß besonders die Zellen der äußeren Schichten etablierter Meristeme auf *WUS*-Expression bzw. auf ein von *WUS* aktiviertes Signal reagieren könnten. Auch das weist auf einen oder mehrere zusätzliche im Meristem lokalisierte Faktoren hin, die neben *WUS* für die Aktivierung von *CLV3* notwendig sind. *WUS* ist folglich nicht hinreichend, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren (Brand et al., 2002).

Unterstützt wird diese Hypothese durch Fehlexpressions-Experimente von Lenhard et al. (2001), bei denen *WUS* unter Kontrolle des *AP3*-Promotors im 2. und 3. Wirtel in Blüten exprimiert wurde. In den sich entwickelnden Organprimordien war keine ektopische *CLV3*-Expression nachweisbar. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen fanden Lenhard et al. (2002) in Pflanzen mit einem vergleichbaren *35S::WUS-GR*-Transgen *CLV3::NLSGUS*-Aktivierung in den Kotyledonen, im Hypokotyl und in Blättern – in diesen insbesondere in den Leitbündeln. Methodisch gab es hier zwei Unterschiede: zum einen führten Lenhard et al. die Experimente im *Landsberg*-Hintergrund aus, während im Rahmen dieser Arbeit der *Columbia*-Wildtyp verwendet wurde. Außerdem verwendeten sie für alle Marker-Gen-Fusionen das pOpL-Zwei-Komponenten System (Moore et al., 1998). Möglicherweise ist der Unterschied in der detektierten *CLV3*-Expression also auch auf eine Variabilität zwischen den verwendeten Transgenen zurückzuführen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß *WUS* nur während der Embryogenese notwendig zur Aktivierung von *CLV3*-Expression ist und die Etablierung des *CLV3*-Expressionsmusters vom Keimlingsstadium an *WUS* unabhängig erfolgt. Weiterhin ist *WUS* nicht hinreichend, um *CLV3* in der gesamten Pflanze zu aktivieren.

4.6 *STM* ist nicht essentiell für die Aktivierung von *CLV3*

Um die Rolle von *STM* bei der Regulation der *CLV3*-Expression näher zu analysieren, wurde zunächst die Expression des *CLV3*-Reportergens in *stm*-Mutanten zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten untersucht. In *stm*-mutanten Embryonen und Keimlingen sowie in den Adventivmeristemen adulter Pflanzen konnte - trotz fehlendem funktionalem SAM - *CLV3*-Expression nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster entsprach dem wildtypischer Pflanzen, während die Expressionsstärke deutlich vermindert war. Im Embryo könnte die schwache *CLV3*-Expression eventuell durch die vorhandene *WUS*-Aktivität bedingt sein, da *WUS* in *stm*-Embryonen zwischen den Kotyledonen exprimiert ist (Mayer et al., 1998). Im *stm*-Keimling hingegen ist *WUS*-mRNA nicht mehr nachweisbar (Mayer et al., 1998). Dies indiziert, daß weder *WUS* noch *STM* notwendig sind um *CLV3*-Expression zu aktivieren.

Eine ektopische Expression von *STM* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors führte zu ektopischen Meristemen auf der Blattoberfläche, die *CLV3* im wildtypischen Muster exprimierten. Außerdem konnte *CLV3*::GUS-Färbung auch in ektopischen Stipulen sowie in einem Teil der Pflanzen in den Leitbündeln und in den Kotyledonen nachgewiesen werden. Der Nachweis von *CLV3*-mRNA in der *in-situ*-Hybridisierung konnte aber eindeutig nur für das SAM und die ektopischen Meristeme erbracht werden. Folglich ist *STM* nicht hinreichend, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren (Brand et al., 2002).

Die detektierte *CLV3*::GUS-Färbung in den Leitbündeln von *STM-GR*-Pflanzen könnte möglicherweise die Kapazität dieses Gewebes reflektieren, Meristeme zu bilden. Einen Hinweis darauf liefert der Phänotyp von *35S*::*KNATI*-Pflanzen, einem mit *STM* verwandten Homeobox-Gen, bei denen ektopische Meristeme nur auf der adaxialen Blattseite auf den Leitbündeln entstehen (Chuck et al., 1996).

Die bereits erwähnten Stipulen bilden sich in der wildtypischen Pflanze als kleine filamentartige Strukturen an der Basis des entstehenden Blattes, grenzen das Blatt also gewissermaßen gegen das Meristem ab. In einigen mutanten und transgenen Hintergründen mit Fehlexpression von *KNOX*-Genen in Blättern befinden sich - wie auch in den *STM-GR*-Pflanzen - ektopische Stipulen entlang der kompletten Blattspreite. Eine mögliche Interpretation dieser ektopischen Stipulen ist, daß sie ein Indikator für eine meristemartige Aktivität der Blätter sind (Ori et al., 2000). Es bleibt unklar, ob die detektierte *CLV3*::GUS-Färbung in diesen Stipulen spezifisch ist.

In *STM-GR*-transgenen Pflanzen war auch *WUS* nicht ektopisch exprimiert. *WUS*-RNA war im wildtypischen Muster im SAM und den ektopischen Meristemen detektierbar. *STM* scheint also *WUS* nicht direkt zu aktivieren. Beide Gene werden auch in der Embryogenese unabhängig voneinander aktiviert (Mayer et al., 1998). Die Ergebnisse unterstützen ebenfalls die These, daß *CLV3* und *STM* unabhängig voneinander agieren.

Exkurs: Phänotyp der transgenen *STM-GR*-Pflanzen

In *STM-GR*-transgenen Pflanzen expandieren die Blätter nicht, sondern bleiben sehr klein und schmal und es bilden sich keine Leitbündel. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß *STM* Zelldifferenzierung verhindert und deshalb die Entwicklung zum reifen Blatt unterbleibt. Diesen Phänotyp bestätigten Williams et al. (1998), die *35S::STM*-transgene Pflanzen analysierten. Diese zeigten verkümmertes Wachstum der ganzen Pflanze mit einem fehlorganisierten Sproß und blatt-ähnlichen Ausbuchtungen, die sich nicht in reife Blätter differenzierten. Auch Gallois et al., (2002) fanden den hier beschriebenen Phänotyp bei der Expression von *STM* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors in Fusion mit der hormonbindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptors. Im Unterschied zu den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen *STM-GR*-Phänotypen zeigten die Phänotypen von Gallois et al. keine ektopischen Meristeme auf der Blattoberseite, obwohl diese aus Beobachtungen von transgenen Pflanzen mit ektopischer *KNATI*-Expression und *as-1* und *as-2* Mutanten zu erwarten gewesen wären (Ori et al., 2000; Byrne et al., 2000). Auch transgene *35S::CUC1*-Pflanzen wiesen ektopische Meristeme auf der adaxialen Seite der Kotyledonen auf, die auf ektopische Aktivierung von *STM* zurückzuführen sind (Takada et al., 2001). Gallois et al. (2002) führen das Fehlen der ektopischen Meristeme auf einen möglicherweise zu geringen Level an *STM-GR* in ihren transgenen Pflanze zurück.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß *STM* nicht notwendig zur Etablierung des *CLV3*-Expressionsmusters in der zentralen Zone des SAM und der Achselmeristeme ist. Ferner ist *STM* nicht hinreichend, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren.

4.7 Koexpression von *WUS-GR* und *STM-GR* und der Einfluß auf *CLV3*

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß weder *WUS* noch *STM* die Expression von *CLV3* in der gesamten Pflanze aktivieren können. In einem weiteren Experiment wurde deshalb untersucht, ob die Koexpression beider Gene ausreichend ist für eine ektopische Aktivierung der *CLV3*-Expression

Die Koexpression von *WUS-GR* und *STM-GR* führte zu einer starken *CLV3::GUS*-Färbung in den meristematischen Zellen des SAM und zu einer schwachen, diffusen Färbung im Blattgewebe. Es konnte jedoch keine *CLV3*-Aktivierung in der gesamten Pflanze detektiert werden.

Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die gemeinsame Aktivität von *WUS* und *STM* ausreichend ist, um *CLV3* in den jungen Blättern der transgenen Pflanzen zu aktivieren (Kap.3.6.5). Möglicherweise haben sich die jungen Primärblätter zum Zeitpunkt der Dexamethason-Induktion in einem noch relativ undifferenzierten Stadium befunden, so daß sie durch die ektopische Expression von *WUS* und *STM* wieder einen meristemartigen Charakter annehmen konnten. Die Expressionsstärke von *CLV3* in den Blättern von *STM-GR/WUS-GR*-Pflanzen ist deutlich niedriger als in wildtypischen Meristemen. Dies deutet darauf hin, daß *STM* und *WUS* lediglich ein Grundniveau an *CLV3*-Expression in bereits differenziertem Gewebe induzieren können.

Auch im wildtypischen Apex sind *STM* und *WUS* in überlappenden Domänen exprimiert, trotzdem ist *CLV3*-Expression dort aber nur in den äußeren Zellschichten der zentralen Zone detektierbar. Im Meristem müssten also noch zusätzliche Faktoren aktiv sein, die eine Expression von *CLV3* auf die wildtypische Domäne in der zentralen Zone begrenzen. In den Blättern der *35S::STM/35S::WUS*-Pflanzen sind diese reprimierenden Faktoren nicht vorhanden, so daß es hier zur gleichmäßigen

CLV3::GUS-Färbung kommt. Diese These unterstützen auch die Ergebnisse von Lenhard et al. (2002). Die Autoren koexprimierten *STM* und *WUS* in den Organprimordien unter Kontrolle des *ANT*-Promotors. Sie detektierten *CLV3*-mRNA in *ANT::WUS/ANT::STM*-Pflanzen im wildtypischen Muster in den äußeren drei Zellschichten des stark vergrößerten Meristems.

Phänotypisch zeigten die *STM-GR/WUS-GR*-Pflanzen um die Position des eigentlichen SAM herum Ansammlungen kompakter meristemartiger Zellen, die bis auf die Petiolen der Kotyledonen reichten. In regelmäßigen Abständen bildeten sich hier und auf den Primärblättern primordienartige Ausstülpungen, die sich jedoch nicht weiter differenzierten.

Einen ähnlichen Phänotyp fanden Gallois et al. (2002). Auch sie koexprimierten *WUS* und *STM* in einer Pflanze, wobei sie ein vergleichbares *35S::STM-GR*-Transgen verwendeten. *WUS* wurde unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors mit Hilfe des Cre-loxP-Systems nur in Sektoren der transgenen Pflanze exprimiert. Die Autoren fanden ektopische Organe auf adaxialen und abaxialen Blattseiten und verteilt am Hypokotyl. Sie konnten zeigen, daß die ektopische Organbildung das Resultat transienter meristematischer Aktivität im Blatt und im Hypocotyl ist. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, daß die Sektoren in diesen Fällen *WUS* und *STM* gemeinsam exprimierten. In diesen Sektoren revertierten also Zellen vom differenzierten in den undifferenzierten Status, zeigten meristematische Aktivität und bildeten infolgedessen ektopische Organe.

Insgesamt ist somit festzustellen, daß die gemeinsame Expression von *WUS* und *STM* anscheinend bestimmte, möglicherweise noch nicht komplett ausdifferenzierte Zellen wieder zu undifferenzierten meristematischen Zellen revertieren läßt, in denen dann *CLV3* exprimiert ist. Die Koexpression von *WUS* und *STM* ist nicht hinreichend, um *CLV3* in der gesamten Pflanze zu aktivieren.

In den vorangehenden Kapiteln wurde dargelegt, daß *WUS* nicht benötigt wird, um das Expressionsmuster von *CLV3* festzulegen, sondern vielmehr die Expressionsstärke von *CLV3* kontrolliert. *STM* scheint für die Etablierung der Zellen zuständig zu sein, auf die *WUS* dann wirkt. Welche Faktoren verantwortlich für die Festlegung des Expressionsmusters und der Außengrenzen von *CLV3* sind muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Der Einfluß weiterer meristemspezifischer Gene auf die *CLV3*-Expression wie *CUC*, *PNH*, *MGO*, *PHB* und *ASI* wird im folgenden diskutiert.

4.8 Welche anderen meristemspezifischen Gene kontrollieren die Expression von *CLV3*?

Wie einleitend bereits dargestellt, sind mittlerweile zahlreiche Gene bekannt, die an der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung eines funktionalen Meristems auf unterschiedliche Weise beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde neben *WUS* und *STM* auch der Einfluß von einigen anderen Genen auf die Regulation der *CLV3*-Expression untersucht.

CUC

In *cuc1/cuc2*-doppelmutanten Embryonen und Keimlingen fehlt die *CLV3*-Expression. Wie bereits erläutert, ist *CUC1* ein positiver Regulator von *STM* (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001). Dies äußert sich darin, daß *STM* nicht in *cuc1/cuc2*-Mutanten exprimiert wird und die ektopische Expression von *CUC1* auch *STM* ektopisch aktiviert. Zudem ist *CUC1* bereits im frühen globulären Stadium exprimiert, während *STM* mRNA erstmals im späten globulären Stadium in einer überlappenden Domäne detektierbar ist.

In *cuc1/cuc2* Doppelmutanten fehlt das SAM komplett und wird auch während der postembryonalen Entwicklung nicht initiiert. Die fehlende *CLV3* Expression ist in *cuc1/cuc2* Doppelmutanten wahrscheinlich auf die Abwesenheit meristematischer Zellen zurückzuführen. Es kann folglich nicht von einer direkten Abhängigkeit der *CLV3* Expression von *CUC* ausgegangen werden.

PNH

Es konnte gezeigt werden, daß die *PNH*-Genfunktion im reifen Embryo und im ganz jungen Keimling für die Expression von *CLV3* essentiell notwendig ist. Erst wenn im Alter von 14-20 Tagen Adventivmeristeme in *pnh*-Mutanten initiiert werden, wird *CLV3* unabhängig von *PNH* aktiviert.

PNH ist im embryonalen SAM anscheinend notwendig für die Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation (Jürgens et al., 1994; McConell und Barton, 1995; Endrizzi et al., 1996). Die molekulare Ähnlichkeit zu AGO2 und zum Translations-Initiationsfaktor *eIF2C* aus Kaninchen (Hammond et al., 2001; Zou et al., 1998) legt weiterhin nahe, daß *PNH* eine Rolle bei der Translationskontrolle verschiedener Gene in der Entwicklung spielt. Im reifen Embryo ist *PNH* außer im provaskulären Gewebe auch im SAM exprimiert und übernimmt dort anscheinend die Funktion, die wildtypische Expression von *STM* zu kontrollieren (Moussian et al., 1998, Lynn et al., 1999). Die Autoren fanden in *pnh*-Mutanten die *STM*-Expression in der zentralen Zone des SAM von reifen Embryonen deutlich reduziert und lediglich in der peripheren Zone in der wildtypischen Stärke exprimiert. Bis zum Torpedo-Stadium ist *STM* in *pnh*-Mutanten noch wildtypisch exprimiert. Das könnte darauf hinweisen, daß mit der *STM*-Expression die Stammzellen der zentralen Zone im reifen Embryo ihren undifferenzierten Status verlieren. Die fehlende *CLV3*-Expression könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, daß im SAM von *pnh*-mutanten Embryonen die Stammzellen tatsächlich verloren gehen.

Lynn et al. (1999) erklären die hohe phänotypische Variabilität im SAM von *pnh*-mutanten Embryonen und Keimlingen mit der Aktivität redundanter Gene, die *PNH*-Funktion übernehmen könnten. Als mögliches Gen nennen sie das homologe Gen *AGO1*, das überlappende Expressionsmuster aufweist und in der mutanten Situation einen ähnlichen SAM Defekt zeigt.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß *PNH* tatsächlich eine entscheidende Funktion bei der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation im embryonalen SAM haben könnte, ist die hohe Homologie mit dem Gen *PIWI* aus Drosophila (Cox et al., 1998). *PIWI* ist dort notwendig zur Selbsterhaltung der Keimbahn-Stammzellen, die sich in *piwi*-mutanten Fliegen ausdifferenzieren.

Die unabhängige Aktivierung von *CLV3* in der späteren Entwicklung von *pnh*-Mutanten, legt nahe, daß der Verlust von *CLV3*-Expression im Embryo eher indirekt durch den Verlust der Stammzellen erfolgt.

MGO

Die *CLV3*-Expression in *mgo1*- und *mgo2*-mutanten Keimlingen und in deren Achselmeristemen war vergleichbar mit der Expression im Wildtypen.

Die beiden *MGO*-Gene kontrollieren das Zellschicksal in der peripheren Zone und sind notwendig, damit sich diese Zellen tatsächlich zu Organprimordien differenzieren können (Laufs et al. 1998). In *mgo*-Mutanten werden folglich weniger Organe gebildet, als im Wildtypen. Die Zellen akkumulieren in der peripheren Zone und führen zur Vergrößerung des SAM. In der adulten *mgo*-Pflanze kommt es außerdem zu einer Faszierung des SAM, die anders als bei *clv*-Mutanten auf eine Aufspaltung des Meristems zurückzuführen ist. Somit kann hier nicht von einer direkten Abhängigkeit der *CLV3*-Expression von *MGO* ausgegangen werden.

PHB

Die Expression des *CLV3*-Reportergens in den Meristemen von *phb-1d*-Mutanten war vergleichbar mit der *CLV3*-Expression im Wildtypen. Dies gilt auch für die ektopischen Achselmeristeme an der Unterseite der adaxialisierten Blätter in *phb-1d*-Mutanten.

Das Gen *PHB* gehört zusammen mit *PHV* und *REV* zu einer Genfamilie, die adaxiales Zellschicksal in lateralen Organen fördert (McConnell und Barton, 1998; McConnell et al., 2001). Der semi-dominante Phänotyp in *phb-1d* wird durch die konstitutive und ektopische Aktivität von *PHB* verursacht. *PHB* ist im Wildtypen nicht nur auf der adaxialen Seite der lateralen Organe exprimiert, sondern auch in der zentralen Zone des Meristems. Weiterhin ist die Entwicklung von Achselmeristemen mit der adaxialen Blattbasis assoziiert. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob *CLV3*-Expression durch konstitutiv aktives *PHB* in *phb1-d*-Mutanten aktiviert werden kann. Die Ergebnisse dieser Expressionsstudien legen allerdings nahe, daß *PHB* zumindest kein direkter Aktivator von *CLV3* ist.

ASI

Die Analyse des *CLV3*-Reportergens im *as1*-mutanten Hintergrund ergab ein wildtypisches Expressionsmuster. Die Expression von *ASI* wird von *STM* im Meristem reprimiert und so auf die die Organprimordien begrenzt (Byrne et al., 2001). Pflanzen mit einer Mutation im *ASI*-Gen zeigen stark gelappte Kotyledonen, Blätter und Blütenorgane. Wegen der direkten Interaktion von *ASI* und *STM* wurde die *CLV3*-Expression im *as1*-mutanten Hintergrund analysiert. Die Ergebnisse dieser Expressionsstudien lassen vermuten, daß *ASI* zumindest kein direkter Regulator von *CLV3* ist.

Teil III: Regulation von *CLV3* durch eigene regulatorische Sequenzen

4.9 Welche der regulatorischen Elemente kontrollieren die Expression von *CLV3* ?

Da für die bislang diskutierten Faktoren kein direkter Einfluß auf die Regulation der *CLV3*-Expression nachgewiesen werden konnte, wurden die regulatorischen Sequenzen von *CLV3* näher untersucht. Die Analyse der regulatorischen Sequenzen ermöglicht es, spezifische Elemente und

damit möglicherweise neue Faktoren zu isolieren, die für die Regulation von *CLV3* verantwortlich sind.

Mit Hilfe von Datenbankanalysen konnten in den regulatorischen Sequenzen von *CLV3* keine charakteristischen Elemente oder Boxen bestimmt werden. Es wurden jedoch im Promotor insgesamt zwei putative *WUS* Bindungstellen mit der Sequenz TTAAT(G/C)(G/C) gefunden (Lohmann et al., 2001). Im 3' von *CLV3* gelegenen Enhancer liegen insgesamt vier solcher putativer *WUS* Bindungsstellen. Die Positionen dieser putativen Bindungsstellen ist in Abb. 42 schematisch dargestellt

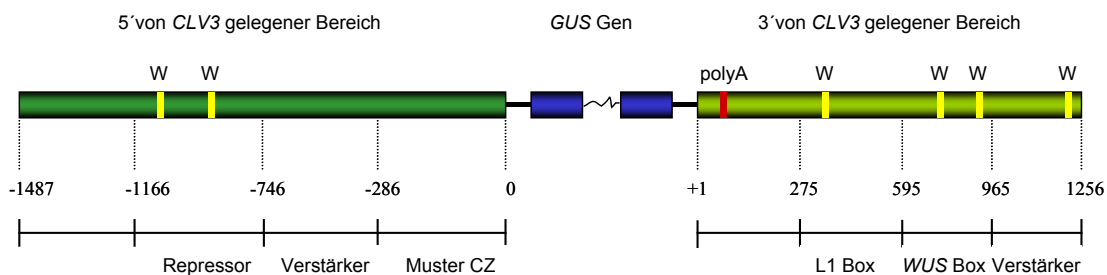


Abb. 42: Das *CLV3::GUS* Reporter gen. Die schematische Darstellung faßt die möglichen regulatorischen Elemente zusammen, die bei der Analyse der Deletionsderivate identifiziert werden konnten. Die Zahlen geben die Fragmentlängen der Deletionsderivate in bp an. Die ebenfalls eingezeichneten putativen *WUS* Bindungsstellen (gelb) befinden sich bei -1049 und -856 bp im 5' gelegenen Bereich sowie bei 376, 780, 875 und 1143 bp im 3' gelegenen Bereich. Das polyA-Additionssignal (rot) liegt 180 bp hinter dem translationalen Stopcodon von *CLV3* und die TATA-Box ist im Bereich von etwa 140 bis 90 bp vor dem translationalen Start von *CLV3*.

Um eine erste Untersuchung der regulatorischen Sequenzen von *CLV3* vorzunehmen, wurden die 5' und 3' von der codierenden Region gelegene Bereiche einer Deletionsanalyse unterzogen (Kap. 3.9.1). Grundlage für die Konstruktion der Deletionsderivate war das *CLV3::GUS*-Reporter gen (Abb. 42). Im folgenden wird der 5' von *CLV3* gelegene Bereich auch als Promotor und der 3' gelegene Bereich auch als Enhancer bezeichnet. Alle Deletionsderivate im Promotor- und Enhancer-Bereich sind in Kap. 3.9 dargestellt und gehen aus den in Abb. 42 angegebenen bp Zahlen hervor. Deletionsderivat *Del1* (5-1166 / 3+1256) zeigte im Vergleich zum *CLV3*-Reporter gen keine Veränderung im Expressionsmuster. Die *GUS*-Expression von *Del2* (5-746 / 3+1256) war deutlich verstärkt: 66% der Embryonen bzw. 58% der Keimlinge zeigten dieses verstärkte Signal, wohingegen die restlichen transgenen Pflanzen eine schwächere Expression als das *CLV3*-Reporter gen lieferten. Deletionsderivat *Del3* (5-286 / 3+1256) verursachte eine vermindert starke *GUS*-Färbung im wildtypischen *CLV3*-Muster in der zentralen Zone.

Weiterhin wurde auch der 3' von *CLV3* gelegene Enhancer-Bereich deletiert. Das Deletionsderivat mit dem längsten verbleibenden Enhancer-Fragment *Del6* (5-1487 / 3+965) führte zu einer mit dem *CLV3*-Reporter gen vergleichbaren *GUS*-Färbung, jedoch mit verminderter Expressionsstärke. Das Deletionsderivat *Del5* (5-1487 / 3+595) ergab in 35% der Embryonen und 49% der Keimlinge ein *GUS*-Signal nur in der L1, also nicht im wildtypischen *CLV3*-Muster. Für Deletionsderivat *Del4* (5-275 / 3+275) konnte keine *GUS*-Expression im SAM nachgewiesen werden; die Achselmeristeme wurden hier nicht analysiert. Auch für Deletionsderivat *Del7* (5-1487 / 3+0) fehlte die *GUS* Expres-

sion im SAM. In den Achselmeristemen hingegen konnte ein schwaches *GUS* Signal im wildtypischen Muster detektiert werden. Die Deletionsderivate *Del3x5* (5-286 / 3+595) und *Del3x4* (5-286 / 3+275) führten nicht zur *GUS* Expression.

Regulatorische Elemente im 5' gelegenen Bereich von *CLV3*

Anhand der Ergebnisse dieser *GUS*-Färbungen lassen sich bezüglich der Funktion einiger Bereiche der regulatorischen Sequenzen von *CLV3* mehrere Hypothesen erarbeiten. Zusammenfassend dargestellt sind diese Bereiche in Abb. 42. Demnach befindet sich im Bereich von -1487 und -1166 bp kein für die Expressionsstärke und das Expressionsmuster entscheidend wichtiges regulatorisches Element. Im Bereich zwischen -1166 und -746 bp aber könnte sich jedoch ein Repressorelement und im Bereich zwischen -746 und -286 bp ein Verstärkerelement befinden. Dafür spricht das mit der wildtypischen *CLV3*-Expression vergleichbare *GUS*-Signal in in *Del1*-Pflanzen. Deren Expression steht unter ausgewogener Kontrolle von je einem Repressor- und Verstärkerelement. In *Del2* hingegen wäre dann das Repressorelement deletiert und der verbleibende Verstärker zwischen -746 und -286 bp würde für eine verstärkte *GUS*-Expression sorgen.

Konform mit dieser Hypothese zeigten die transgenen Pflanzen mit Deletionsderivat *Del3*, in denen eben dieses Verstärkerelement zwischen -746 und -286 bp deletiert wurde, nur eine schwache *GUS*-Expression. Dieses *GUS*-Expressionsmuster entspricht dem *CLV3*-Expressionsmuster. Dieses Ergebnis legt nahe, daß für eine Etablierung des *CLV3*-Expressionsmusters in der zentralen Zone des Meristems der Bereich von -286 bp bis zum Translationsstart von *CLV3* zusammen mit dem 3' Enhancer ausreichend ist.

Regulatorische Elemente im 3' gelegenen Bereich von *CLV3*

Auch dem 3' von *CLV3* gelegenen Enhancer-Bereich können anhand der hier vorgenommenen *GUS*-Färbungen mögliche Funktionen zugeordnet werden. Ein allgemeines Enhancer-Element würde sich folglich zwischen 965 und 1256 bp nach dem translationalen Stopcodon von *CLV3* befinden (Abb. 42). Für diese Funktion spricht, daß das Deletionsderivat *Del6* zu einer schwachen *GUS*-Färbung im wildtypischen *CLV3* Muster führt.

Die Bereiche zwischen 965 und 595 bp sowie zwischen 595 und 275 bp nach dem translationalen Stop von *CLV3* enthalten den Färbungen nach zu urteilen, entscheidende regulatorische Elemente. Möglicherweise könnte sich im Bereich zwischen 965 und 595 bp eine tatsächliche *WUS*-Bindungsstelle befinden. Von den sechs anhand ihrer Sequenz identifizierten putativen *WUS*-Bindungsstellen (Lohmann et al., 2001) befinden sich zwei genau in diesem Bereich. Außerdem könnte sich im Bereich zwischen 595 und 275 bp ein Element befinden, das für die Kontrolle der *CLV3*-Expression in der L1 verantwortlich ist (Abb. 42). Diese Hypothese resultiert aus den Ergebnissen der Färbungen von *Del5* und *Del4*, die im folgenden erläutert werden sollen.

In transgenen Pflanzen mit Deletionsderivat *Del5* läßt sich *GUS*-Expression im Embryo nur noch in der L1 des SAM detektieren. Eine *WUS* abhängige Aktivierung bleibt wegen der Deletion der *WUS*-Bindungsstelle aus. Die Aktivierung von *GUS* und damit auch *CLV3* würde also nur in der L1 des SAM *WUS*-unabhängig über einen oder mehrere Faktoren erfolgen, die an der noch vorhandenen "L1-Box" im Bereich zwischen 595 und 275 bp binden können. Die fehlende *CLV3*-Expression in der L1 in *wus*-mutanten Embryonen könnte mit dem Fehlen der entsprechenden L1-Zellen erklärt werden, da dies in *Del5* transgenen Pflanzen nicht der Fall ist. In *wus*-Mutanten würde die L1-

spezifische Aktivierung also erst im Keimling stattfinden. Im transgenen *Del5*-Keimling war die *GUS*-Färbung genau wie *CLV3* im *wus*-mutanten Hintergrund in einer abgeflachten Domäne exprimiert. Im Keimling ist eine *GUS*-Färbung allerdings zellulär vergleichsweise weniger gut aufzulösen als im Embryo. Eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung im Infloreszenzmeristem detektiert *GUS* ebenfalls nur in der L1. Auch in Kap.3.5.2 wurde bereits die Hypothese aufgestellt, daß einer oder mehrere zusätzliche L1/L2-spezifische Faktoren neben *WUS* zur Aktivierung von *CLV3* notwendig sind. In transgenen *WUS-GR*-Pflanzen konnte eine Aktivierung der *CLV3*-Expression besonders stark in den äußeren Meristemschichten nachgewiesen werden. Das *WUS-GR*-Transgen wurde auch in *Del5*-transgenen Pflanzen analysiert. Hier konnte eine etwas schwächere *GUS*-Färbung in einer vergleichbaren Domäne der Achselmeristemen als in *Del6*-Pflanzen festgestellt werden. Da von den Pflanzen keine Schnitte vorliegen, bleibt unklar, ob die *GUS*-Färbung auf die L1 beschränkt ist oder ob auch tiefere Zellschichten der Meristeme *GUS* exprimieren.

Im Achselmeristem scheint die *GUS*-Expression in *Del5*-Pflanzen mit der von *CLV3* im wildtypischen wie auch im *wus*-mutanten Hintergrund vergleichbar zu sein. Darüberhinaus weisen *Del7*-transgene Pflanzen eine schwache *GUS*-Expression in den Achselmeristemen auf. Ebenso ist *CLV3* auch in wildtypischen wie in *wus*- und *stm*-mutanten Achselmeristemen stärker exprimiert als im SAM. Diese Hinweise lassen vermuten, daß *CLV3* Expression im SAM und in den Achselmeristemen nicht identisch kontrolliert wird. Möglicherweise ist für eine *CLV3*-Aktivierung in den Achselmeristemen der 5' von *CLV3* gelegene Promotor ausreichend.

In transgenen *Del4*-Pflanzen, die nur noch 275 bp nach dem translationalen Stopcodon von *CLV3* enthalten, fehlen die beschriebenen entscheidenden regulatorischen Elemente und damit auch die *GUS*-Expression vollständig.

Um detailliertere Aussagen zu den regulatorischen Elementen, die für Expressionstärke und -muster von *CLV3* verantwortlich sind, treffen zu können, sind weitere Analysen notwendig. In diesem Zusammenhang wären insbesondere die Fragen zu klären, ob das Promotorfragment bis -286 bp vor dem translationalen Start von *CLV3* tatsächlich für die Musterbildung verantwortlich ist und ob im Enhancer-Bereich tatsächlich eine L1-spezifische Box und eine *WUS*-Bindungsstelle enthalten sind.

5 Zusammenfassung

Das pflanzliche Sproßmeristem ist eine hochorganisierte Struktur, dessen Stammzellpopulation während der gesamten Lebensdauer der Pflanzen durch eine exakte Balance zwischen der Zellteilung in der zentralen Zone und der Zelldifferenzierung in der peripheren Zone aufrechterhalten werden muß. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von *CLAVATA3* bei der Regulation des Stammzellschicksals im Sproßmeristem von *Arabidopsis thaliana* näher charakterisiert werden.

Genfunktion von *CLV3*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion von *CLV3* analysiert. Die Analyse perikliner Chimären aus *clv3-7*-Mutanten mit einem instabil inserierten *En-1*-Tranposon lieferte einen indirekten Hinweis auf die nicht-zellautonome Wirkung des *CLV3*-Proteins im Meristem. Es konnten Chimären identifiziert werden, in denen die *CLV3*-Genfunktion ausschließlich in der L1, L2 oder L3 wiederhergestellt war, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung im gesamten Meristem aber wildtypisch kontrolliert wurde. Das deutet darauf hin, daß das *CLV3*-Protein nicht-zellautonom wirkt und von der äußeren Zelle in die tiefergelegene L3 zur *CLV1*-Rezeptorkinase sekretiert wird.

Mit Hilfe verschiedener Fehlexpressions-Experimente wurde dann untersucht, welchen Einfluß Intensität und Ort der *CLV3*-Expression auf die Kontrolle der meristematischen Aktivität haben. Es konnte gezeigt werden, daß die Meristeme in *35S::CLV3*- und *HisH4::CLV3*-transgenen Pflanzen frühzeitig terminieren. Darüberhinaus führt die ektopische Expression von *CLV3* zu einer starken Repression von *WUS* und - identisch zu *wus*-Mutanten - zum vorzeitigen Verlust der Stammzellen. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß die Anzahl der Stammzellen durch die Dosis an *CLV3* bestimmt wird. Während die Stammzellen in *clv*-Mutanten ohne funktionelles *CLV3*-Protein in der zentralen Zone akkumulieren, wird in Wildtypen die normale Anzahl aufrechterhalten. In *35S::CLV3*-Pflanzen hingegen gehen die Stammzellen unter dem Einfluß einer hohen Dosis an *CLV3*-Protein frühzeitig verloren.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß *CLV3* über den *CLV1/2*-Rezeptor wirkt und auch in der *UFO*-Domäne unterhalb seiner endogenen Domäne wirkt. Die Richtung des *CLV3*-Signals spielt folglich keine Rolle.

Weitere Experimente ergaben, daß eine Erhöhung der *CLV3*-Gendosis keine Auswirkung auf das Stammzellschicksal im Meristem hat. Zudem war in *UFO::CLV3*-transgenen Pflanzen die endogene *CLV3*-Expression reprimiert bzw. nicht mehr detektierbar. Beide Ergebnisse deuten auf einen negativen Feedback-Regulationsmechanismus zwischen den *CLV*-Genen und *WUS* hin, bei dem *CLV3* den *CLV1/2*-Rezeptor aktiviert und so die Repression von *WUS* in den tieferen Schichten des Meristems bewirkt. Das Gen *WUS* wiederums fördert Stammzellschicksal und damit auch die Expression von *CLV3*. In *clv*-Mutanten ist der *CLV*-Signaltransduktionsweg nicht funktionell und *WUS* wird nicht reprimiert. Es kommt zur Akkumulation von Stammzellen in der zentralen Zone des Meristems und zur starken *CLV3*-Expression in diesen Zellen. Eine Erhöhung des *CLV3*-Signals in transgenen Pflanzen bewirkt eine verstärkte Repression von *WUS* und damit den Verlust von Stammzellen, wie dies auch in *wus*-Mutanten der Fall ist.

Regulation der *CLV3*-Expression durch meristemspezifische Gene

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Expressionsstudien in amorphen und neomorphen Mutanten durchgeführt, um den Einfluß verschiedener meristemspezifischer Gene auf die Regulation der *CLV3*-Expression zu untersuchen. Es konnte ein *CLV3*-Reportergen etabliert werden, das die regulatorischen Sequenzen enthält, die für das Expressionsmuster und die Expressionsstärke von *CLV3* verantwortlich sind.

In der Embryogenese ist die *CLV3*-Expression von *WUS*-Aktivität abhängig, während in späteren Entwicklungsstadien *CLV3* unabhängig von *WUS* aktiviert wird. *WUS* ist dann nur für die Regulation der Expressionsstärke des *CLV3*-Signals verantwortlich. Die Expressionsstudien ergaben weiterhin, daß *WUS* nicht hinreichend ist, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren. Ein verstärktes *CLV3*-Signal konnte nur im meristematischen Kontext, dort besonders in den äußeren Zellschichten nachgewiesen werden. Das Ergebnis legt nahe, daß ein oder mehrere zusätzliche Faktoren zur *CLV3*-Aktivierung notwendig sind.

Es konnte gezeigt werden, daß *STM* weder in der Embryogenese noch in späteren Entwicklungsstadien zur Aktivierung der *CLV3*-Expression notwendig ist, sondern diese nur verstärkt. Ektopisch exprimiertes *STM* ist ebenfalls nicht hinreichend, um *CLV3*-Expression in der gesamten Pflanze zu aktivieren. Dagegen führte die Koexpression von *WUS-GR* und *STM-GR* zu einer schwachen *CLV3*-Expression in jungen Blättern.

Ein Einfluß der Gene *CUC1/CUC2*, *MGO1* und *MGO2*, *PHB* und *ASI* auf die Regulation von *CLV3*-Expression konnte nicht festgestellt werden. Das Gen *PNH* dagegen ist während der Embryogenese für die Aktivierung von *CLV3* notwendig, verliert diese Funktion in der späteren Entwicklung und die *CLV3*-Aktivierung in den Adventivmeristemen erfolgt *PNH* unabhängig.

Regulation von *CLV3* durch eigene regulatorische Sequenzen

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die regulatorischen Sequenzen von *CLV3* mit Hilfe von Deletionsderivaten näher analysiert. Hierzu wurden Fragmente aus dem 5' und dem 3' von *CLV3* gelegenen Bereich deletiert. Die Ergebnisse der GUS-Färbungen der einzelnen Deletionsderivate legen nahe, daß sich im 5' von *CLV3* gelegenen Bereich ein Repressor- und ein Verstärkerelement befinden und dort die Musterbildung erfolgt. Im 3' von *CLV3* gelegenen Bereich liegen möglicherweise ein verstärkendes Element, eine *WUS*-Bindungsstelle sowie ein Kontrollelement für L1-Expression. Damit hat der 3' von *CLV3* gelegenen Bereich entscheidene regulatorische Funktionen.

6 Literatur

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

Aida, M., Ishida, T. and Tasaka, M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* **126**, 1563-70.

Asubel, F., et al. (Hrsg. 1996). Current protocols in molecular biology. John Wiley & sons. New York.

Barton, M. K. a. P., R.S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and *SHOOT MERISTEMLESS* mutant. *Development* **119**, 823-831.

Bechtold, N. and Pelletier, G. (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**, 259-66.

Blau, H. M., Brazelton, T. R. and Weimann, J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**, 829-41.

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C. (1998). *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *Embo J* **17**, 170-80.

Bowman, J. L., Drews, G. N. and Meyerowitz, E. M. (1991). Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell* **3**, 749-58.

Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. and Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* **289**, 617-9.

Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M. and Simon, R. (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 565-75.

Busch, M. A., Bomblies, K. and Weigel, D. (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 585-7.

Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R. A. (2000). *ASYMMETRIC LEAVES1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-71.

Carpenter, R. and Coen, E. S. (1995). Transposon induced chimeras show that *floricaula*, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. *Development* **121**, 19-26.

Chuck, G., Lincoln, C. and Hake, S. (1996). *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**, 1277-89.

- Clark, S. E., Running, M.P., Meyerowitz, E.M.** (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.
- Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. and Meyerowitz, E. M.** (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-75.
- Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M.** (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.
- Clark, S. E., Williams, R. W. and Meyerowitz, E. M.** (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-85.
- Cock, J. M. and McCormick, S.** (2001). A large family of genes that share homology with *CLAVATA3*. *Plant Physiol* **126**, 939-42.
- Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-7.
- Coen, E. S., Romero, J. M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. and Carpenter, R.** (1990). *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell* **63**, 1311-22.
- Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D. and Lin, H.** (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* **12**, 3715-27.
- Dermen, H. a. S., R.N.** (1973). Ontogenetic study of floral organs of peach (*Prunus persica*) utilizing cytohimeral plants. *Amer. J. Bot.* **60**, 283-291.
- Doyle, J.J. und Doyle, J.L.** (1987). Rapid DNA-isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**, 11-15.
- Elliott, R. C., Betzner, A. S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W. Q., Gerentes, D., Perez, P. and Smyth, D. R.** (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-68.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and Laux, T.** (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* **10**, 967-79.
- Eshed, Y., Baum, S. F. and Bowman, J. L.** (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**, 199-209.
- Eshed, Y., Baum, S. F., Perea, J. V. and Bowman, J. L.** (2001). Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr Biol* **11**, 1251-60.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-4.

- Gallois, J. L., Woodward, C., Reddy, G. V. and Sablowski, R.** (2002). Combined *SHOOT MER-ISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 3207-17.
- Gisel, A., Barella, S., Hempel, F. D. and Zambryski, P. C.** (1999). Temporal and spatial regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Development* **126**, 1879-89.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J.** (2001). *ARGONAUTE2*, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-50.
- Hantke, S. S., Carpenter, R. and Coen, E. S.** (1995). Expression of floricaula in single cell layers of periclinal chimeras activates downstream homeotic genes in all layers of floral meristems. *Development* **121**, 27-35.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-32.
- Hirt, H.** (1997). Multiple roles of MAP kinases in signal transduction in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 11-15.
- Holmes, D. S. and Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193-7.
- Ishiguro, S., Watanabe, Y., Ito, N., Nonaka, H., Takeda, N., Sakai, T., Kanaya, H. and Okada, K.** (2002). *SHEPHERD* is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *Embo J* **21**, 898-908.
- Jackson, D. P.** (1991). In situ hybridisation in plants. In: *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E. and Clark, S. E.** (1999). The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-34.
- Jürgens, G., Torres-Ruiz, R.A., Laux, T., Mayer, T., Berleth, T.** (1994). Early events in apical-basal pattern formation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology: Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*, 95-103.
- Kayes, J. M. and Clark, S. E.** (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843-51.
- Kerstetter, R. A., Bollman, K., Taylor, R. A., Bomblied, K. and Poethig, R. S.** (2001). *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* **411**, 706-9.
- Laufs, P., Dockx, J., Kronenberger, J. and Traas, J.** (1998). *MGOUN1* and *MGOUN2*: two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 1253-60.

- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K. and Traas, J.** (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1375-90.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. and Jurgens, G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. and Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805-14.
- Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T.** (2002). The *WUSCHEL* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* **129**, 3195-206.
- Leyser, H. M. O. a. F., I.J.** (1992). Charakterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*., *Development* **116**, 397-403.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. and Hake, S.** (1994). A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**, 1859-76.
- Lloyd, A. M., Schena, M., Walbot, V. and Davis, R. W.** (1994). Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**, 436-9.
- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R. and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J. A. and Barton, M. K.** (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3027-35.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. and Barton, M. K.** (1996). A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-9.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P. and Barton, M. K.** (1999). The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**, 469-81.
- Mathur, J. and Koncz, C.** (1996). PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. Methods in Molecular Biology. *Arabidopsis Protocols*. **82**, 267-276.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-15.
- McConnell, J. R. and Barton, M. K.** (1998). Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 2935-42.
- McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M. K.** (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**, 709-13.
- McConnell, J. R. and Barton, M.K.** (1995). Effects of mutations in the *PINHEAD* gene of *Arabidopsis* on the formation of shoot apical meristems. *Dev Genet* **16**, 358-366.

- Moore, I., Galweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J. and Palme, K.** (1998). A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 376-81.
- Morrison, S. J., Shah, N. M. and Anderson, D. J.** (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**, 287-98.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G. and Laux, T.** (1998). Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *Embo J* **17**, 1799-809.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L. and Hake, S.** (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523-32.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M. A., Lee, I. and Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-6.
- Ponting, C. P. and Aravind, L.** (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 130-2.
- Rinne, P. L. and van der Schoot, C.** (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* **125**, 1477-85.
- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V. and Fletcher, J. C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969-77.
- Running, M. P., Clark, S. E. and Meyerowitz, E. M.** (1995). Confocal microscopy of the shoot apex. *Methods Cell Biol* **49**, 217-29.
- Satina, S., Blakeslee, A.F., and Avery, A.G.** (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.* **27**, 895-905.
- Satina, S. and Blakeslee, A.F.** (1941). Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development of leaf and flower. *Amer. J. Bot.* **28**, 862-871.
- Satina, S. and Blakeslee, A.F.** (1943). Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development of the carpel. *Amer. J. Bot.* **30**, 453-462.
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene size controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jurgens, G. and Laux, T.** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-44.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C. and Machida, Y.** (2001). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-83.

- Serikawa, K. A., Martinez-Laborda, A. and Zambryski, P.** (1996). Three *knotted1*-like homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **32**, 673-83.
- Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G. and Ruberti, I.** (1998). The *Arabidopsis* Athb-8, -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related HD-ZIP proteins. *Plant Mol Biol* **38**, 609-22.
- Sessions, A., Yanofsky, M. F. and Weigel, D.** (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors *LEAFY* and *APETALAI*. *Science* **289**, 779-82.
- Sieburth, L. E. and Meyerowitz, E. M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-65.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J. and Koes, R.** (1996). The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159-70.
- Steeves, T.A. and Sussex, I.M.** (1989). Patterns in Plant Development. (New York: Cambridge University Press), 895-905.
- Stewart, R. N. a. B.** (1970). Independence of tissue derived from apical layers in ontogeny of the tobacco leaf and ovary. *Amer. J. Bot.* **57**, 1010-1016.
- Stone, J. M., Trotochaud, A. E., Walker, J. C. and Clark, S. E.** (1998). Control of meristem development by *CLAVATAI* receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol* **117**, 1217-25.
- Sussex, I. M.** (1955). Morphogenesis in *Solanum tuberosum* L.: Experimental investigation of leaf dorsoventrality and orientation in the juvenile shoot. *Phytomorphology* **5**, 286-300.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. and Tasaka, M.** (2001). The *CUP SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-35.
- Tilney-Bassett, R. A. E.** (1986). Plant Chimeras. Arnold, London.
- Trotochaud, A. E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. and Clark, S. E.** (1999). The *CLAVATAI* receptor-like kinase requires *CLAVATA3* for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-406.
- Trotochaud, A. E., Jeong, S. and Clark, S. E.** (2000). *CLAVATA3*, a multimeric ligand for the *CLAVATAI* receptor-kinase. *Science* **289**, 613-7.
- Überlacker, B., Klinge, B. and Werr, W.** (1996). Ectopic expression of the maize homeobox genes *ZmHox1a* or *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* **8**, 349-62.
- Vaughan, J. G.** (1952). Structure of the angiosperm apex. *Nature* **169**, 458-459.
- Watt, F. M. and Hogan, B. L.** (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-30.
- Weigel, D. and Jurgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-4.

Williams, R. W. (1998). Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif. *Bioessays* **20**, 280-2.

Williams, R. W., Wilson, J. M. and Meyerowitz, E. M. (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis CLAVATA1* signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10467-72.

Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A. and Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-9.

Yu, L. P., Simon, E. J., Trotochaud, A. E. and Clark, S. E. (2000). *POLTERGEIST* functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development* **127**, 1661-70.

Zou, C., Zhang, Z., Wu, S. and Osterman, J. C. (1998). Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. *Gene* **211**, 187-94.

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. W. Werr betreut worden.

Abstract

The shoot apical meristem of higher plants as a well organized structure has to maintain the stem cell population during plant life by keeping the balance between cell proliferation in the central zone and cell differentiation in the peripheral zone. The *CLV3* gene of *Arabidopsis* has an important role in controlling stem cell fate.

Gene function of *CLV3*

The function of *CLV3* has been analysed in the first part of this study. The analysis of periclinal chimeras derived from unstable *En-1* induced *clv3-7* mutants provides an indirect hint on the non cell-autonomous effect of the *CLV3* protein in the meristem. Chimeras were identified with *CLV3* activity only in layer L1, L2 or L3; however, these chimeras could control stem cell proliferation and cell differentiation in a wildtypic manner. This indicates that *CLV3* may act non-cell-autonomously as a secreted protein that activates the *CLV1* receptor kinase in the deeper L3.

The influence of intensity and location of *CLV3* expression on the control of the meristematic activity has been analysed by misexpression experiments. It could be shown that meristems of *35S::CLV3* and *HisH4::CLV3* transgenic plants terminated development prematurely. Ectopic expression of *CLV3* results in a strong repression of *WUS* and, similar to *wus* mutants, in a premature loss of stem cells. The number of stem cells is restricted by the dosage of *CLV3*: in *clv3* mutants (lacking a functional *CLV3* protein), stem cells accumulated in the central zone; in the wildtype, the normal stem cell population is maintained; in *35S::CLV3* and *HisH4::CLV3* transgenic plants, stem cells are lost.

It has been shown that *CLV3* signalling requires a functional *CLV1/2* receptor complex, and that *CLV3* can also act from the UFO domain underneath its endogenous domain. This indicates that the direction of *CLV3* signalling is not important.

Extra copies of the genomic sequence of *CLV3* have no effect on the stem cell fate in the meristem. Furthermore, in *UFO::CLV3* transgenic plants, the *CLV3* expression from its own promoter was repressed or not detectable. Both results propose a negative feedback loop regulated by the *CLV* genes and *WUS*: *CLV3* activates the *CLV1/2* receptor complex, resulting in the repression of *WUS* in the deeper cell layers of the meristem. *WUS* in turn promotes stem cell fate and expression of *CLV3*. In *clv* mutants, the *CLV* signal transduction pathway is not functional and *WUS* is not repressed. Stem cells accumulate in the central zone of the meristem and *CLV3* is strongly expressed those cells. A higher level of the *CLV3* signal in transgenic plants leads to the strong repression of *WUS* and the loss of stem cells, which is also observed in *wus* mutants.

Regulation of *CLV3* by meristem specific genes

In the second part of this study, *CLV3* expression was studied in a range of amorphic and neomorphic mutants to analyse the influence of different meristem regulatory genes on the expression of *CLV3*. A *CLV3* reporter gene was established which comprises the regulatory sequences responsible for *CLV3* expression.

During embryogenesis, *CLV3* expression depends on *WUS* activity. In later developmental stages, *CLV3* expression is more and more independent of *WUS*. Then, *WUS* is only responsible for controlling the strength of *CLV3* expression. *35S::WUS-GR* is not sufficient to activate *CLV3* expression in

the entire plant. *CLV3* is strongly activated in a meristematic context, especially in the outer cell layers. This indicates that one or more additional factors could be necessary for *CLV3* activation.

It has been shown that *STM* is not necessary to activate *CLV3* neither during embryogenesis nor during later developmental stages, but enhances *CLV3* expression. Ectopically expressed *STM-GR* is not sufficient to activate *CLV3* expression in the whole plant. Coexpression of *WUS-GR* and *STM-GR* leads to a weak expression of *CLV3* in young leaves.

The gene *PNH* is necessary to activate *CLV3* expression during embryogenesis. In adventitious meristems during later developmental stages *CLV3* is activated independently of *PNH*. However, none of the other genes tested (*CUC1* and *CUC2*, *MGO1* and *MGO2*, *PHB* and *ASK*) appear to control *CLV3* expression.

Regulation of *CLV3* by its own regulatory sequences

The regulatory sequences of *CLV3* have been analysed with deletion constructs in the third part of this study. Starting from the initial *CLV3::GUS* reporter construct, fragments of the 5' and 3' region of *CLV3* were deleted. The results of the GUS staining experiments indicate that a silencer and an enhancer element are located in the 5' region of *CLV3*. The expression pattern of *CLV3* is controlled by 286 bp element in this 5' region. Further studies showed that an enhancer element, a putative *WUS* binding site and an element which controls *CLV3* expression in L1 are located in the 3' region of *CLV3*. Therefore, the 3' region of *CLV3* has important regulatory functions.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 12.09.1969 in Köln

Schulausbildung

1976 – 1980

Grundschule Gerderath

1980 - 1989

Cusanus-Gymnasium Erkelenz

5/89

Abitur

Freiwilliges soziales Jahr

9/89 - 8/90

Pflegedienst im Marien-Hospital in Düren-Birkesdorf

Hochschulausbildung

10/90 - 2/97

Studium der Biologie (Dipl.) an der RWTH Aachen-
Diplomprüfungen: Ökologie/Ökotoxikologie, Mikrobiologie,
Biochemie der Pflanzen und Siedlungswasserwirtschaft
(Fakultät für Bauingenieurwesen)

Diplomarbeit am Institut für Biologie V der RWTH Aachen
unter Anleitung von Prof. Dr. I. Schuphan; Titel:
„Untersuchungen zur Diversität in italienischen Wildpopulationen
von *Beta vulgaris* (L.) subsp. *maritima*“ - Ein Beitrag zur
ökologischen Risikoabschätzung von transgenen Kulturpflanzen;
Abschluß Februar 1997

3/97 – 1/98

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Biologie V
der RWTH Aachen

2/98 – 11/02

Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für
Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln unter Anleitung von
Prof. Dr. W. Werr; Titel: Zur Rolle von *CLAVATA3* bei der
Regulation des Stammzellschicksals im Sproßmeristem von
Arabidopsis thaliana