

Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente im
DORNRÖSCHEN-LIKE (DRNL)-Promotor und
Etablierung eines Systems zur Visualisierung des
Schicksals *DRNL*-markierter Gründerzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von
Dorothea Glowa
aus Peiskretscham

Köln 2018

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Werr

PD. Dr. John W. Chandler

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2018

1. Einleitung	10
1.1 Pflanzliche Entwicklung	10
1.2 Embryogenese	10
1.3 Das Sprossapikalmeristem: Aufbau und Stammzell-Homöostase	12
1.4 Organogenese	14
1.5 Die Brassicaceenblüte	15
1.6 <i>DORNRÖSCHEN-LIKE (DRNL)</i>	16
1.7 klonale Analysen	19
1.8 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Laborgeräte	22
2.1.2 Molekularbiologische Kits	23
2.1.3 Enzyme	23
2.1.4 DNA-Marker	24
2.1.5 Chemikalien	24
2.1.6 Puffer und Lösungen	24
2.1.7 Medien	25
2.1.8 Antibiotika	26
2.1.9 Vektoren	26
2.1.10 Bakterienstämme	27
2.1.11 Pflanzenmaterial	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1 PCR	28
2.2.1.2 Mutagenese mit Hilfe einer „inversen“ PCR	29
2.2.1.3 Genotypisierung von Pflanzen	30
2.2.2 Nukleinsäure-Gelelektrophorese	30
2.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	30
2.2.4 Plasmid-Minipräparation	30
2.2.5 Restriktionsverdau von DNA	31
2.2.6 DNA-Sequenzierung	31
2.2.7 T4-Ligase-basiertes Klonieren	31
2.3. Modifikationen des <i>DRNL</i> -Promotors	31

2.4 Klonale Analysen	32
2.5 Genetische Ablationen	34
2.6 Arbeiten mit Bakterien	35
2.6.1 Transformation von <i>E. coli</i>	35
2.6.2 Kultur von <i>E. coli</i>	36
2.6.3 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	36
2.6.4 Kultur von <i>A. tumefaciens</i>	36
2.7 Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.7.1 Kultur	37
2.7.2 Transformation	37
2.7.3 Doppel-Transformation	37
2.7.4 Kreuzung von Pflanzen	37
2.7.5 Selektion und Anzucht transgener Pflanzen	37
2.7.6 Induktion transgener Pflanzen mit Dexamethason	38
2.8 GUS-Färbung	38
2.9 Mikroskopie und Dokumentation	38
2.10 Photodokumentation	38
2.11 Phylogenetische Analysen	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Phylogenetische Analysen des <i>DRNL</i> Promotors	40
3.1.2 Struktur und Aufbau der <i>Enhancer</i> Elemente im Detail	41
3.1.3 Zusammenfassung	44
3.2 Identifizierung cis-regulatorischer Elemente mit Hilfe von Promotordeletionen	45
3.2.1 Externe <i>DRNL</i> -Promotordeletionen belegen die Präsenz von drei <i>Enhancer</i> Elementen	45
3.2.2 Interne Deletionen belegen Interaktionen zwischen den <i>Enhancern</i>	48
3.2.3 Rettungsexperimente	50
3.2.4 Einführung von Punktmutationen in die <i>Enhancer</i>	53
3.2.5 Die Rolle von <i>En2</i> bei der Expression im Embryo	56
3.2.6 Die Rolle von <i>En3</i> bei der Expression im Embryo	58
3.2.7 Die drei <i>Enhancer</i> reichen aus, um das wildtypische <i>DRNL</i> Expressionsmuster im IM abzubilden, nicht aber im Embryo	59
3.2.8 Expression von <i>DRNL::GFP</i> in der Mutante <i>mps319</i>	59
3.3 Etablierung eines Systems zur klonalen Markierung <i>DRNL</i> -exprimierender Zellen	63

3.3.1 Pflanzen mit <i>DRNLpOpCre</i> -Treiber zeigen eine Dex-induzierbare Cre-abhängige Rekombination	63
3.3.2 Häufigkeit der von Sektoren betroffenen Organe	65
3.3.3 Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Dex-Behandlung und dem Entwicklungszustand der Blüten	66
3.3.4 Muster der klonalen Sektoren in blattartigen Organen	67
3.3.5 Muster der klonalen Sektoren in Blütenorganen	69
3.3.6 Das Muster der klonalen Sektoren ist Promotor-abhängig	75
3.3.7 Zusammenfassung <i>GR-LhG4/popCre</i> -Treiber	77
3.4 Genetische Ablation <i>DRNL</i> exprimierender Zellen	77
3.4.1 Die Dex-Applikation 3 Tage alter Keimlinge führt zu Defekten in Blättern und der Phyllotaxis	77
3.4.2 Die Dex-Applikation drei Wochen alter Pflanzen hat Auswirkungen auf den Blütenphänotyp	78
4. Diskussion	81
4.1.1 Beiträge der <i>DRNL</i> -Promotorelemente	81
4.1.2 Die <i>Enhancer</i> Elemente sind evolutionär konserviert	83
4.1.3 Integration des Auxinsignalwegs	84
4.1.4 Weiterreichende Analyse von <i>En2</i>	88
4.2 Klonale Analysen	93
4.2.1 Häufigkeit angefärbter Organe	93
4.2.2 In blattartigen Organen ist <i>DRNL</i> überwiegend in den Hydathoden aktiv	94
4.2.3 Klonale Sektoren der Blütenorgane	96
4.2.4 Zellen, in denen der <i>DR5</i> -Promotor aktiv ist, haben ein anderes Schicksal als von <i>DRNL</i> -markierte Zellen	98
4.3 Genetische Ablation	99
4.4 Fazit	100
5. Anhang	101
5.1 Vektorkarten	101
5.2 Primerlisten	103
5.2.1 Promotordeletionskonstrukte	103
5.2.1 Konstrukte für klonale Analysen und genetische Ablationen	107
5.3 Sonstige Primer	109
5.3 JASPAR-Datenbankanalyse	110

Inhaltsverzeichnis

5.4 Bilateraler Vergleich der <i>DRNL</i> -Promotoren von <i>A. thaliana</i> und <i>A. arabicum</i>	118
6. Quellen	120
Erklärung	131

Kurzzusammenfassung

Die dynamische Transkription des *DORNRÖSCHEN-LIKE* Promotors markiert Organgründerzellen während der Entwicklung von *Arabidopsis*, von den Kotyledonen und den Blättern bis zu den Blüten und den einzelnen Blütenorganen. Im Infloreszenzapex bildet *DRNL::GFP* die Phyllotaxis ab. Seine Aktivität lässt sich in den Gründerzellen aller Blütenorgane der vier Wirtel, beginnend mit dem äußersten Wirtel, in einer spezifischen Reihenfolge detektieren. Mit Hilfe phylogenetischer Analysen und Promotordeletionskonstrukten wurden vier *cis*-regulatorische Elemente im *DRNL*-Promotor identifiziert, die redundant oder synergistisch die dynamische *DRNL*-Transkription steuern und auf unterschiedliche Weise den Auxin-Signalweg in die Expression integrieren. Die vier Elemente sind innerhalb der Brassicaceen hoch konserviert, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass sich an ihnen mehrere Transkriptionsfaktoren, einschließlich *auxin response factors*, zu einem größeren Proteinkomplex assemblieren. Die Anordnung der vier Elemente ist ebenfalls konserviert. Diese mikrosyntäne Region findet sich auch in der Schwester-Familie der Brassicaceen, den Cleomaceen. Eine klonale Analyse von Zellen, in denen der *DRNL*-Promotors aktiv war, unterstützt die Annahme, dass *DRNL* ein Marker lateraler Organgründerzellen ist. Die klonalen Sektoren der einzelnen Organe unterscheiden sich zwar in ihrer Beschaffenheit, was sich jedoch mit dem Expressionsmuster von *DRNL* und unterschiedlichen morphogenetischen Programmen in den einzelnen Organen erklären lässt. Die Sektoren in Rosettenblättern zeigen, dass *DRNL* in der SAM-Peripherie möglicherweise nur einen Teil der Gründerzellen markiert. Gehäuft waren vaskuläre Gewebe von klonalen Sektoren betroffen, was den Schluss nahe legt, dass *DRNL* auch eine Funktion in der Entwicklung der Provaskulatur hat. Das Schicksal von Zellen in denen der kanonische Auxinsignalweg aktiv ist, markiert durch die Aktivität des *DR5*-Promotors, ist unterschiedlich und zeigt, dass der kanonische Auxinsignalweg eine untergeordnete Rolle bei der Rekrutierung von Organgründerzellen spielt.

Abstract

The dynamic transcription of the *DORNRÖSCHEN-LIKE* promoter marks lateral organ founder cells throughout the *Arabidopsis* development, in the cotyledons and leaves, and in flowers and all floral organs. In inflorescence apices *DRNL::GFP* depicts phyllotaxis and marks floral organs of all four whorls within the floral meristem in a specific sequence beginning with the outer whorl. In an approach that combined phylogenetic and promoter-deletion analyses four *cis*-regulatory sequences in the *DRNL*-promoter were identified, which synergistically and redundantly control dynamic *DRNL* expression and differentially integrate the auxin response. The four *cis*-enhancer elements are conserved among the Brassicaceae, which suggests a high conservation of densely packed *cis*-regulatory elements that recruit transcription factors, including auxin response factors, into higher-order protein complexes. The spatial order of the enhancer elements is also conserved and this microsyntenic region is also present in the Brassicacea sister family, the Cleomaceae. Clonal analysis of *DRNL*-expressing cells confirms that *DRNL* marks lateral organ founder cells. The clonal sectors differ in size and shape, which is consistent with *DRNL* expression and morphogenetic programmes in the different organs. Sectors in rosette leaves suggest that *DRNL* activity marks only a sub-set of founder cells in the shoot apical meristem periphery. Clonal sectors were often found in vascular tissue, suggesting that *DRNL* might play a role in provascular development. Clonal sectors derived from the activity of the *DR5* promoter suggest that the canonical auxin response play a minor role, if at all, in the specification of lateral organ founder cells.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
35S	35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ARF	englisch: Auxin Response Factor
AuxRE	englisch: Auxin Response Element
CER	englisch: Cerulean Fluorescent Protein
Col-0	<i>Arabidopsis</i> Ökotype Columbia-0
Dex	Dexamethason
DNA	englisch Desoxyribonucleic Acid
DRN	DORNRÖSCHEN
DRNL	DORNRÖSCHEN-LIKE
DT-A	Diphtherietoxin A
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FM	Florales Meristem (Blütenmeristem)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	englisch: Green Fluorescent Protein
GR	Hormon-bindende Domäne des Glucocorticoid Rezeptors
GUS	β-Glucoronidase
IM	Infloreszenzmeristem
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
PCR	englisch: Polymerase Chain Reaction
SAM	Sprossapikalmeristem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Pflanzliche Entwicklung

Die vegetative Entwicklungsphase von Pflanzen beginnt mit der befruchteten Eizelle, führt über die Embryogenese und die post-embryonale Entwicklung adulter Pflanze zur Blütenbildung, Befruchtung und schließlich wieder zur Embryogenese. Postembryonal können Pflanzen diverse Zelltypen generieren, die ihren Ursprung in kleinen Gruppen von Stammzellen, sogenannter Meristeme, haben. Bereits während der Embryogenese werden dabei das Wurzelmeristem, die Quelle aller unterirdischer Pflanzenteile, und das Sprossapikalmeristem (SAM), die Quelle aller oberirdischer Pflanzenteile, ausgenommen des Hypokotyls und der Keimblätter, angelegt. Diese Meristeme erlauben es den Pflanzen in ihrer gesamten post-embryonalen Wachstumsphase eine Vielzahl lateraler Organe zu bilden.

Das SAM produziert an seiner Peripherie kontinuierlich neue Zellen, die sich schrittweise zu neuen Organen differenzieren. Noch ist wenig bekannt über die frühesten Vorgänge der Organogenese an der Peripherie des SAM, die zur Rekrutierung und Spezifikation von Organgründerzellen führen, da früh agierende Komponenten von Signalnetzwerken, die Positionsinformationen in der Meristemperipherie perzipieren, weitestgehend unbekannt sind.

1.2 Embryogenese

Die Embryonalentwicklung führt von der Zygote über das Oktandenstadium, das globuläre Stadium, das Herzstadium und das Torpedostadium schließlich zum Krückstockstadium, welches den reifen Embryo darstellt (Abb. 1). Bereits während der Embryonalentwicklung wird die Körperorganisation der adulten Pflanze in ihren Grundzügen etabliert. In der Embryogenese gibt es drei entscheidende Phasen. Bereits am Anfang, wenn die Zygote ihre erste asymmetrische Teilung vollzieht, die in einer kleineren apikalen und einer größeren basalen Zelle resultiert, werden Spross- und Wurzelpol der zukünftigen Pflanze definiert. Aus der apikalen Zelle wird der größte Teil des Embryos und damit der gesamten zukünftigen Pflanze entstehen. Die basale Zelle teilt sich dagegen mehrere Male horizontal und bildet einen filamentösen Suspensor, der den Embryo im maternalen Gewebe verankert. Nur die oberste Zelle des Suspensors trägt zum Embryo bei und entwickelt sich zur Hypophyse aus der das Wurzelmeristem hervorgeht. Die zweite wichtige Phase ist der Übergang vom Oktandenstadium zum Kugelstadium, da in diesem Schritt die drei für *Arabidopsis* charakteristischen Gewebeschichten L1, L2, L3 (engl. *layer*) angelegt werden.

In der dritten Phase, beim Übergang vom globulären Stadium zum Herzstadium, findet eine laterale Differenzierung des Embryos statt. Als erste Organe der Pflanze werden die Kotyledonen angelegt und fangen an auszuwachsen. In diesem Stadium werden auch das Sprossapikalmeristem und das Wurzelmeristem etabliert. Am Ende der Entwicklung liegt der Embryo in der typischen krückstockartigen Krümmung vor (Laux & Jürgens, 1997, Capron et al., 2009).

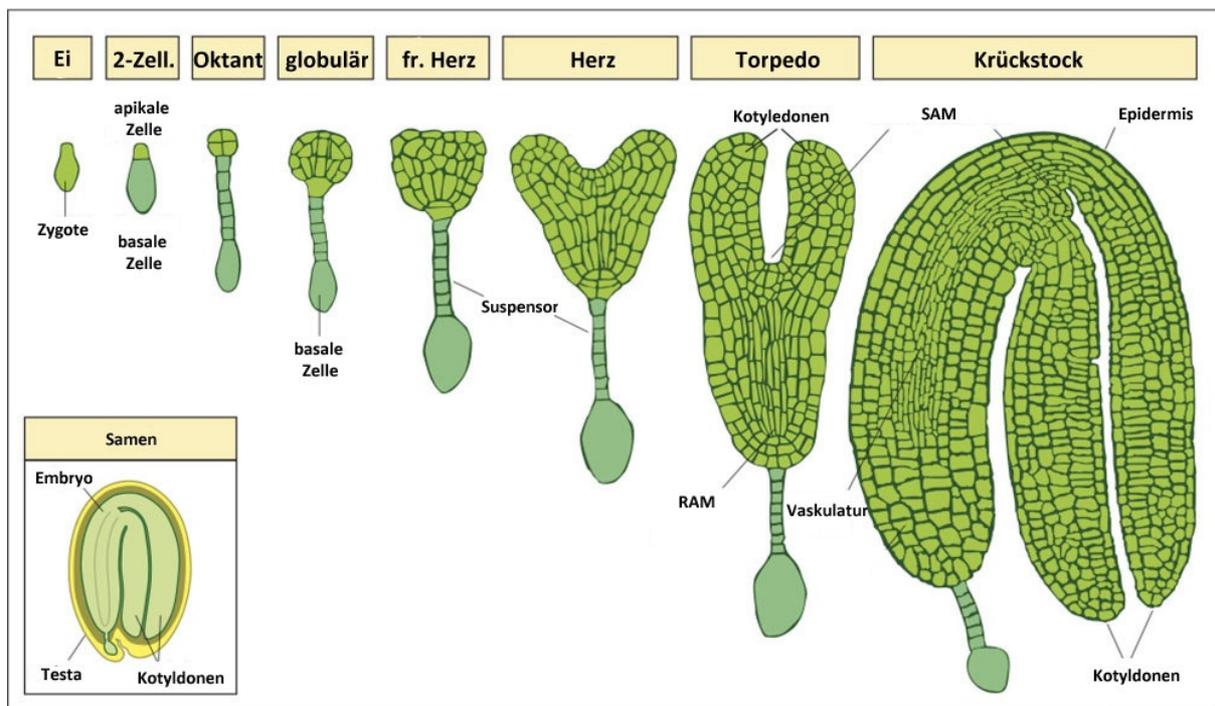


Abb. 1: Stadien der Embryonalentwicklung bei *Arabidopsis*
(<http://botanystudies.com/fertilization-in-angiosperms/>)

In bestimmten Geweben sind Konzentrationsmaxima des Hormons Auxin bei vielen Entwicklungsprozesse eine Voraussetzung (Cheng et al., 2007, Chandler 2008). Auf transkriptioneller Ebene reguliert das Hormon die Expression von Genen durch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der AUXIN-RESPONS-FACTOR-Familie (ARF) negativ oder positiv, indem ARFs ein Kernmotiv in den Promotoren Auxin-regulierter Gene, genannt Auxin-responsive Elemente (AuxRE), binden und so die Transkription steuern (Rademacher et al., 2012, Guilfoyle & Hagen, 2007, Wang & Estelle, 2014). Ursprünglich wurde das kanonische Motiv TGTCTC als Bindemotiv identifiziert (Tiwari et al., 2003). Eine neunfache Wiederholung des kanonischen Motivs ist Bestandteil des synthetischen *DR5*-Auxin-Monitors (Ulmasov et al., 1997).

Die Auxin-Maxima in Geweben entstehen überwiegend durch den Zell zu Zell-Transport des Hormons mit Hilfe von Influx- und Efflux-Proteinen (Křeček et al., 2009, Petrášek & Friml, 2009), welche als Plasmamembran-durchquerende Proteine in der Lage sind aktiv

Auxinmoleküle in die Zelle (Influx) bzw. aus der Zelle (Efflux) zu schleusen. Direkt nach der ersten Teilung der Zygote wird Auxin, hauptsächlich mit Hilfe der PIN-Proteine, in der apikalen Zelle des Embryos angereichert (Friml et al., 2003, Jennik & Barton, 2005). Im globulären Stadium werden die PIN-Proteine neu arrangiert, so dass der Auxinstrom umgekehrt wird und es zur Anreicherung des Hormons in der obersten Zelle des Suspensors kommt. Dies steht im Zusammenhang mit der Spezifikation der Suspensorzelle zur Wurzelmeristemgründerzelle (Friml et al., 2003, Jennik et al., 2007). Die Auxinantwort im Embryo wird hauptsächlich vom Transkriptionsfaktor MONOPTEROS (MP alias ARF5) und seinem Inhibitor BODENLOS (BDL alias IAA12), vermittelt (Haman et al., 2002, Weijers et al., 2006). In Abwesenheit von Auxin verhindert BDL die Aktivierung von Zielgenen durch MP. Die Akkumulation von Auxin führt hingegen zum Abbau von BDL und in Folge dessen zur Freisetzung von ARF5/MP (Haman et al., 2002). Funktionsverlustmutanten in *mp* zeigen daher ähnliche Defekte, z.B. Keimlinge ohne Wurzel oder mit Kotyledonendefekten, wie Funktionsgewinnmutanten in *bdl* (Berleth & Jürgens, 1993, Weijers et al., 2006).

1.3 Das Sprossapikalmeristem: Aufbau und Stammzell-Homöostase

Im Hinblick auf die histologische Organisation kann das Meristem in drei Schichten eingeteilt werden. Die äußeren beiden Schichten, L1 und L2, bestehen aus sich nur periklin teilenden Zellen und bilden die Tunika. Die L1 liefert alle Zellen für die Epidermis, während die L2 und die L3 an der Bildung subepidermaler, parenchymatischer Gewebe und der Vaskulatur beteiligt sind (Satina et al., 1940). Räumlich und funktional lässt sich das Apikalmeristem dagegen in zwei Regionen einteilen (siehe Abb. 2). Die zentrale Zone enthält das Reservoir pluripotenter Stammzellen mit dem Organisationszentrum, welches für die Aufrechterhaltung der Meristemfunktion sorgt. Die periphere Zone, die die zentrale Zone umgibt, ist dagegen der Ort der Zelldifferenzierung und der Organogenese (Grandjean et al., 2004, Besnard et al., 2011).

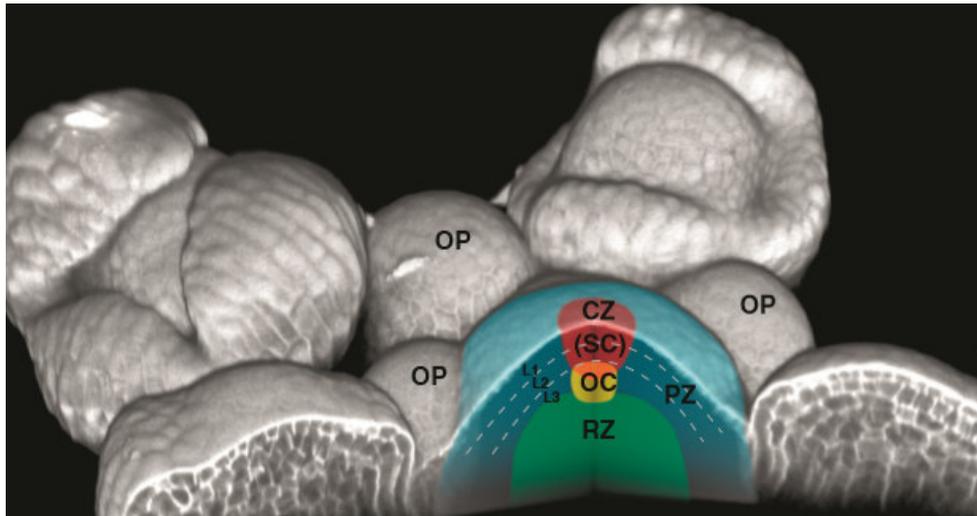


Abb. 2: Infloreszenzmeristem mit Zonierung

Das IM ist blau markiert. Die zentrale Zone (CZ), das Stammzellreservoir, ist rot markiert. Das Organisationszentrum (OC) ist gelb dargestellt und die Rippenzone grün. Die periphere Zone (PZ) ist ringförmig um die CZ angeordnet. Das Apikalmeristem kann man des weiteren in drei Schichten einteilen: L1, L2, L3. OP = Organprimordien (Abbildung entnommen aus Lohmann et al., 2015)

Die Meristemfunktion in *Arabidopsis* wird dauerhaft erhalten indem zum einen eine Umgebung geschaffen wird, die die Differenzierung von Zellen hemmt. Zum anderen wird lokal eine Stammzellnische etabliert und aufrecht erhalten (Schuster et al., 2014). Für die Stammzellhomöostase spielen zwei Faktoren in *Arabidopsis* wichtige Rollen: *WUSCHEL* (*WUS*) und *CLAVATA3* (*CLV3*). Im Organisationszentrum (OC) unterhalb der zentralen Zone (CZ) wird *WUS* exprimiert. Das *WUS* Protein agiert nicht-zellautonom und gelangt in die zentrale Zone, wo es direkt an den *CLV3*-Promotor bindet und seine Transkription aktiviert (Yadav et al., 2011, Rieu & Laux, 2009). Das *CLV3* Gen kodiert für ein größeres Vorläuferprotein. Nach posttranskriptionellen Modifikationen wird aus dem 96 Aminosäuren großen Vorläufer das 13 Aminosäuren kleine arabinosylierte Glycopeptid MCLV3 (Ohyama et al., 2009). Die Bindung von MCLV3 an den Leucin-reichen Rezeptor *CLV1* und an andere verwandter Rezeptorkinasen löst eine Signalkaskade aus, an deren Ende die Expression von *WUS* reprimiert wird. So wird durch eine Kommunikation zwischen den Stammzellen und dem Organisationszentrum in einem sich selbst regulierenden Rückkopplungskreis die Anzahl der Stammzellen in der zentralen Zone auf einem konstanten Niveau gehalten (Brand et al., 2000, Schoof et al., 2000). Bei der Kontrolle der Stammzellhomöostase spielt das Hormon Cytokinin eine maßgebliche Rolle. Es reguliert die Expression von *WUS* positiv und hemmt die Expression von *CLV1*. *WUS* wiederum reprimiert zwei negative Regulatoren der Cytokininantwort und wirkt sich so positiv auf den Cytokininweg aus (Gordon et al., 2009).

1.4 Organogenese

Während der vegetativen Phase werden vom SAM regelmäßig neue Blätter initiiert in deren Achseln sekundäre Meristeme angelegt werden, die in ihrer Struktur dem SAM entsprechen (Meyerowitz, 1997). Durch Zellteilungen in der zentralen Zone werden Stammzellen in die Peripherie abgedrängt und dabei zu Organgründerzellen spezifiziert. Gründerzellen, deren Anzahl abhängig vom jeweiligen Organ ist, werden währenddessen aktiviert und beginnen sich zu teilen Sie bilden an den Flanken des Meristems Primordien aus denen dann Organe auswachsen (Beveridge et al., 2007). Durch klonale Analysen konnte die Anzahl von Organgründerzellen für einige Organe von *Arabidopsis* bestimmt werden. Die ersten beiden Blätter, die bereits im Embryo angelegt werden, stammen von 8 - 9 Zellen ab. Die Blätter 3 - 6 stammen von 3 - 4 Zellen ab und die darauffolgenden Blätter und Infloreszenzen von 1 - 2 Zellen. Florale Meristeme stammen von 4 Gründerzellen ab. Sepalen und Karpelle von 8, Stamen von 4 und Petale von 2 Gründerzellen (Irish & Sussex, 1992, Bossinger & Smyth, 1996). Bei *Arabidopsis* werden Blätter und Blüten in einer spiralgigen Anordnung initiiert, bei der die Organe in einem charakteristischen Winkel von $137,5^\circ$ zueinander stehen. In diesem Zusammenhang wird Auxin als das Morphogen angesehen, welches Organanlagen initiiert und deren Positionierung bestimmt (Reinhard et al., 2003). Die exogene Applikation von Auxin auf die Meristemoberfläche fördert z.B. die Bildung von Blattanlagen unabhängig von ihrer Position innerhalb des Meristems. Ebenfalls kommt es zu einer veränderten Phyllotaxis, wenn Auxin-Transportinhibitoren auf SAMs appliziert werden (Reinhardt et al., 2000). Des Weiteren kann man bei Mutanten mit einem gestörten Auxin-Transport die Wichtigkeit des Hormons bei der Organinitiation erkennen. Homozygote *pin1*-Pflanzen haben zwar ein funktionsfähiges Meristem, sind jedoch nicht in der Lage Organprimordien zu generieren. Appliziert man Auxin jedoch exogen auf das Meristem, ist die Mutante in der Lage Organe auszubilden (Reinhardt et al., 2000, 2003). Des Weiteren korrelieren Auxin-Maxima, visualisiert durch die Aktivität des synthetischen *DR5*-Promotors, mit den Orten, an denen Primordien initiiert werden (Heisler et al., 2005). Zusammen betrachtet demonstrieren die Daten die Wichtigkeit des Auxins bei der Etablierung der Phyllotaxis.

Das Hormon wird akropetal aus tiefer liegenden Gewebeschichten mit Hilfe der Translokatoren PIN1 und AUX an eine Stelle (P0) in der Apikalmeristemperipherie transportiert. Der Auxineinstrom ist ein sich selbst verstärkender Prozess, da das Hormon die Neubildung von PIN1 in den Organanlagen über einen MP/ARF5 abhängigen Signalweg induziert (Krogan et al., 2016).

Die beiden jüngsten Primordien absorbieren den größten Teil des Auxins, so dass nur ein Rest in der Peripherie übrig bleibt. An der Stelle, die am weitesten von den beiden jüngsten Organprimordien entfernt liegt, kann ein neues Maximum entstehen; ein neues Primordium wird initiiert. Es wird angenommen, dass als Konsequenz des Auxin-Einstroms im Primordium (P0) die Expression des Gens *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, das für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor der KNOX-Familie kodiert, der Zellen im meristematischen Zustand hält, reprimiert wird. Gene der Differenzierung, wie der heterodimere MYB-Transkriptionsfaktor *ASYMMETRIC LEAVES1 und 2 (AS1/2)* werden daraufhin aktiv. AS1/2 unterdrückt weitere KNOX-Transkriptionsfaktoren (KNAT1 und 2), so dass der Schalter weiter in Richtung der Organentwicklung umgelegt wird (Byrne et al., 2002). Ob Auxin jedoch tatsächlich das Positionssignal bzw. das früheste initiiierende Signal bei der Bildung neuer Primordien in der Meristemperipherie darstellt ist noch zu klären. Es ist durchaus möglich, dass Auxin oder der Auxinsignalweg eher eine Rolle beim Auswachsen der Primordien, als bei der Initiation spielt. Weitere Arbeiten zeigen auch, dass die Inhibition des Cytokininsignalwegs in der Meristemperipherie ein wichtiges instruktives Signal bei der Initiation der Organprimordien darstellt und synergistisch mit dem Auxinmaximum als Stimulus bei der Initiierung der Phyllotaxis wirken könnte. Die Orte, an denen Primordien initiiert werden, korrelieren mit der Expression von *ARABIDOPSIS HISTIDINE TRANSFER PROTEIN 6*, einem Repressor des Cytokininsignalwegs (*AHP6*) (Besnard et al. 2014a, b).

Der Cytokinin-abhängige Signaltransduktionsweg ist ein Phosphorelais-System, das bakteriellen Systemen ähnelt und an dessen Anfang membranständige Rezeptorkinasen (AHK, *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE*) stehen (Inoue et al, 2001, . Yamada et al., 2001). Das Binden des Cytokinins an eine Rezeptorkinase löst zunächst eine Autophosphorylierung des Rezeptors aus. Dann folgt die Übertragung des Phosphatrestes vom Rezeptor auf ein Phosphotransferprotein. Das AHP phosphoryliert wiederum Response-Regulatoren (ARRs), die in der Regel als Transkriptionsaktivatoren (Typ-B) oder als Transkriptionrepressoren (Typ-A) arbeiten (Heyl & Schmülling, 2003, Müller & Sheen, 2007, To & Kieber, 2008). *AHP6* von *Arabidopsis* ist ein Pseudo-Phosphotransferprotein, das nicht in der Lage ist seinen Phosphatrest auf ARRs zu übertragen. Es agiert daher als ein Inhibitor des Cytokininsignalwegs.

1.5 Die Brassicaceenblüte

Nach der Transition von der vegetativen zur generativen Phase entwickelt sich das Apikalmeristem zum Infloreszenzmeristem (IM), in dessen Peripherie zunächst kryptische

Tragblätter initiiert werden, deren Auswachsen bei *Arabidopsis* jedoch gehemmt wird. In den Achseln der kryptischen Tragblätter werden die floralen Meristeme (FMs) angelegt (Long & Barton, 2000). Das Anlegen der FMs in der IM Peripherie erfolgt in der phyllotaktischen Spirale. Kurz darauf entwickelt sich eine Furche, die die FMs vom IM trennt (Stadium 1) (Smyth et al., 1990). In FMs des zweiten Stadiums wird *WUS* aktiv, etabliert eine neue Stammzellnische, aus der alle floralen Organe entstehen (Goldschmidt et al., 2008), und aktiviert die Expression seines Repressors *AGAMOUS (AG)*, was zur Folge hat, dass die Expression von *WUS* bereits in FMs des dritten Stadiums endet. Es werden daraufhin keine weiteren Stammzellen nachgebildet und die letzten Stammzellen zur Bildung des Gynözium aufgebraucht. *Arabidopsis* besitzt eine für die Brassicaceen typische Blüte mit vier Sepalen, vier Petalen, sechs Stamen und zwei zum Gynözium fusionierten Karpellen, die wirtelig aufgebaut ist (Smyth et al., 1990). Die Blütenorganprimordien entwickeln sich sequentiell beginnend mit den Sepalen im äußersten Wirtel. Dabei entwickeln sich die Blütenorgane aus 2 - 8 Gründerzellen der L1, abhängig vom Organtyp (Bossinger & Smyth, 1996). In FMs des dritten Stadium bilden die Sepalenprimordien die ersten morphologisch sichtbaren Strukturen. Das abaxiale Sepalenprimordium wird vor dem adaxialen und den beiden lateralen elaboriert (Stadium 3 - 4). Die vier Petalen und die sechs Stamenprimordien werden zeitgleich initiiert (Stadium 5). In diesem Stadium sind die Sepalen dabei auszuwachsen, während die inneren Organe zwar initiiert wurden, ihre Identitäten jedoch noch nicht determiniert sind (Bowman & Meyerowitz, 1990). Während der Spezifizierung der Identität einzelner Blütenorgane unterläuft jedes Primordium ein organspezifisches Entwicklungsprogramm. Im Laufe der Differenzierung entstehen dabei sowohl organspezifische, als auch allgemeine Zelltypen. Morphologische Anzeichen für Differenzierung lassen sich für Stamen und Karpelle ab Stadium 7, bei Petalen ab Stadium 9, beobachten.

Wie zuvor erwähnt sprechen einige Indizien dafür, dass die Initiation und das Auswachsen der Organprimordien Auxin-abhängige Prozesse sind bzw. Auxin-Maxima voraussetzen. Ob Auxin jedoch tatsächlich das einzige Signal der Spezifikation von Organgründerzellen ist, bleibt fraglich.

1.6 *DORNRÖSCHEN-LIKE (DRNL)*

Forschungen am Organgründerzellmarker *DORNRÖSCHEN-LIKE (DRNL)*, welcher der bis dato früheste bekannte Marker bei der Gründerzellspezifikation ist, bringen neue Erkenntnisse über die frühesten Vorgänge der Organogenese, wie z.B. die Rolle des Auxins bei diesem Prozess.

DRNL und sein Paralog DORNRÖSCHEN (DRN) gehören zu der pflanzenspezifischen AP2-Transkriptionsfaktorfamilie, die bei vielen Wachstums- und Entwicklungsprozessen wichtige Rollen spielt, z.B. bei der Organidentität der Blüte, Hormonsignaltransduktionswegen, der Differenzierung von Zellen und in der Stressantwort. (Riechmann & Meyerowitz, 1998, Riechmann et al., 2000). *DRN* und *DRNL* befinden sich in Nachbarschaft zueinander auf dem Chromosom 1 und sind wahrscheinlich aus einer Chromosomen internen Duplikation hervorgegangen. Die Produkte beider Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren ähnlicher Funktion (Chandler et al., 2011). Beide Gene können, wenn sie in Kalluskultur überexprimiert werden, die Regeneration von Sprossgewebe unabhängig von Cytokinin beschleunigen (Banno et al., 2001, Ikeda et al., 2006). Eine ektopische Expression der Gene vom *MLI*-Promotor führt zu Pflanzen, die den gleichen Zell-Überproliferations-Phänotyp in der Epidermis aufweisen (Seeliger et al., 2016). Obwohl beide Proteine in der Lage sind gleiche Funktionen zu erfüllen, weisen sie unterschiedliche Expressionsmuster auf und werden auf transkriptioneller Ebene unterschiedlich reguliert (Matsuo et al., 2008, 2011).

Ein besonderes Interesse besteht am *DRNL*-Promotor, der an der IM-Peripherie aktiv ist. Sein Expressionsmuster entspricht der phyllotaktischen Anordnung der FM-Primordien. Dies macht den Promotor zu einem Werkzeug mit Potenzial für die Erforschung der Gründerzellspezifikation an der IM-Peripherie.

Obwohl die Initiierung von FMs an der IM-Peripherie mit Auxin-Maxima, die durch die Aktivität des *DR5*-Reporters visualisiert werden können, korreliert, überlappen die Expressionsdomänen von *DR5* und dem *DRNL*-Promotor nur teilweise (Chandler & Werr, 2014). In der IM-Peripherie wird der *DRNL*-Promotor jedoch in einer Domäne exprimiert, in der auch *AHP6*, das für einen Inhibitor der Cytokininantwort kodiert, exprimiert wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass *AHP6* ein Zielgen von DRNL ist (Ikeda et al., 2006).

Diese Befunde sprechen für eine untergeordnete Rolle des kanonischen Auxin-Signalwegs bei der Gründerzellspezifikation. Ob nun der Auxin-Signalweg die Gründerzellspezifikation auslöst, oder ob eine Inhibition des Cytokinin-Signalwegs das früheste instruktive Signal ist bleibt zu klären.

Der *DRNL*-Promotor ist in floralen Meristemen in kleinen Gruppen von Zellen aktiv, deren Anzahl mit derer von floralen Organgründerzellen korrelieren (Bossinger & Smith, 1996, Chandler et al., 2011b). Die Aktivität des *DRNL*-Promotors in FMs lässt sich zuerst in der abaxialen Sepale detektieren, anschließend folgen die lateralen Sepalen zeitgleich, und zum Schluss die adaxiale Sepale. Petalen und laterale Stamen haben ihren Ursprung in zwei sichelförmigen Expressionsdomänen (FMs des Stadium 2), während die medialen Stamen

sich aus einer ringförmigen Expressionsdomäne entwickeln (Stadium 3). In FMs des Stadium 4 kommen noch zwei kleinere Expressionsdomänen hinzu, die die beiden Karpelle, aus denen sich das Gynözium zusammensetzt, vormustern. In Stadium 5 FMs löst sich die ringförmige Domäne in kleinere, punktförmige Felder auf, die Expression in den Sepalen ist zu diesem Zeitpunkt bereits terminiert (Chandler et al., 2011b). Im Gegensatz dazu wird *DRN* nur im Zentrum von IMs und den FMs, also in der Stammzellzone exprimiert. Seine Expressionsdomäne stimmt mit der für *CLV3* überein (Seeliger et al., 2016).

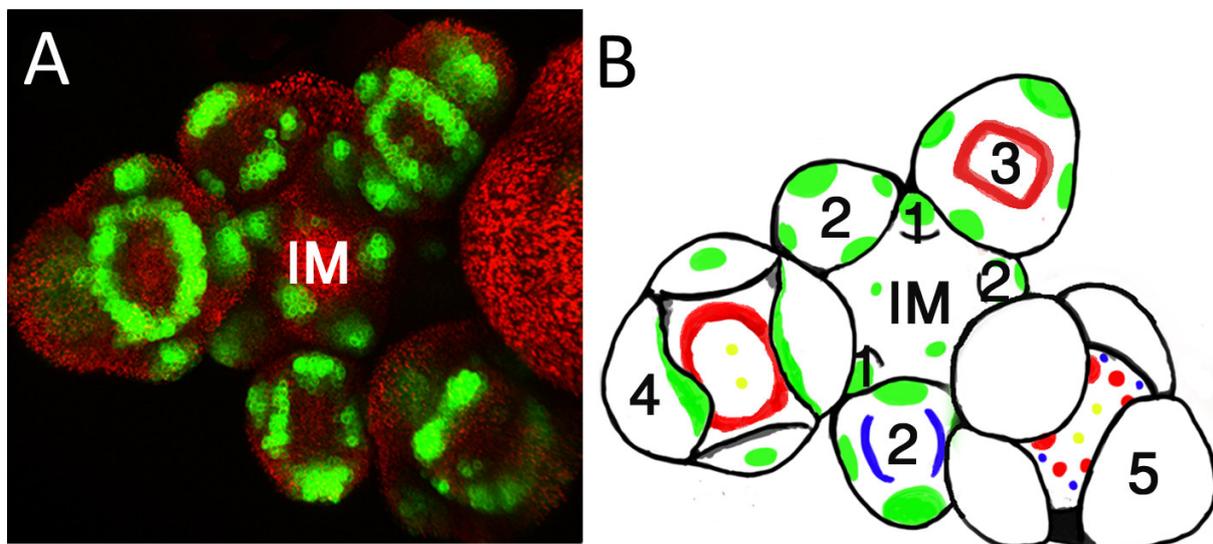


Abb3: *DRNL*-Expression im Infloreszenzmeristem und floralen Meristemen

(A) konfokale Aufnahme einer Infloreszenz, die *DRNL::erGFP* exprimiert.

(B) Schematische Darstellung *DRNL*-Expression floraler Meristeme der Stadien 1 - 5

grün = FM-Primordien und Sepalengründerzellen, blau = morphogenetisches Feld der Petalen- und lateralen Stamengründerzellen, rot = ringförmige Expressionsdomäne der medialen Stamengründerzellen, (gelb) = Expressionsdomäne der Karpellgründerzellen. Die Zahlen beziehen sich auf die Stadien der floralen Meristeme nach Smyth et al., 1990.

Während der Embryogenese spielen *DRNL* und *DRN* redundante Rollen (Chandler et al., 2007, 2011a). *DRNL* ist ab dem globulären Stadium aktiv. Dabei beschränkt sich die Expression zunächst auf den apikalen Teil des globulären Embryos, fokussiert sich dann im späten globulären Stadium auf die beiden Stellen, an denen die Kotyledonen initiiert werden und bleibt schließlich in den Spitzen der sich entwickelnden Kotyledonen bis hin zum Krückstock-Stadium bestehen. Bis zum späten Torpedo-Stadium umfasst die Aktivität des *DRNL*-Promotors die L1 Schicht, fokussiert sich jedoch anschließend auf subepidermale Schichten. Im Krückstock-Stadium kommt eine weitere Expressionsdomäne hinzu - die ersten beiden Blattprimordien. Das Expressionsmuster des *DRN*-Promotors ähnelt dem von *DRNL*. Die Aktivität von *DRN* beginnt jedoch bereits im Proembryo, wo *DRN* im gesamten Embryo

aktiv ist. Bis in das frühe Torpedo-Stadium überlappen sich die Expressionsdomänen beider Gene. Im späten Torpedo-Stadium, beschränkt sich die *DRN*-Aktivität auf die L1 der Kotyledonen und das Gen wird im Zentrum des SAM aktiv.

1.7 klonale Analysen

Um ein besseres Verständnis für die Morphogenese von Organen zu bekommen sind Informationen über die genaue Anzahl von Zellen und ihre Schicksale in einem Primordium von Nutzen (Poethig, 1987). Klonale Analysen von Zellen, in denen *DRNL*-Aktivität war, könnten klären, welche Zellpopulationen oder Organe von durch *DRNL*-Aktivität markierten Organgründerzellen abstammen und so Erkenntnisse über die frühesten Schritte in der Organogenese liefern.

Zu diesem Zweck wurden Methoden entwickelt, um im Idealfall eine einzelne Zelle zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt innerhalb eines wachsenden Organs oder Gewebes klonal zu markieren. Eine solche Markierung wird auf die Nachkommen der Zelle vererbt während das Gewebe oder Organ auswächst. Es entsteht ein Sektor, der aus der ursprünglichen markierten Zelle und ihren Töchtern besteht und von den umgebenden Zellen (visuell) zu unterscheiden ist. Satina et al. konnten bereits 1940 in ihren klonalen Analysen mit *Datura stramonium* nachweisen, dass die Sprossapices die charakteristischen drei Schichten (L1 - L3) aufweisen (Satina, 1940). Sie behandelten Pflanzen mit Colchizin und verfolgten die Entwicklung und das Schicksal polyploider Zellen, die sich in ihrer Größe von normalen, diploiden Zellen unterschieden. Neuere Methoden, um Zellen klonal zu markieren beinhalten Rekombinationssysteme, wie *FLP-FRT*, *R-RS* und *Cre/lox* (Sauer & Henderson, 1989, Golic & Lindquist, 1989, Onouchi et al., 1991). Bei *FLP*, *R* und *Cre* handelt es sich um Rekombinasen. *FRT*, *RS* und *loxP* sind ihre DNA-Erkennungssequenzen an die sie binden und zwischen denen sie ein Rekombinationsereignis katalysieren können. Da in der folgenden Arbeit ein *Cre/lox*-basiertes System zum Einsatz kam, soll dieses hier näher erläutert werden. *Cre* stammt aus dem Bakteriophagen P1. Die Rekombinase bindet ihre spezifischen 34 bp langen *lox*-Sequenzen und führt zwischen ihnen eine Rekombination durch. Dabei entscheidet die Orientierung zweier *lox*-Sequenzen zueinander welche Art der Rekombination statt findet. Sind beide *lox*-Sequenzen in der gleichen Orientierung, wird das zwischen ihnen liegende DNA-Fragment deletiert. Liegen die *lox*-Sequenzen invers zueinander wird die Rekombinase das DNA-Fragment invertieren. Befinden sich auf zwei unterschiedlichen DNA-Molekülen *lox*-Sequenzen, so kommt es zur Integration des einen DNA-Moleküls in das andere (Medberry et al., 1995). Den letzt genannten Mechanismus nutzt der Phage natürlicherweise,

um sein Genom in ein bakterielles Wirtsgenom zu integrieren, um im Zustand der Lysogenie zu überdauern. Cre-basierte Systeme kamen erfolgreich in Pflanzen zum Einsatz, meistens mit dem Ziel Selektionsmarker-freie genetisch modifizierte Nutzpflanzen herzustellen (Kim et al., 2012, Póloniová et al., 2015), oder um artifizielle Chromosomen in *Arabidopsis* zu generieren (Murata et. al, 2013). Die Kombination eines Cre-exprimierenden Treibers mit einem geeigneten Reporter in einer Pflanze erlaubt es auch Zellen klonal zu markieren. Der Vorteil, verglichen mit den historischen Methoden, ist, dass man den Zeitpunkt und auch den Ort innerhalb einer Pflanze beschränken kann, indem man einen gewebespezifischen oder induzierbaren Promotor für die Expression von Cre benutzt. Des Weiteren lässt sich der Kernimport und so die Aktivität der Cre-Rekombinase steuern, indem Cre als Fusionsprotein mit der hormonbindenden Domäne des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) exprimiert wird. Synthetische Steroide, wie Dexamethason, können die hormonbindende Domäne von GR binden. Erst danach ist ein Kernimport des Fusionsproteins möglich. Ohne gebundenen Liganden befindet sich das Fusionsprotein in einem inaktiven Komplex mit Chaperonen, wie Hsp90 und Hop, die den Komplex in einem Zustand halten, der es ihm ermöglicht seine Liganden besser binden zu können (Kirschke et al., 2014). Bindet Dexamethason, dissoziiert Hsp90 und das Fusionsprotein kann in den Zellkern gelangen. Auf der Basis Cre-abhängiger Rekombination wurde das BOB-System zum Generieren markierter Deletionsklone entwickelt (Wachsmann et al., 2011). Die Induktion der Rekombination in ihrer Arbeit wurde sowohl durch das Verwenden eines Hitzeschock-Promotors für die Cre-Expression erreicht als auch durch Dex-Behandlung von Cre-GR, welches unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors stand. Pflanzen in diesem System sind homozygot für ein mutiertes Allel des untersuchten Gens und homozygot für ein Transgen mit Wildtyp-Funktion. Das Transgen exprimiert ebenfalls ein Fluoreszenzprotein. Nach erfolgter Rekombination wird ein oder es werden beide Transgene inklusive YFP deletiert und die Expression zweier weiterer Fluoreszenz-Proteine aktiviert (Wachsmann et al., 2011). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Cre/lox System sich zum Visualisieren und der Analyse klonaler Sektoren eignet. Durch das Verwenden gewebespezifischer Promotoren und induzierbarer Komponenten (GR, Hsp-Promotor) lässt sich der Zeitpunkt und das Gewebe, das markiert werden soll, präzise bestimmen.

1.8 Zielsetzung

Es sollen *cis*-regulatorische Elemente im *DRNL*-Promotor identifiziert werden, welche die dynamische Expression von *DRNL* steuern. Das langfristige Ziel ist dabei Transkriptionsfaktoren, die an den Elementen binden, zu identifizieren und so etwas über die Vorgänge und Faktoren, die stromaufwärts der *DRNL*-Expression aktiv sind, herauszufinden. Zur Identifikation solcher *Enhancer* Elemente werden in der folgenden Arbeit phylogenetische Analysen des *DRNL*-Promotors verwandter Brassicaceen zum Einsatz kommen. Des Weiteren wird mit *DRNL*-Promotordeletionskonstrukten gearbeitet. Darüber hinaus soll das Schicksal von durch *DRNL*-Aktivität markierter Gründerzellen erforscht werden, wozu zunächst ein induzierbares System etabliert werden muss mit dessen Hilfe es gelingen soll Zellen, in denen *DRNL* exprimiert wurde, klonal durch GUS-Enzymaktivität zu markieren. Ein Cre/*lox*-Rekombinase basiertes System wird gewählt, da es bereits erfolgreich in *Arabidopsis* angewendet wurde. Analysen klonaler Sektoren können etwas über die Anzahl der Gründerzellen und darüber welche Zellschichten zu den einzelnen Organen beitragen lehren. Zellen, in denen *DRNL* aktiv ist, sollen durch die induzierbare Expression von Diphtherie-Toxin A genetisch ablatiert und die Ablationsphänotypen mit den klonalen Sektoren verglichen werden. Der Ansatz mit dem Diphtherie-Toxin wird gewählt, da Laser-Ablations-Experimente im Sprossapikalmeristem bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Ablationen können das Bild vervollständigen, welches man durch klonale Sektoren erhält und die Frage klären, ob der Verlust von Gründerzellen komplementiert werden kann, ob Organe oder gar ganze Blüten verloren gehen und ob der Verlust Auswirkungen auf die Phyllotaxis hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Elektrophoreseapparaturen:

Nukleinsäure-Elektrophoresekammern	Peqlab
Powersupply GPS 200/400	Pharmacia

Elektroporationsapparatur:

Gene Pulser	Biorad, Berkeley (USA)
-------------	------------------------

Geldokumentation:

Gel Doc XR	Biorad, Berkeley (USA)
------------	------------------------

Photometer:

Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
----------------	-------------------

Thermocycler:

Peletier Thermal PTC-200	Biozym, Oldendorf
C1000 Thermal Cycler	Biorad, Hercules
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg

Thermomixer / Heizblöcke:

Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Dri-Block DB-2D	Techne

Waage:

Sartorius BP 3105	Sartorius, Göttingen
-------------------	----------------------

Zentrifugen:

Centrifuge 5417	Eppendorf, Oldenburg
Heraeus Fresco 21 centrifuge	Thermo Scientific

Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Megafuge	Beckman, USA

Mikroskope / Binokulare:

LSM 700	Zeiss
LMD 6000	Zeiss
Stemi 2000	Leica
MZ16 FA	Leica

Klimakammer:

Percival AR-4IL3	CLF Plant Climatics
------------------	---------------------

2.1.2 Molekularbiologische Kits

Folgende molekularbiologische Kits wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

Tab.1: Molekularbiologische Kits

Reaktionskit	Hersteller
CloneJet™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Green PCR Mastermix (5x)	myBudget, Krefeld
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin Plant II	Macherey & Nagel, Düren
RedExtract plant Kit	Sigma Aldrich, München

2.1.3 Enzyme

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Enzyme aufgelistet.

Tab.2: Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich (USA)
Alkaline Phosphatase (CIP)	NEB, Ipswich (USA)

T4 DNA Ligase	NEB, Ipswich (USA)
T4 Polynucleotid-Kinase	NEB, Ipswich (USA)
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific, Waltham (USA) Finnzymes, Hess. Oldendorf
Hifi DNA Polymerase	Invitrogen, Darmstadt

2.1.4 DNA-Marker

1 kb Plus Ladder	Thermo Scientific, Waltham (USA)
1 kb Ladder	Invitrogen

2.1.5 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Invitrogen (Groningen), Eppendorf (Hamburg), Thermo Scientific (Waltham, USA), PeqLab (Erlangen), Promega (Mannheim), Roche Applied Science (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), Duchefa (Haarlem, NL), VWR (Darmstadt).

2.1.6 Puffer und Lösungen

GUS-Lösung

Natrium Phosphat	100 mM
EDTA	10 mM
Kalium-Ferrocyanid	0,5 mM
Kalium-Ferricyanid	0,5 mM
Triton X100	0.1 %v/v
X-Gluc	1 mM
pH auf 7,0 eingestellt	

PBS-Puffer (1 x)

NaCl	140,0 mM
Na ₂ HPO ₄	10,0 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

pH auf 7,4 eingestellt

TAE-Puffer (50 x)

Tris	2,00 M
EDTA	0,05 M

pH auf 8,0 eingestellt

TE-Puffer (1 x)

Tris-HCl	10 mM, pH 8
EDTA	1 mM

pH auf 8,0 eingestellt

2.1.7 Medien

LB-Medium (*E.coli*)

Hefeextrakt	5 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Für eine Plattenkultur wurden 15g/l Agar hinzugefügt und für eine Selektion entsprechende Antibiotika.

YEP-Medium (*A. tumefaciens*)

Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l

Für eine Plattenkultur wurden 15g/l Agar hinzugefügt und für eine Selektion entsprechende Antibiotika.

½ MS-Medium (*A. thaliana*)

MS-Nährsalze incl. Gamborg B5	23 g/l
Saccharose	10 g/l
MES	0,5 g/l

pH 5,7

Für eine Plattenkultur wurden 8g/l Agar hinzugefügt und für eine Selektion entsprechende Antibiotika.

Infiltrationsmedium

Saccharose	50 g/l
Silwet L-77	0,02 %

Das Infiltrationsmedium wurde stets frisch angesetzt.

2.1.8 Antibiotika

In der folgenden Tabelle sind die in der Arbeit eingesetzten Antikiotika mit ihrer Endkonzentration aufgeführt.

Tab.3: Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100
Gentamicin	25
Kanamycin	50
Rifampicin	50
Carbenicilin	100

2.1.9 Vektoren

Abhängig von der jeweiligen Klonierungsstrategie wurden zur Klonierung von PCR-Produkten der *pJET1.2/blunt* Vektor von Thermo Scientific oder der *pTOPO®* TA Cloning Vektor von Invitrogen verwendet. Für die Transformation von *A. tumefaciens* und zur Herstellung transgener Pflanzen wurde der *pGPTV*-Vektor (Überlacker and Werr, 1996) verwendet. Die Vektoren und deren Hersteller sind in Tabelle 4 aufgelistet. Vektorkarten finden sich im Anhang.

Tab.4: Vektoren

Plasmid	Selektion (Bakterien)	Referenz
pJet1.2/blunt	Ampicillin	Thermo Scientific
pTOPO®	Ampicillin/Kanamycin	Invitrogen
pGPTV	Kan	Überlacker & Werr

2.1.10 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Bakterienstämme zum Einsatz:

E. coli:

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

Dieser Stamm wurde ausschließlich für Klonierungsarbeiten verwendet.

A. tumefaciens:

GV 3101: (pMP90) GentR, RifR (Koncz & Schell, 1986).

Dieser Stamm wurde verwendet, um Transgene in *A. thaliana* einzubringen.

2.1.11 Pflanzenmaterial

Zur Herstellung transgener *A. thaliana* Pflanzen wurde die Ökotype Col-0 verwendet. Des Weiteren wurden einige *DRNL*-Promotor-GFP-Konstrukte in die transgene Linie *pDRNL:CER* eingebracht (Cole et al., 2013)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Phusion- oder der Hifi- Polymerase gearbeitet, wenn eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion benötigt wurde. Dies war der Fall, wenn das amplifizierte DNA Fragment bei Klonierungen eingesetzt wurde. Diente die PCR jedoch nur als Nachweismethode, z.B. zur erfolgreichen Bakterientransformation bei einer Kolonie-PCR, wurde der 5 x Greenmix von myBudget verwendet, der die *Taq*-Polymerase beinhaltet.

a) Greenmix

Reaktionsansatz:

5 x Greenmix	4 µl
vorwärts Primer	1 µl
rückwärts Primer	1 µl
Template	1 µl
Bidest	13 µl
20 µl Endvolumen	

PCR-Programm:

94°C	2:00	
94°C	0:20	x 25-35
50-60°C	0:20	
72°C	1 min/1kb	
72°C	10:00	
4°C	∞	

b) Phusion

50 µl Endvolumen

Reaktionsansatz :

5x-Puffer	10 µl
50 mM MgCl ₂	1 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
vorwärts Primer	2,5 µl
rückwärts Primer	2,5 µl
Template	1 µl
Polymerase	0,5 µl
Bidest	31,5 µl

PCR-Programm

94°C	2:00	
94°C	0:30	x 25-35
50-60°C	0:30	
72°C	30 sec/1kb	
72°C	10:00	
4°C	forever	

2.2.1.2 Mutagenese mit Hilfe einer „inversen“ PCR

Eine inverse PCR erlaubt es Deletionen oder Mutationen in einen Vektor einzuführen. Um eine Deletion zu erzielen wurde dazu ein Primerpaar gewählt, das den zu deletierenden Bereich ausspartete und in der nachfolgenden PCR der gesamte Vektor amplifiziert (Abb. 4 A). Sollte eine Mutation eingeführt werden, kam ein Primer zum Einsatz, der die gewünschte Mutation trug. Nach erfolgter PCR wurden die Produkte aufgereinigt und mit sich selbst ligiert. Es war darauf zu achten, dass entweder bereits phosphorylierte Primer in der PCR zum Einsatz kamen, oder das PCR Produkt musste im Nachhinein mit einer DNA-Kinase behandelt werden. Für die inverse PCR wurde eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion benutzt.

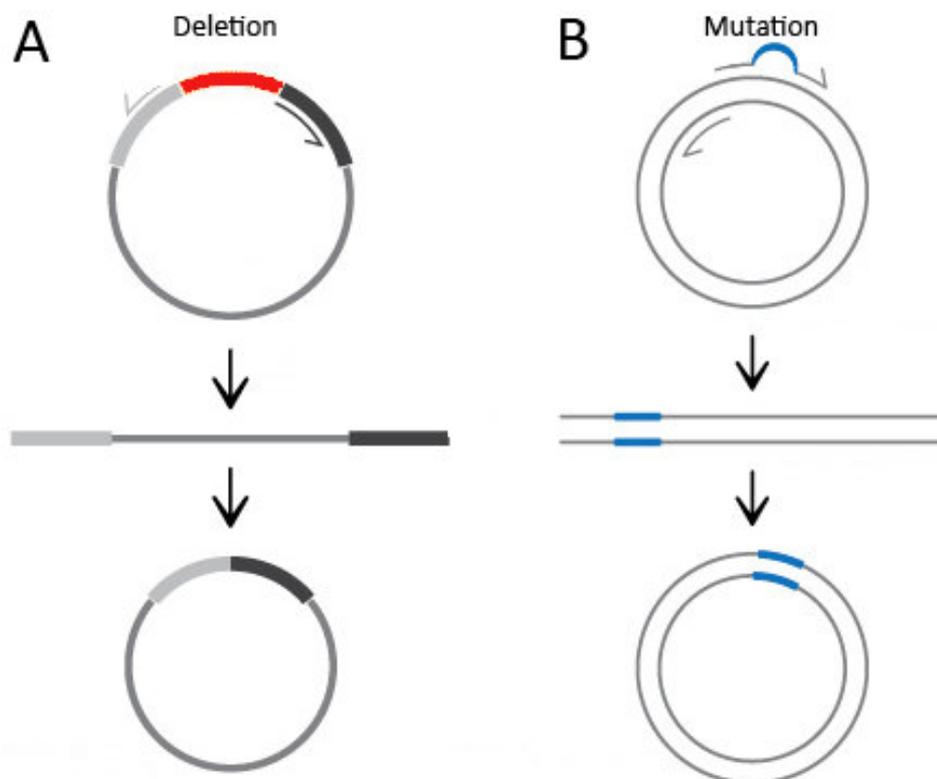


Abb4.: Schematische Zusammenfassung der inversen PCR

A: Ein Primerpaar flankiert den Bereich, der deletiert werden soll (rot). In einer PCR wird der komplette Vektor amplifiziert. Nach erfolgter Autoligation des PCR-Produktes erhält man einen Vektor dem dieser Bereich fehlt. B: Ein Primer des Paares trägt die gewünschte Mutation (blau markiert). Nach erfolgter PCR und Autoligation des Produktes erhält man einen Vektor mit der gewünschten Modifikation.

2.2.1.3 Genotypisierung von Pflanzen

Zur Genotypisierung einzelner Pflanzen wurde entweder das RedExtract-Kit von Sigma Aldrich verwendet und gemäß der Herstellerangaben verwendet, oder genomische DNA isoliert (NucleoSpin® Plant II, Macherey-Nagel), welche anschließend in einer PCR eingesetzt wurde. Reaktionsansatz und Bedingungen erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie bei der Kolonie-PCR (siehe 2.2.1.1). Es wurde 1 µl DNA in der Reaktion als Template eingesetzt.

2.2.2 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Analyse eines Restriktionsverdau oder von PCR-Produkten erfolgte in Agarose-Gelen mit Hilfe einer Elektrophorese. Dabei wurden Nukleinsäuren anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Das Agarose-Gel fungierte dabei als eine Art Sieb. Ein elektrisches Feld wurde in einfach konzentriertem TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,001 M EDTA) angelegt, um die negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Gelmatrix zu ziehen, wobei kleinere Moleküle sich schneller durch das Agarose-Gel bewegen.

Die Trennung der DNA-Moleküle geschah in 1-%igen Gelen. Die DNA-Proben wurden, sofern nötig, 6 : 1 mit Ladepuffer (6 x blue DNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und auf die Gele aufgetragen. Durch Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml), welches dem Agarosegel in einer ungefähren Endkonzentration von 0,5 µg/ml vor dem Gießen zugesetzt wurde, wurde die DNA sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann im UV-Licht bei 302 nm zur Fluoreszenz angeregt werden.

2.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur DNA-Gelextraktion wurde das "NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit" von Macherey-Nagel (Düren) verwendet und entsprechend den Herstellerangaben gearbeitet. Bei der Gelextraktion wird das Agarosegel inklusive der darin enthaltenen DNA mit Hilfe eines Puffers aus dem Kit aufgelöst und auf ein Säulen gegeben. Die DNA bindet an das Säulenmaterial und die restliche Agarose und die Puffer-Bestandteile können mit einem Wasch-Puffer entfernt werden. Zum Schluss wird die DNA mit einem Elutionspuffer eluiert.

2.2.4 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation ist eine Methode zur Isolierung von Vektoren aus Bakterien. Das Prinzip der Minipräparation beruht darauf, dass die Bakterienzellen zuerst einer

alkalischen Lyse unterzogen werden. Die Vektor-DNA bleibt dabei in Lösung während das *E. coli* Chromosom an der Bakterienhülle angeheftet bleibt und mit dieser und beigefügtem SDS per Zentrifugation pelletiert wird. Der Überstand enthält nur noch die Vektor-DNA, die entweder mit Alkohol gefällt wird oder durch den Einsatz von DNA-bindenden Säulchen aufgereinigt wird.

Zur Plasmid-Minipräparation wurde das NucleoSpin Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet und gemäß der Herstellerangaben benutzt.

2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonucleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA oder RNA durch Spaltung der inneren Phosphodiesterbindung abbauen. Jede Endonuklease schneidet dabei an einer für sie spezifischen Sequenz. Die biologische Funktion dieser Enzyme ist, in die Zelle eingedrungene Fremd-DNA, z.B. von Viren, zu vernichten und so mögliche Infektionen zu verhindern. Damit das bakterielle Genom selbst nicht auch zerstört wird, denn rein statistisch müssten im bakteriellen Genom selber diese Erkennungssequenzen vorhanden sein, sind gewisse Nukleotide an der Zielsequenz im bakteriellen Genom methyliert.

Vektoren und PCR-Produkte wurden mit Endonucleasen verdaut, um an ihren Enden passende Überhänge für eine Klonierung zu generieren.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde bei GATC Biotech (Konstanz) in Auftrag gegeben.

2.2.7 T4-Ligase-basiertes Klonieren

Zum Klonieren wurde immer ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1 : 3 oder 1 : 5 gewählt. Der Ligationsansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. In der Regel wurden 5 µl eines Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert.

2.3. Modifikationen des *DRNL*-Promotors

Um die Sequenzen im *DRNL* Promotor zu identifizieren, die an der spatiotemporalen Expression des Gens beteiligt sind, wurde eine Reihe von Konstrukten kloniert, bei denen modifizierte Versionen des *DRNL* Promotors genutzt wurden, um die Expression einer an das endoplasmatische Retikulum adressierten Version des GFP-Reporters anzutreiben (erGFP).

Die genomische Sequenz von *Arabidopsis* Col-0, die für das Konstrukt *DRNL::erGFP* (oder *DRNL_{Long}*) verwendet wurde, bestand aus einer 5644 bp großen genomischen Sequenz, die zwischen dem Stopcodon von *At1g24610* und dem *DRNL*-Startcodon liegt. Von Petra Comelli wurden Ausgangs-Konstrukte, basierend auf dem Vektor pBluescript generiert, bei denen entweder die 5,6 kb große Region oder ein von der 5'-Seite verkürzter Promotor (3,2 kb, Δ^{EX4} oder *DRNL_{Short}*) verwendet wurde (*pBluescript+DRNLUSL*, *pBluescript+DRNLUSS*). Es wurden noch zwei weitere Ausgangskonstrukte erstellt, bei denen hinter die beiden Promotorversionen noch jeweils *erGFP* mit einer Terminationssequenz (3' UTR) kloniert wurden. Externe und interne Deletionen sowie Punktmutationen wurde mit Hilfe einer inversen PCR erzeugt, bei der entweder *pBluescript+DRNL* oder *pBluescript+DRNL::erGFP* als Template in einer PCR verwendet wurde. Bei Konstrukten, die auf dem Vektor *pBluescript+DRNL* basierten, wurde anschließend noch das *erGFP* mit einer 3'UTR durch eine *XmaI* Schnittstelle eingefügt. Einige Konstrukte entstanden in mehreren Klonierungsschritten, indem ein Fragment (welches meist in pJET subkloniert wurde) ausgeschnitten und in ein bestehendes Konstrukt eingefügt wurde. Zweier Tabellen im Anhang (5.2.1) lässt sich entnehmen welche Templates und welche Primerpaare eingesetzt wurden, um die Promotorkonstrukte zu generieren.

2.4 Klonale Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Treiberlinien erzeugt, bei denen die Cre-Rekombinase nach erfolgter Induktion mit Dexamethason spezifisch in Zellen produziert werden soll, in denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist. Dazu bediente man sich des LhG4/pOp-Transaktivierungssystems (Moore et al., 1998) und erstellte einen Treiber, bei dem der *DRNL*-Promotor eine Fusion der GR-Hormonbindedomäne mit dem chimären Transkriptionsfaktor *LhG4* antreibt. LhG4 ist ein Fusionsprotein bestehend aus einem mutierten lac-Repressor, der eine höhere Bindungsaffinität aufweist, mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne II von Gal4 aus *S. cerevisiae*. Innerhalb desselben Konstrukts befindet sich eine weitere Expressionseinheit: Ein *pOp*-Promotor, der die Expression des *Cre*-Gens antreibt. Der *pOp*-Promotor besteht aus mehreren Einheiten des lac-Operators vor einem 35S Minimalpromotor des Blumenkohl-Mosaikvirus (*CaMV*) kloniert und kann von LhG4 gebunden werden (Kurzbezeichnung: *DRNLpOpCre*). Treiberpflanzen produzieren theoretisch in Zellen, in denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist, GR-LhG4, das erst nach Dexamethason-Zugabe in den Zellkern wandert und dort die Transkription von *Cre*

aktiviert. Des weiteren wurde ein weiterer Treiber erstellt, der auf *GR-LhG4/pOp* beruht, jedoch den *DR5*-Promotor beinhaltet (*DR5pOpCre*).

Ein Reporterkonstrukt wurde generiert (*RepEx*), das mit den Treiberlinien kombiniert werden soll. Bei *RepEx* treibt der *CaMV 35S*-Promotor konstitutiv die Expression des *erGFP*-Gen an, das von entgegengesetzt orientierten *lox*-Sequenzen flankiert ist. Nach einer Cre-vermittelten Rekombination wird das *erGFP* ausgeschnitten. Das *uidA*-Gen, das für die β -Glucoronidase kodiert, wird danach an seiner Stelle exprimiert. Zellen, in denen nach erfolgter Rekombination *uidA* aktiv ist, vererben diese Modifikation an ihre Tochterzellen. Gewebe, die von einer rekombinierten Zelle abstammen lassen sich durch eine GUS-Färbung visualisieren.

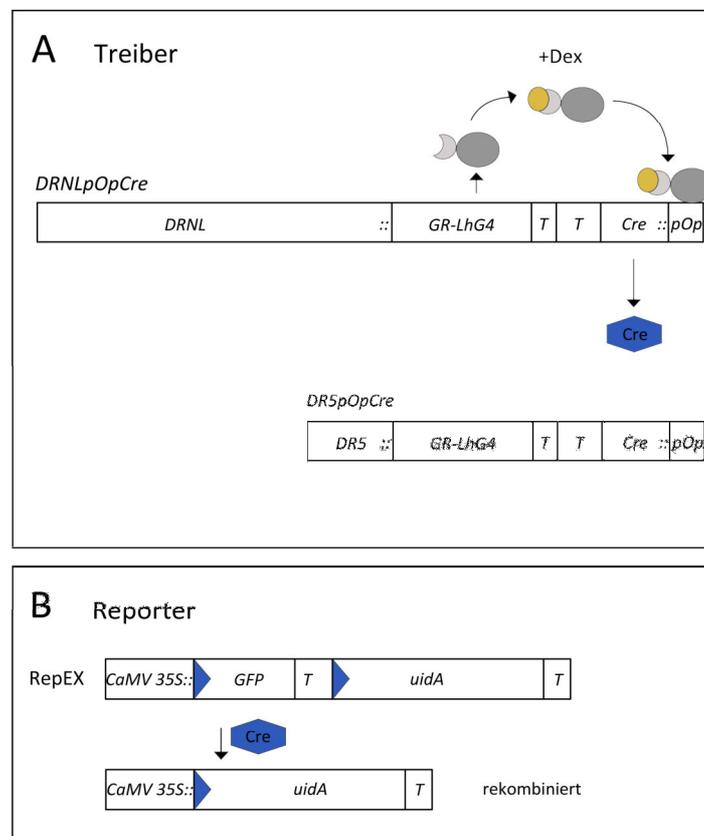


Abb5: Schematische Darstellung der Treiber- und Reporterkonstrukte

(A) Zwei Treiber wurden kloniert, die in Zellen, in denen entweder der *DRNL*- oder der *DR5*-Promotor aktiv ist, GR-LhG4 bilden. Nachdem Dexamethason (gelber Kreis) an die hormonbindende Domäne (hellgrauer Halbkreis) bindet, kann GR-LhG4 in den Zellkern transloziert werden und den *pOp*-Promotor binden. Dieser wird daraufhin aktiv woraufhin die Transkription von *Cre* kann stattfinden kann. (B) Der Reporter *RepEx* besteht aus dem konstitutiven *CaMV 35S*-Promotor, der die Transkription von *erGFP* antreibt, welches mit *loxN*-Sequenzen (blaue Dreiecke) derselben Orientierung flankiert ist. Stromabwärts des *erGFPs* befindet sich das *uidA*-Gen. Nach Cre-vermittelter Rekombination wird *erGFP* entfernt so dass der *CaMV 35S*-Promotor die Expression von *uidA* antreiben kann.

2.4.1 Klonierung von Treiber- und Reporterkonstrukten

a) Treiberkonstrukte

Das Zusammenstellen der Expressionskassette der Treiberkonstrukte wurde in mehreren Schritten im *pTOPO* Vektor vollzogen. In den Vektor *pTOPO* wurde ein Fragment, das aus *GR-LhG4* und dem Terminator aus CaMV (*PAS*) besteht, kloniert. Anschließend wurde in den Vektor *pJET-pOp::OCS* (M. Cole), der den *pOp*-Promotor und den Terminator der Octopin-Syntase (*OCS*) beinhaltet, über eine *SmaI* Schnittstelle das Cre-Gen eingebracht. Das *pOp::Cre-OCS*-Fragment wurde daraufhin ausgeschnitten und mit dem *NotI*-linearisierten *pTOPO+GR-LhG4-PAS* ligiert. Über eine *StuI*-Schnittstelle wurde der *DRNL*- oder der *DR5*-Promotor eingebracht. In einem letzten Schritt wurde die fertige Expressionskassette über ihre *AscI*-Schnittstellen in den *pGPTV*-Vektor (mit BASTA-Resistenzgen) kloniert. Im Anhang finden sich zwei Tabellen, denen man die Sequenzen der verwendeten Primer und Details der einzelnen Klonierungsschritte entnehmen kann.

b) Exzision-Reporter (*RepEX*)

In den Vektor *pRT-35S::erGFP-PAS* (M. Cole), der den *35S*-Promotor aus CaMV, *erGFP* und einen Terminator (*PAS*) beinhaltet, wurde über eine *XbaI*-Schnittstelle, die zwischen *erGFP* und dem Terminator lag, *uidA* eingebracht. Über eine *BamHI*-Schnittstelle wurde eine *loxN*-Sequenz und der Terminator des Nopalin-Synthase-Gens (*NOS*) in das Konstrukt eingebracht. Nach einem *NotI NcoI*-Verdau des Konstrukts wurde die zweite *loxN* eingebracht. Anschließend wurde eine inverse-PCR mit den Primern *uidA_ATG_F* und *D_A_R* und dem Vektor als Template vollzogen, bei der eine *XbaI*-Schnittstelle deletiert wurde, da sie nach einer erfolgreichen Rekombination in einem zusätzlichen Startcodon resultiert hätte. Zuletzt wurde die Expressionskassette über ihre *AscI*-Schnittstellen in den *pGPTV*-Vektor (mit Kanamycin-Resistenzgen) kloniert. Im Anhang finden sich ebenfalls zwei Tabellen, denen man die Sequenzen der verwendeten Primer und Details der einzelnen Klonierungsschritte entnehmen kann.

2.5 Genetische Ablationen

Ablationen, ob genetisch oder mit Laser, sind ein wichtiges Werkzeug in der Entwicklungsbiologie und erlauben es Entwicklungsprozesse und die Rolle, die bestimmte Zellen im Kontext eines Gewebes spielen zu erforschen. In der folgenden Arbeit kam ein induzierbares System zum Einsatz, bei dem man sich ebenfalls des *GR-LhG4/pOp*-Ansatzes bediente (Moore et al., 1998). Beim Ablationskonstrukt treibt der *DRNL*-Promotor die

Expression von *GR-LHG4* an (Abb. 6). Innerhalb desselben Konstrukts findet sich eine zweite Expressionseinheit, bei der der *pOp*-Promotor vor das Gen für das Diphtherie-Toxin A (*DT-A*) kloniert wurde. Werden transgene Pflanzen nun mit Dexamethason behandelt, so kann GR-LHG4 in den Zellkern gelangen und den *pOp*-Promotor aktivieren, der anschließend die Expression von *DT-A* antreibt. Zellen, bei denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist, sollen so abgetötet werden.

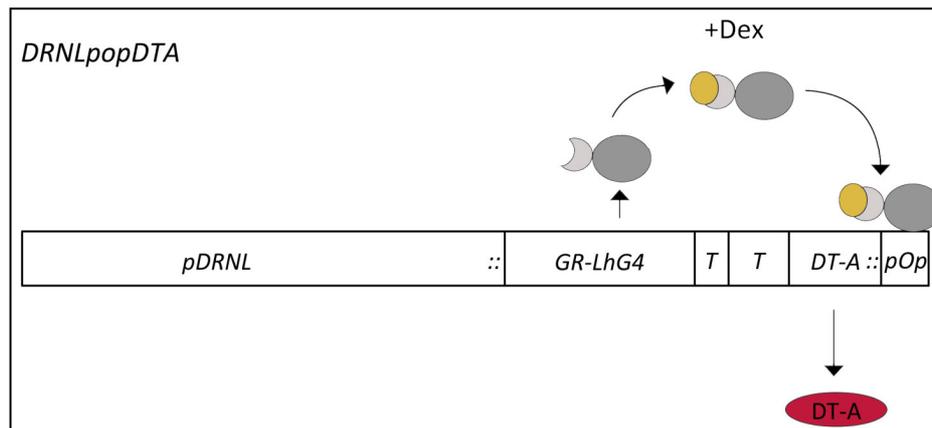


Abb. 6: Konstrukt zur genetischen Ablation *DRNL*-exprimierender Zellen

Der *DRNL*-Promotor wird verwendet, um die Expression von *GR-LHG4* anzutreiben. *DRNL*-exprimierende Zellen stellen GR-LHG4 her, das nach dem Binden von Dexamethason (gelber Kreis) an die hormonbindende Domäne des GR-Rezeptors (hellgrauer Halbkreis) in den Zellkern gelangt und den *pOp*-Promotor aktiviert, der dann die Transkription des *DT-A* antreibt. *DT-A* ist toxisch und tötet die Pflanzenzelle ab.

2.5.1 Klonierung des Ablationskonstrukts

Das *DT-A* Gen wurde in einer PCR amplifiziert, das entstandene Produkt mit einer T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert und mit dem *SmaI* linearisiertem Vektor pJET pOp ligiert. Die weiteren Klonierungsschritte waren identisch mit denen des *GR-LHG4*-Treibers (siehe 2.4.1).

2.6 Arbeiten mit Bakterien

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von DH5 α diente dazu Plasmid-DNA zu vervielfältigen. Für die Transformation von DH5 α standen chemisch kompetente Zellen zur Verfügung.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 0,5 - 5 μ l einer Plasmid-Lösung oder eines Ligationsansatzes pro Eppendorfgefäß hinzugefügt und vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt. Die Ansätze wurden daraufhin für 5 min auf Eis und anschließend in einem 42°C warmen Heizblock für 30 sec inkubiert.

Danach wurden sie für 1 min wieder auf Eis gegeben. Anschließend wurden 600 µl flüssiges LB-Medium pro Ansatz hinzu pipettiert und die Proben für ca. 1 Stunde bei 37°C auf einem Rad inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (8000 g, 1 min). Der Überstand wurde zum größten Teil verworfen, das Bakterienpellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert, auf einer LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.2 Kultur von *E. coli*

Für Mini-Präparationen wurden 5 ml LB-Medium, welches mit den passenden Antibiotika versetzt war, mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert.

2.6.3 Transformation von *A. tumefaciens*

Für die Transformation von GV3101 wurden *pGPTV*-basierte Konstrukte verwendet. *pGPTV* (Überlacker & Werr, 1996) Für die Transformation von Agrobakterien standen elektrisch kompetente Zellen zur Verfügung.

Für die Elektroporation wurden die kompetenten Zellen erst auf Eis aufgetaut und anschließend wurden 0,5 - 1 µl einer Plasmid-Lösung pro Aliquot hinzu pipettiert und die Probe 5 min auf Eis inkubiert. Elektroporationsküvetten wurden währenddessen auf Eis vorgekühlt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV. Nach dem elektrischen Puls wurden sofort 800 µl YEB- oder LB-Medium in die Küvette pipettiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Danach wurden die Proben für ca. 2 Stunden im Schüttelinkubator bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (5000 g, 5 min). Der Überstand wurde zum größten Teil verworfen und das Bakterienpellet in der restlichen Flüssigkeit wieder suspendiert. Die Lösung wurde anschließend ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

2.6.4 Kultur von *A. tumefaciens*

Zum Zwecke der Herstellung eines Infiltrationsmediums für die Transformation von *A. thaliana* wurden zunächst 2 ml YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit einer einzelnen Agrobakterien Kolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur benutzt, um 300 ml frisches LB-Medium anzuimpfen. Die Hauptkultur wurde dann wiederum über Nacht inkubiert und am nächsten Tag pelletiert

(5000 g, 15 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in so viel Infiltrationsmedium resuspendiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 erreicht wurde.

2.7 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*

2.7.1 Kultur

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert (22°C, 16h Licht).

2.7.2 Transformation

Die Transformation von *A. thaliana* Pflanzen geschah nach der *floral dip* Methode (Clough & Bent, 1998). Dabei wurde frisches Infiltrationsmedium angesetzt und ein Bakterienpellet darin resuspendiert. Danach wurden die Infloreszenzen der Pflanzen für 15 - 20 min in die Agrobakterien-Lösung getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen weiterkultiviert, bis die Samen gereift waren.

2.7.3 Doppel-Transformation

Alternativ zur Kreuzung zweier Linien wurden in *Arabidopsis* Pflanzen gleichzeitig zwei Konstrukten eingebracht. Dabei wurden zuerst zwei verschiedene Agrobakterien-Infiltrations-Kulturen (Treiberkonstrukt und Reporterkonstrukt) getrennt voneinander kultiviert. Danach wurden die beiden Infiltrationsmedien 1 : 1 gemischt und zur Transformation von *Arabidopsis* verwendet. Nach der Transformation wurden die Pflanzen wie gewohnt transformiert und die Samen (T0) weiterkultiviert.

2.7.4 Kreuzung von Pflanzen

Bei Blüten von Pflanzen einer Linie wurde unter einem Binokular das Androecium komplett entfernt und mit dem Pollen einer anderen Linie bestäubt.

2.7.5 Selektion und Anzucht transgener Pflanzen

Sobald die Samen transformierter oder gekreuzter Pflanzen abreifen, wurden sie geerntet und entweder auf Antibiotika-haltigen MS-Agar-Platten ausgesät oder direkt auf Erde.

2.7.6 Induktion transgener Pflanzen mit Dexamethason

Zur Induktion wurde eine DEX-Lösung mit der Endkonzentration 10 µm eingesetzt. Es wurde darauf geachtet die Versuchspflanzen gleichmäßig mit der Lösung zu benetzen.

2.8 GUS-Färbung

Gewebe, welche die bakterielle β-Glucoronidase herstellen sind in der Lage das farblose Substrat x-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure) zu spalten. Anschließend oxidiert es zu einen Indigofarbstoff.

Transgenes Pflanzengewebe wurde für die Gus-Färbung in Aceton-gefüllten Gefäßen gesammelt und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Aceton abgenommen und durch GUS-Lösung ersetzt. Wichtig war, dass man das Pflanzenmaterial vollständig mit der GUS-Lösung bedeckt hatte. Anschließend wurden die Gefäße in einen Exsikkator gestellt und mit Hilfe einer Pumpe ein Vakuum angelegt, was zum gleichmäßigen Infiltrieren der Gewebe mit der Lösung führte. Sobald Blasen in der Lösung aufstiegen, wurde die Pumpe abgestellt, der Exsikkator belüftet und erneut ein Vakuum angelegt. Insgesamt wurden die Proben auf diese Weise drei mal infiltriert.

2.9 Mikroskopie und Dokumentation

Hochauflösende Bilder und 3D-Aufnahmen (z-stacks) von Infloreszenzapices und Embryonen wurden mit einem konfokalen Mikroskop des Typs LSM 700 von Zeiss aufgenommen. Die analysierten Gewebe exprimierten eine an das ER adressierte Version des GFPs und/oder einen blauen Fluoreszenzfarbstoff (cerulean, CER). Das erGFP wurde mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 502 - 525 nm analysiert. Die Anregung des CER geschah mit einer Wellenlänge von 405 nm. Die Emission bei 390 - 460 nm analysiert. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Programme Imaris und Adobe Photoshop C5 bearbeitet.

2.10 Photodokumentation

Fotos wurden mit einer Canon Ixus aufgenommen.

2.11 Phylogenetische Analysen

Für phylogenetische Analysen von vollständigen Promotorsequenzen wurde das Programm mVISTA-(<http://genome.lbl.gov/vista/customAlignment.shtml>) benutzt. Die Analyse kürzerer Sequenzen (100 - 1000kb) wurde mit dem *alignment tool* des Programms VectorNTI getätigt. Genomische DNA Sequenzen des *DRNL*-Promotors verschiedener Brassicaceen- und von *Cleome* wurden folgenden Datenbanken entnommen: Phytozome (*A. lyrata*, *B. stricta*, *C. rubella*, *T. halophila*, *S. parvulum*), NCBI (*C. hassleriana*, *A. arabicum*).

Folgendermaßen wurden die *DRNL*-Promotor-Sequenzen anderer Spezies ermittelt: Zuerst wurden zwei Ankersequenzen bestimmt, die den *DRNL* Promotor in *A. thaliana* flankieren. Dazu wurde zum einen das offene Leseraster von *DRNL* (*At1g24590*) gewählt und zum anderen *At1g24610*, welches für eine Rubisco-Methyltransferase (*RMT*) kodiert. Dann wurde nach diesen beiden Ankersequenzen in den unterschiedlichen Brassicaceen-Genomen gesucht und die gesammelten Sequenzen anschließend miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Phylogenetische Analysen des *DRNL* Promotors

Die Promotorsequenzen von *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, *Boechera stricta*, *Schrenkiella parvula*, *Thellungiella halophila* und *Aethionema arabicum* wurden miteinander verglichen, um *cis*-regulatorische Elemente im *DRNL*-Promotor zu identifizieren.

Bei *Arabidopsis thaliana* findet sich im *DRNL*-Promotor ein kleines offenes Leseraster (*At1g24600*), das für ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Das stromaufwärts nächstgelegene Gen *At1g24610* kodiert für ein Protein aus der Rubisco-Methyltransferase-Familie. In den sieben analysierten Brassicaceen fanden sich *1g24610*, *1g24600* und *DRNL* in derselben Reihenfolge in einer mikrosyntänen Region. Trotz geringerer Konservierung fanden sich auch alle Elemente in der basalen Brassicacee *Aethionema arabicum*.

Die gesammelten Sequenzen wurden mit dem *online*-Programm mVISTA analysiert, dabei diente der Promotor von *Arabidopsis thaliana* als Bezug. Alle Bereiche, die eine Ähnlichkeit mit der *A. thaliana* Sequenz von $\geq 50\%$ aufweisen, sind in der folgenden Abbildung rosa dargestellt (Abb. 7). Neben *1g24600* und dem *DRNL*-Transkriptionsstart (grün umrandet, TS) wurden vier gut konservierte Regionen identifiziert (schwarz umrandet, Abb. 7), denen in Promotor-Deletionsexperimenten, die im nachfolgenden Abschnitt 3.2 präsentiert werden, Funktionen zugeteilt werden konnten. Sie wurden daher in *Enhancer1* (*En1*), *Quencher* (*Q*), *Enhancer2* (*En2*) und *Enhancer3* (*En3*) benannt. Zum besseren Verständnis werden die Namen der Elemente deshalb in diesem Kapitel eingeführt.

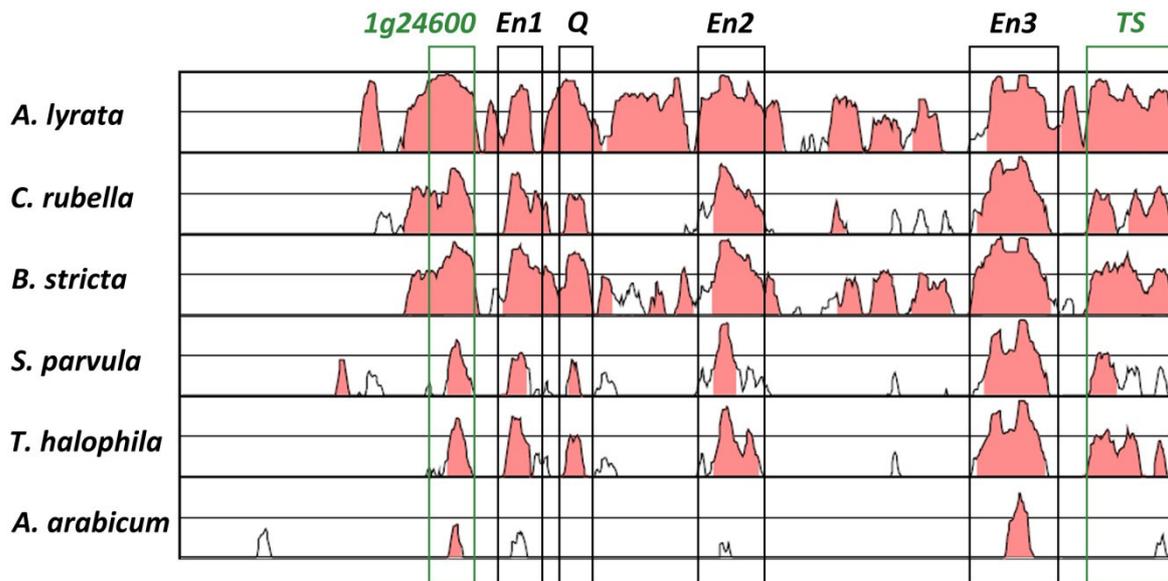


Abb. 7: mVISTA-Blot des intergenischen Bereichs zwischen *1g24610* und *DRNL* einiger Brassicaceen. Der Vergleich der restlichen Brassicaceen mit der *A. thaliana* Sequenz zeigt sechs Bereiche die gut konserviert sind. In der Darstellung sind das Leseraster von *1g24600* und der Transkriptionsstart (TS) grün umrandet. Verglichen mit den anderen Spezies weist *Aethionema arabicum* die geringste Konservierung auf und *En3* ist auf einen einzelnen *peak* reduziert.

3.1.2 Struktur und Aufbau der *Enhancer* Elemente im Detail

Mit Hilfe des *Alignment tools* des Programms Vector NTI wurden die Sequenzen der *Enhancer* der Brassicaceen-Spezies weiter analysiert, um die *Enhancer* Elemente auf eine bestimmte Basenpaarsequenz einzugrenzen. *A. arabicum* wurde zunächst ausgeklammert und in einem bilateralen Vergleich mit *A. thaliana* analysiert (siehe Anhang). Des Weiteren wurde die Internetdatenbank JASPAR (Mathelier et al., 2014) benutzt, um Transkriptionsfaktor-Bindemotive zu identifizieren. Eine vollständige Liste der JASPAR-Datenbankanalyse findet sich im Anhang (Stand 2017). Im folgenden beziehen sich Distanzangaben in bp immer auf *Arabidopsis thaliana*.

a) *Enhancer 1 (En1)*

En1 wurde, basierend auf der Sequenzkonservierung zwischen den Spezies, auf einen Bereich -4197 bin -3944 stromaufwärts vom Transkriptionsstart eingegrenzt. In diesem Element findet sich bei *A. thaliana*, *A. lyrata* und *C. rubella* ein einzelnes AuxRE (GACA) 7 bp von einer G-Box (CACGTG) entfernt. Des Weiteren befindet sich in diesem Element eine GCC-Box. Bei *C. rubella* finden sich gleich zwei AuxREs nur 2 bp voneinander getrennt. *B. stricta* fehlt das AuxRE, die G-Box ist jedoch vorhanden. *S. parvula* und *T. halophila* fehlen diese beiden Elemente, bzw. der G-Box fehlt ein Nukleotid.

Im bilateralen Vergleich zwischen *A. thaliana* und *A. arabicum* konnte festgestellt werden, dass die G-Box zwar vorhanden ist, *A. arabicum* jedoch das AuxRE fehlt (Anhang).

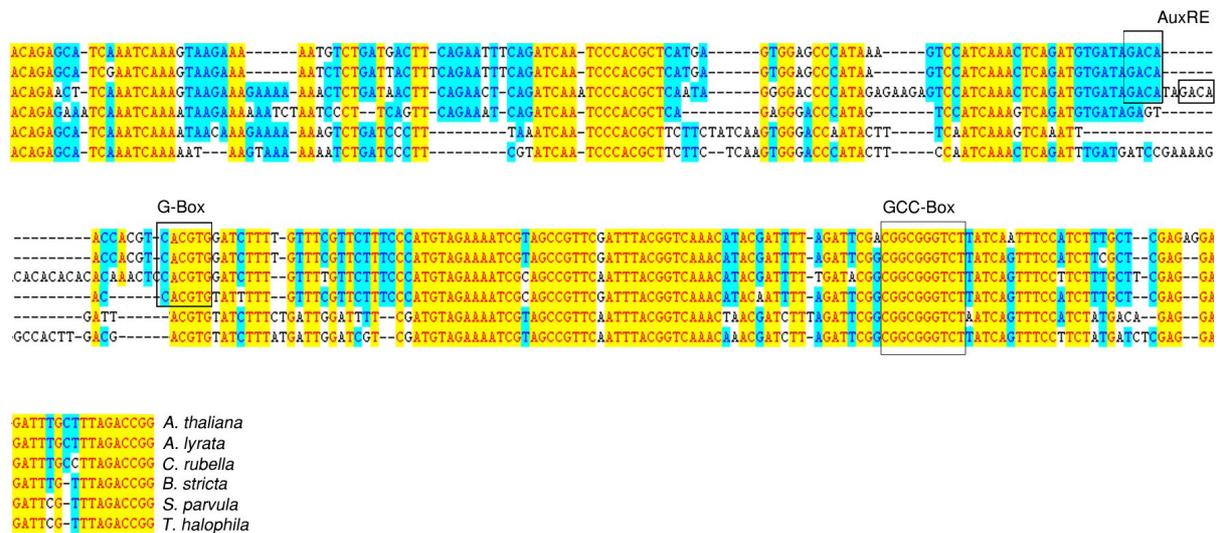


Abb. 8.: Vergleich der *En1* Sequenzen sechs verschiedener Brassicaceen
Erstellt mit dem *alignment tool* des Programms VectorNTI.

b) *Quencher (Q)*

Q liegt -3790 bis -3513 bp stromaufwärts vom TS, ist 277 bp lang und beinhaltet zwei AuxREs (Schwarze Kästen in Abb. 9), welche dieselbe Orientierung aufweisen und 73 bp voneinander entfernt sind. Bei *B. stricta* weist das distale AuxRE einen Basenaustausch auf (GACG statt GACA). Beide AuxREs sind ebenfalls bei *A. arabicum* vorhanden (Anhang).

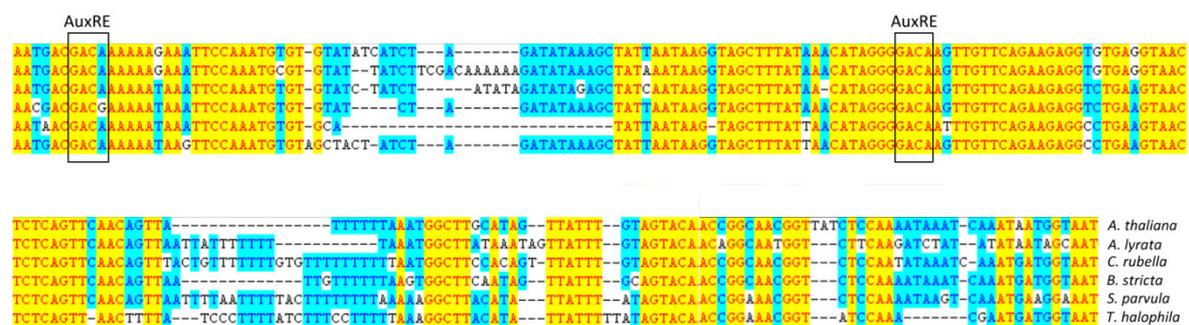


Abb. 9.: Vergleich von *Q* Sequenzen sechs verschiedener Brassicaceen
Erstellt mit dem *alignment tool* des Programms VectorNTI.

c) *Enhancer 2 (En2)*

En2 liegt -2560 bis -2372 bp stromaufwärts vom TS entfernt und besteht aus einer 188 bp langen Sequenz, welche eine stark konservierte 100 bp lange Kernsequenz (*En2^{core}*) beinhaltet. In der 100 bp Kernsequenz finden sich zwei entgegengesetzt orientierte AuxREs, die von einer 19 bp Sequenz getrennt werden, die bei allen Spezies invariant ist. Bei *A.*

arabicum ist nur das distale AuxRE vorhanden, das Proximale weist eine Insertion eines Nukleotids auf (Anhang). Des Weiteren sind in der Nachbarschaft der AuxREs jeweils schlechter konservierte G-Boxen lokalisiert.

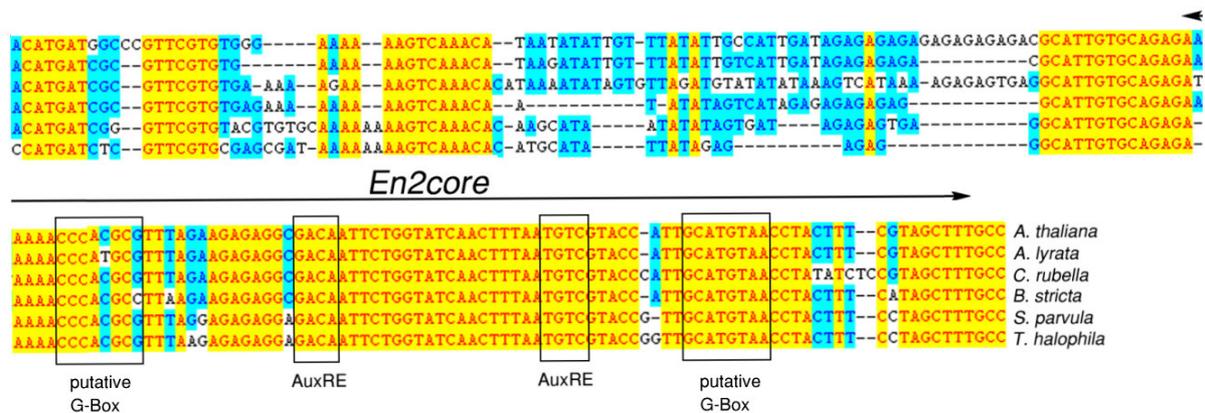


Abb. 10.: Vergleich der *En2* Sequenzen sechs verschiedener Brassicaceen
 Erstellt mit dem Programm VectorNTI.

d) *Enhancer 3 (En3)*

Dieser Enhancer setzt sich aus zwei größeren Elementen zusammen (*En3A* und *En3B*) und einem kleineren (*En3C*). *En3A* und *En3B* werden durch eine kurze, schlechter konservierte Sequenz (*Linker*) verbunden, deren Länge von Spezies zu Spezies variiert und bei *A. thaliana* 18 bp beträgt. In *En3A* findet sich ein kanonisches AuxRE (GAGACA) 4 bp von einer G-Box entfernt. *En3B* beinhaltet ein nicht kanonisches AuxRE und eine 50 bp lange Sequenz, die eine GCC-Box enthält. Alle Motive lassen sich bei *A. arabicum* ebenfalls nachweisen. Die GCC-Box von *A. arabicum* ist jedoch mit Einschüben kürzerer Extra-Sequenzen durchzogen (Anhang). Des Weiteren wurden *DRNL*-Promotoren anderer dikotyler Pflanzen, wie *A. coerulea*, *T. cacao.*, *V. vinifera.*, *R. communis*, *M. truncatula*, *P. trichocarpa*, *C. sinensis* und *S. tuberosum*, verglichen. Das einzige gemeinsame Element, das die aufgeführten Spezies mit dem *DRNL*-Promotor der Brassicaceen teilen, ist die ca. 50 bp große Sequenz, die die GCC-Box beinhaltet (Abb. 12).

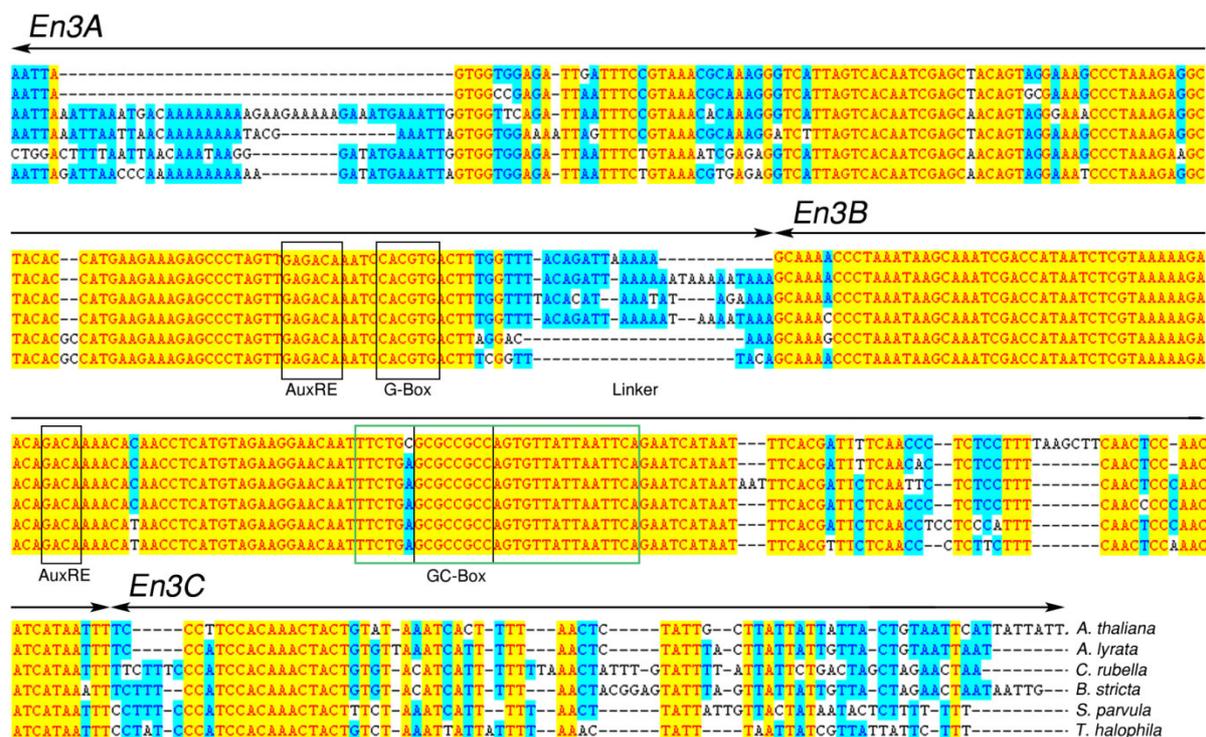


Abb. 11.: Vergleich der *En3* Sequenzen sechs verschiedener Brassicaceen
 Erstellt mit dem Programm VectorNTI.

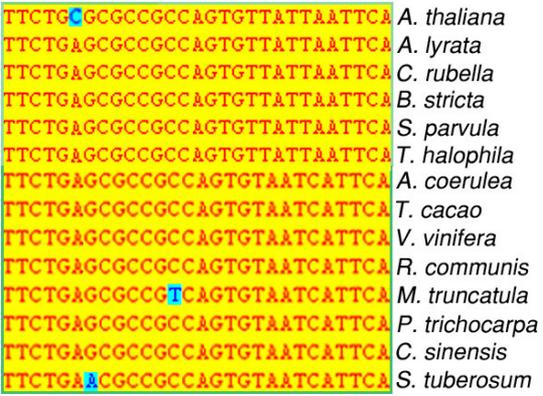


Abb. 12: Das GC-Box Motiv ist innerhalb der dikotylen Pflanzen stark konserviert Erstellt mit dem Programm VectorNTI.

3.1.3 Zusammenfassung

In allen untersuchten Brassicaceen findet sich dieselbe Abfolge der genomischen Elemente: *At1g24610-At1g24600-En1-Q-En2-En3-At1g25900* auf einer mikrosyntänen Region, die auch bei *Aethionema arabicum*, einer basalen Brassicacee, zu finden ist. Dabei unterscheiden sich die Länge der Gesamtpromotoren und die Distanzen der Elemente zueinander von Spezies zu Spezies, wobei der Abstand vom TS zu *En3* weniger variiert. Ebenso ist der Abstand von *Ig24600* zum *Ig24610* Stopcodon in den untersuchten Genomen ähnlich lang.

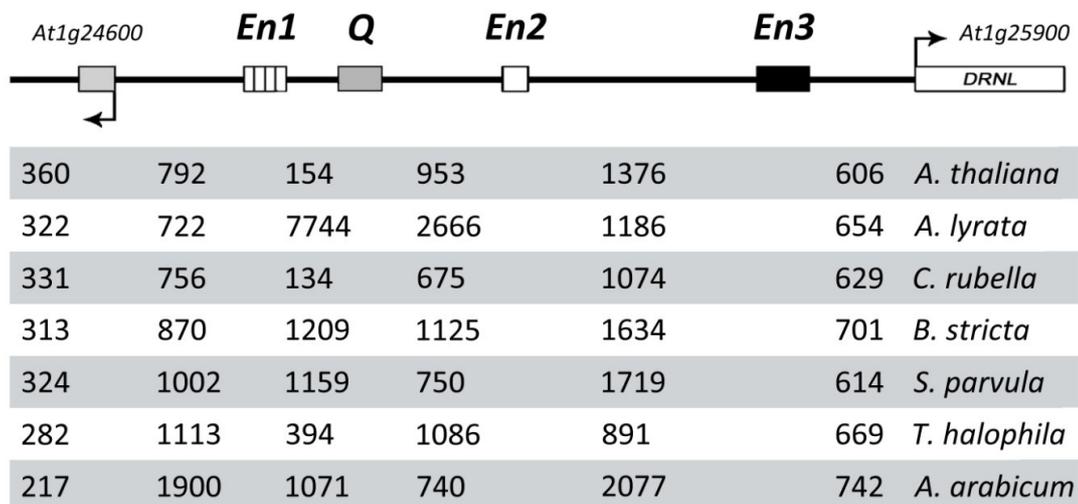


Abb. 13: Distanzen der Promotorelemente in den unterschiedlichen Spezies
Die Längenangaben sind in bp angegeben.

3.2 Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente mit Hilfe von Promotordeletionen

Um die Funktion der konservierten *DRNL*-Promotor Elemente zu analysieren und weitere *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren wurde eine Reihe von Promotorkonstrukten erstellt, die interne oder externe Deletionen aufwiesen. Diese Konstrukte wurden benutzt, um die Expression eines erGFP-Reporters anzutreiben und entweder in Col-0 oder in die Linie *DRNL::CERULEAN* (CER) (Cole et al., 2013) eingebracht. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden 3-D Aufnahmen von IMs und FMs bis zum Stadium 5 sowie von Embryonen der transgenen Pflanzen gemacht und anschließend analysiert. Dieses Projekt wurde in einer Zusammenarbeit mit Petra Comelli durchgeführt.

3.2.1 Externe *DRNL*-Promotordeletionen belegen die Präsenz von drei *Enhancer* Elementen

Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der analysierten Konstrukte (Abb. 14). Im folgenden wird der Gesamtpromotor als *DRNL_{Long}* oder "L" bezeichnet.

Δ^{EX4} , *DRNL_{Short}*, oder "S", bezeichnet ein Promotorkonstrukt, dem die Elemente *At1g24600*, *En1* und *Q* fehlen und diente als Basis für weitere Konstrukte, die in den nachfolgenden Kapiteln präsentiert werden.

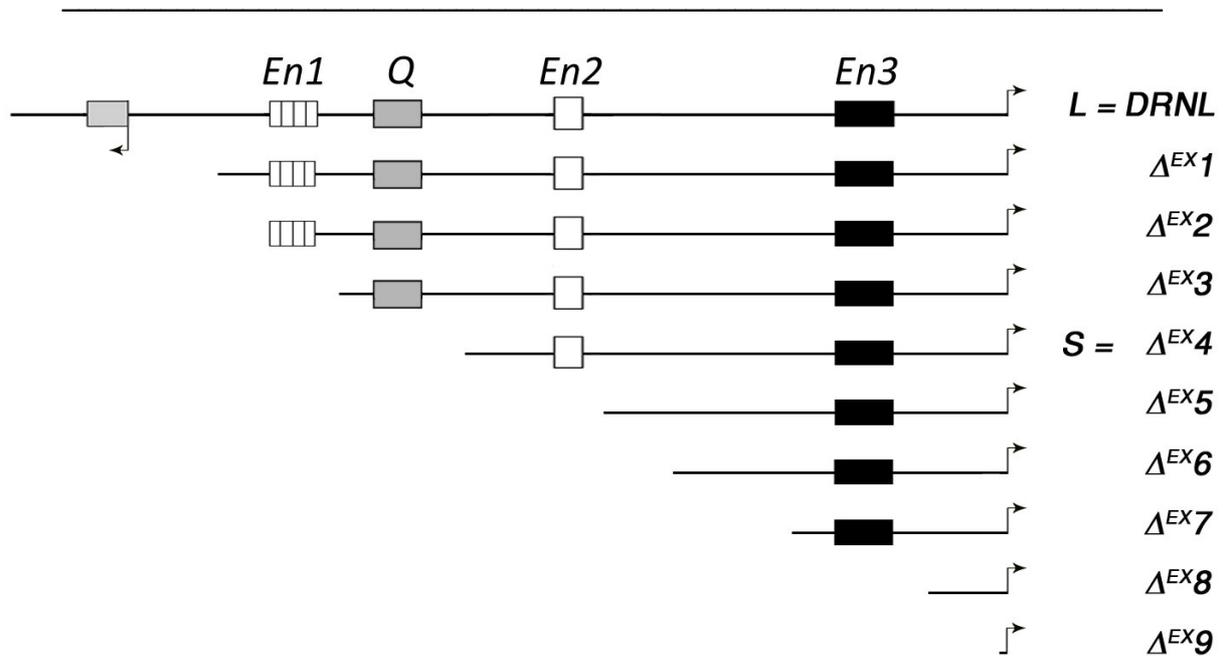


Abb. 14: Eine Übersicht der Serie externer Deletionen des *DRNL*-Promotors

Die Serie externer Deletionen zeigt, dass die im phylogenetischen Vergleich identifizierten, konservierten Bereiche unterschiedliche Funktionen erfüllen. Das kleine offene Leseraster *At1g24600* hatte scheinbar keinen Einfluss auf das Expressionsmuster, denn wenn es entfernt wurde, blieb das Muster des Reporters wildtypisch (Δ^{EX1} und Δ^{EX2} , Abb. 15 A1-A3).

Die Deletion von *En1* in Δ^{EX3} führte dagegen zum Verlust des erGFP Signals in den sichelförmigen Feldern (FMs Stadium 2), welche die Petalen und lateralen Stamen vormustern. Des Weiteren resultierte die Deletion in einem Verlust in der Signalstärke in der ringförmigen Domäne (FM Stadium 3), welche die medialen Stamen vormustert (Abb. 15 B1-B3). Wurde neben *En1* auch noch *Q* deletiert (Δ^{EX4}), führte dies zu keiner weiteren Veränderung des erGFP Signals.

Alle externen Deletionskonstrukte, denen *En2* fehlte (Δ^{EX5-7}), zeigten weiterhin einen Verlust des Signals in der IM Peripherie und den Sepalengründerzellen (Abb. 15 C). Die Expression blieb jedoch weiter in Stadium 3 und 4 FMs in der ringförmigen Domäne sowie in FMs des Stadium 5 an den Positionen der lateralen und medialen Stamen bestehen. Darüber hinaus zeigte das Deletieren von Sequenzen bis zum *En3* keine weiteren Effekte. Entfernte man Sequenzen, welche *En3* beinhalten (Δ^{EX8}) oder bis an die TATA-Box reichten (Δ^{EX9}), kam die Expression des erGFP-Reporters vollständig zum Erliegen (Abb. 15 D).

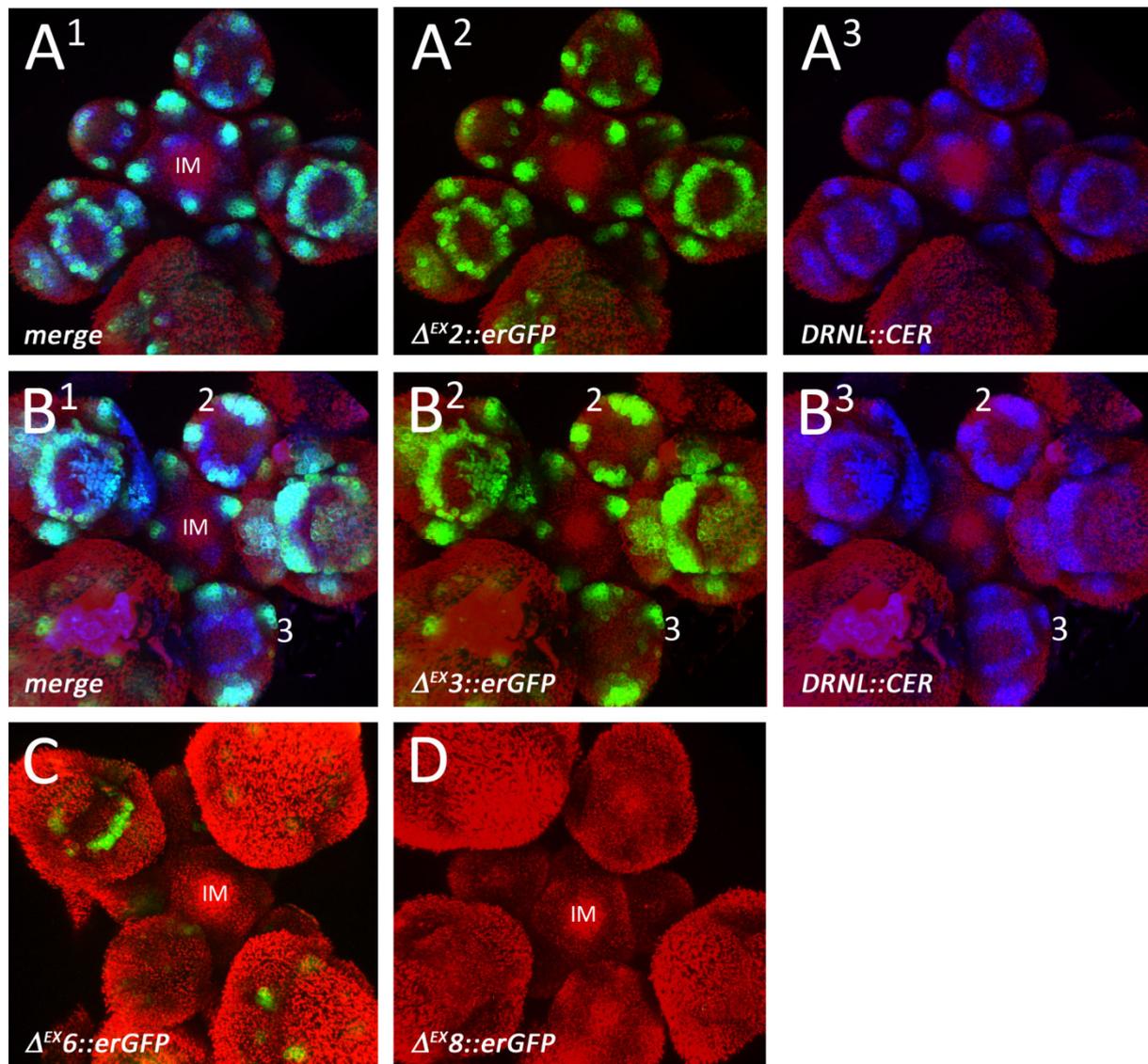


Abb. 15: Expressionsmuster repräsentativer externer Deletionskonstrukte: Konfokale Aufnahmen von Infloreszenzapices in Aufsicht

(A1) Expression von $\Delta^{EX2}::erGFP$ im *DRNL::CER* Hintergrund. (A2) *erGFP* (grün), (A3) *DRNL::CER* (blau), (B1) Expression von $\Delta^{EX3}::erGFP$ im *DRNL::CER*-Hintergrund. (B2) *erGFP* (grün), (B3) *DRNL::CER* (blau). Man vergleiche FM's des Stadium 2 und 3 untereinander (B2, *erGFP* und B3, *CER*) (C) Expression von $\Delta^{EX6}::erGFP$ in Col-0. (D) Expression von $\Delta^{EX8}::erGFP$ in Col-0.

Die externen Deletionen belegen, dass die drei Elemente spezifische Aufgaben erfüllen. *En1* ist zuständig für die Expression in der sichelförmigen Domäne, die Petalen und laterale Stamen vormustert (Stadium 2). *En2* ist in der IM-Peripherie und den Sepalengründerzellen (Stadium 1 und 2) aktiv. *En3* ist in der ringförmigen Domäne, aus der die medialen Stamen hervorgehen (Stadium 3), aktiv und mustert in späteren Stadien (4-5) auch die lateralen Stamen. *Q* und der proximale Promotor tragen scheinbar nicht zum Expressionsmuster bei.

3.2.2 Interne Deletionen belegen Interaktionen zwischen den Enhancern

Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der Konstrukte (Abb. 16). Dabei wurden sowohl in der langen Version des Promotors (*L*, 5,6 kb) als auch in der kurzen Version (*S*, 3,4 kb) eine 400 bp Sequenz, die *En2* beinhaltet, und eine 800 bp Sequenz, die den *En3* beinhaltet, entfernt. Es wurde weiterhin im Gesamtpromotor eine interne Deletion erzeugt, bei der das 277 bp große *Q*-Element entfernt wurde.

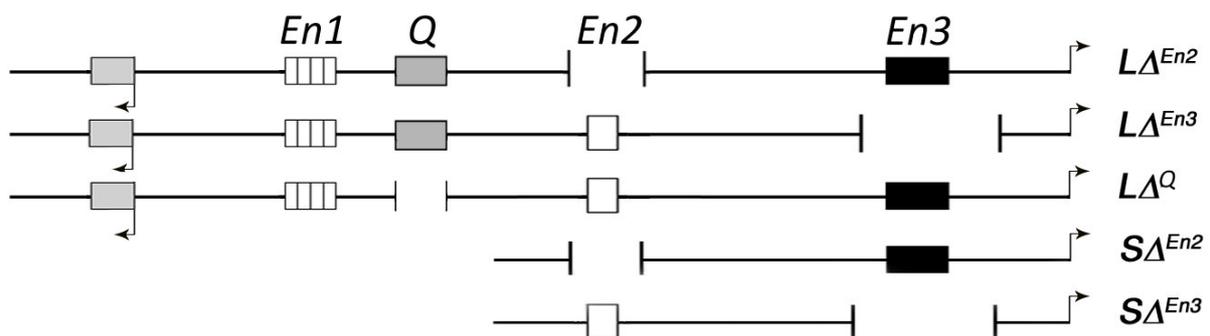


Abb. 16: Übersicht über die internen Promotordeletionen

Die Analyse der einzigartigen Beiträge der Enhancer zeigte, dass sie teilweise redundant arbeiten. Bei $L\Delta^{En2}$ führte die interne Deletion des *En2* zu einem Verlust des erGFP Signals in den Sepalengründerzellen in FMs ab dem Stadium 3 (Abb. 17 A). In jüngeren FMs (Stadium 1 und 2) und in der IM Peripherie blieb die Expression wildtypisch. Die interne Deletion wirkte sich daher nur auf die späte Morphogenese der Sepalen aus und unterschied sich so vom Expressionsmuster der externen Deletion Δ^{EX6} , bei der sowohl die Expression in der IM-Peripherie als auch die Expression in den Sepalengründerzellen aller Stadien verloren ging. Die interne Deletion $S\Delta^{En2}$ hatte den selben Effekt, wie Δ^{EX5} (Abb. 15 C und 17 B) und zeigt, dass *En1* und *En2* redundant bei der Expression in der IM-Peripherie und den Sepalengründerzellen arbeiten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für *En3* gemacht, dessen Deletion in $S\Delta^{En3}$ zu einem Verlust der ringförmigen Domäne in FMs des Stadium 3 führte. Die Expression in FMs des Stadium 4 und 5, wenn die ringförmige Domäne sich in einzelne Signale auflöst, blieb wildtypisch (Abb. 17 C). Bei $L\Delta^{En3}$ kam es jedoch nicht zum Signalverlust in den medialen Stamen, sondern zu Veränderungen in der Signalstärke gewisser Expressionsdomänen relativ zueinander.

In der doppelt-transgenen Linie (Abb. 17 D¹-D³) sind die Expressionsdomänen des Wildtyps in ihrer Signalstärke zueinander relativ gleich (Abb. D¹, *DRNL::CER*). Der Vergleich von Abb.17 D¹ und D² zeigte, dass das Signal des Deletionskonstrukts $L\Delta^{En3}$ (Abb. 17 D²) in der IM-Peripherie stärker, als bei den umgebenden Signalen war. *En3* bedient demzufolge nicht nur das Expressionsmuster in den medialen Stamen (vgl. mit Δ^{EX6}), er spielt demnach auch eine Rolle bei der Abstimmung der Expressionsstärken der morphogenetischen Felder zueinander. Die Anwesenheit von *En1* maskiert auch hier wieder einzigartige Beiträge von *En3*. Auch die Deletion der 277 bp großen *Q* Sequenz im Gesamtpromotor führte ebenfalls nicht zum Verlust von Signalen, sondern, ähnlich wie bei $L\Delta^{En3}$, zu Veränderungen in Signalintensitäten der Expressionsdomänen zueinander. Bei $L\Delta^Q$ (Abb. 17 E², GFP) wiesen die sichelförmigen Domänen (Stadium 2), das Signal in den ab- und adaxialen Sepalen (Stadium 2) und die ringförmige Domäne (Stadium 3) ein stärkeres erGFP-Signal relativ zur IM-Peripherie und den lateralen Sepalen auf (vgl. Abb. 17 E¹ mit E²). Das stark konservierte Element *Q* erfüllt also ebenfalls eine Funktion, jedoch nicht bei der Musterbildung, sondern ausschließlich bei der Regulation der Expressionsstärken der oben genannten morphogenetischen Felder. Es wurde daher *Quencher* benannt, um ihn von den drei musterbildenden Elementen zu unterscheiden.

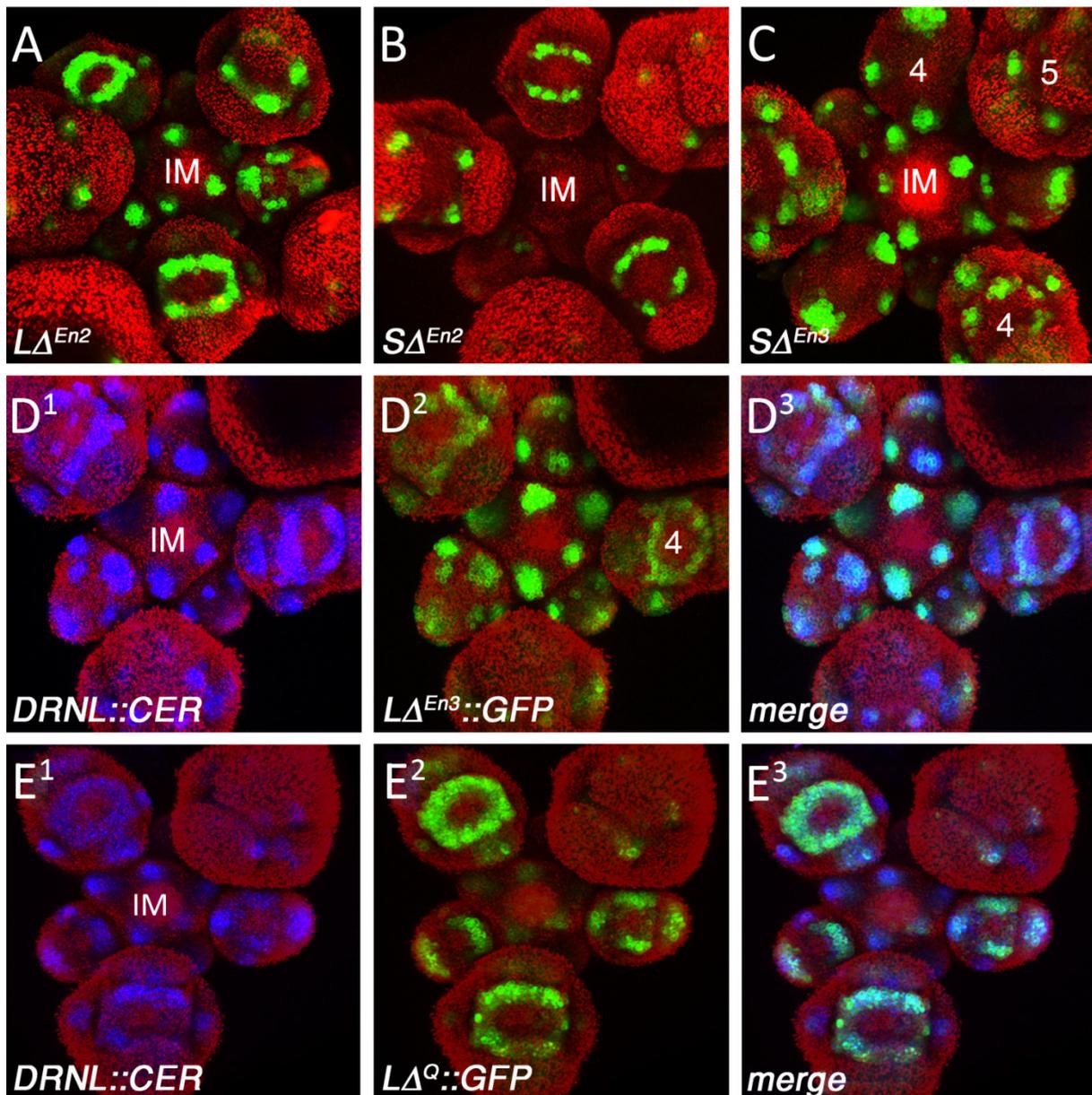


Abb. 17: Expressionsmuster repräsentativer interner Promotordeletionskonstrukte: Konfokale Aufnahmen von Infloreszenzapices

Auswirkungen der Deletion von *En2* auf das Expressionsmuster im Gesamtpromotor (A) $L\Delta^{En2}::erGFP$ (grün) und in Abwesenheit von *En1* (B) $S\Delta^{En2}::erGFP$ (grün). Auswirkungen der Deletion von *En3* auf das Expressionsmuster in Abwesenheit von *En1* (C) $S\Delta^{En3}::erGFP$ (grün) und im Gesamtpromotor (D1-D³), (D¹) $DRNL::CER$, (D²) $L\Delta^{En3}::erGFP$ (D³) Überlagerung von GFP und CER. (E¹-E³) Auswirkung der Deletion von *Q* auf das Expressionsmuster, (E¹) $DRNL::CER$, (E²) $L\Delta^Q::erGFP$ (grün), (E³) Überlagerung von erGFP und CER. (Fotos A-D³ von P. Comelli)

3.2.3 Rettungsexperimente

In der folgenden Abbildung sind die Konstrukte, die im Rahmen der Rettungsexperimente kloniert wurden, schematisch dargestellt. Dabei wurden in die Deletionskonstrukte $S\Delta^{En2}$ und $S\Delta^{En3}$ kleinere Fragmente zurückgebracht (Abb. 18). In das Konstrukt $S\Delta^{En2}$ wurde die 100 bp große *En2*-Kernsequenz kloniert ($En2^{core}$) und drei sich überlappende, 50 bp große

Subfragmente der Kernsequenz (*En2D*, *E*, *F*). In die Konstrukte $L\Delta^{En3}$ und $S\Delta^{En3}$ wurden jeweils vier Fragmente zurückgebracht. Das Fragment *En3ABC* umfasst dabei den gesamten Bereich, der bei den phylogenetischen Analysen als *En3* identifiziert wurde und ist 390 bp groß. *En3A*, *B* und *C* sind unterschiedlich große Subfragmente des *En3* (Abb. 11).

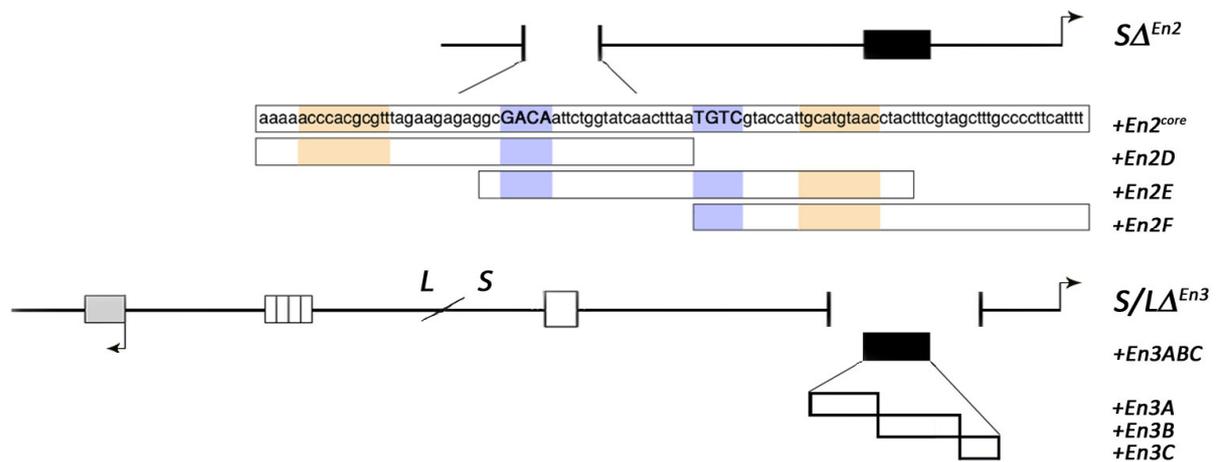


Abb. 18: Schematische Darstellung der Promotor-Konstrukte der Rettungsexperimente. Die AuxREs in der $En2^{core}$ -Sequenz sind blau markiert und die G-Boxen orange.

In den folgenden Rettungsversuchen wurde mit der 400 bp Deletion $S\Delta^{En2}$ gearbeitet. Wie die vorangegangenen Experimente (3.2.2) gezeigt haben kann die Anwesenheit des *En1* Effekte maskieren. Um dies auszuschließen wurde die kürzere Promotorversion ($\Delta^{EX4} = S$) verwendet.

Das Wiedereinbringen der 100 bp Kernsequenz in die 400 bp große Deletion ($S\Delta^{En2} + En2^{core}$) war in der Lage das Expressionsmuster in den Sepalengründerzellen und der IM-Peripherie wiederherzustellen. Es entsprach somit dem Muster, das von Δ^{EX4} erzeugt wird (vgl. Abb. 19 A und B). Von den kleineren Subfragmenten der Kernsequenz (*En2D*, *E*, *F*) war nur das mittlere Fragment *En2E*, welches als einziges beide AuxREs beinhaltet, in der Lage die Expression wiederherzustellen. Dies gelang jedoch nur in 11 von 17 analysierten Pflanzenlinien, wobei die Expression in den Sepalengründerzellen schwächer war (Abb. 17 C).

Nur der vollständige 390 bp *En3* (*En3ABC*) war in der Lage die Expression in der ringförmigen Domäne in FMs des Stadium 3, welche die medialen Stamen vormustert, in $S\Delta^{En3}$ wiederherzustellen (vgl. Abb. 19 D¹ und D² mit E¹ und E¹). Die kleineren Fragmente *En3A* und *En3B* führten zwar zu einer schwachen Zunahme des Signals in Stadium 3 FMs (vgl. Abb. 19 F mit D¹ und D²), allerdings war das Signal einzellig und erreichte nie die

Qualität wie bei Δ^{EX4} (Abb. 19 F). $En3C$ war dagegen nicht in Lage Aspekte der Expression wiederherzustellen. Sein Expressionsmuster entsprach dem von $S\Delta^{En3}$.

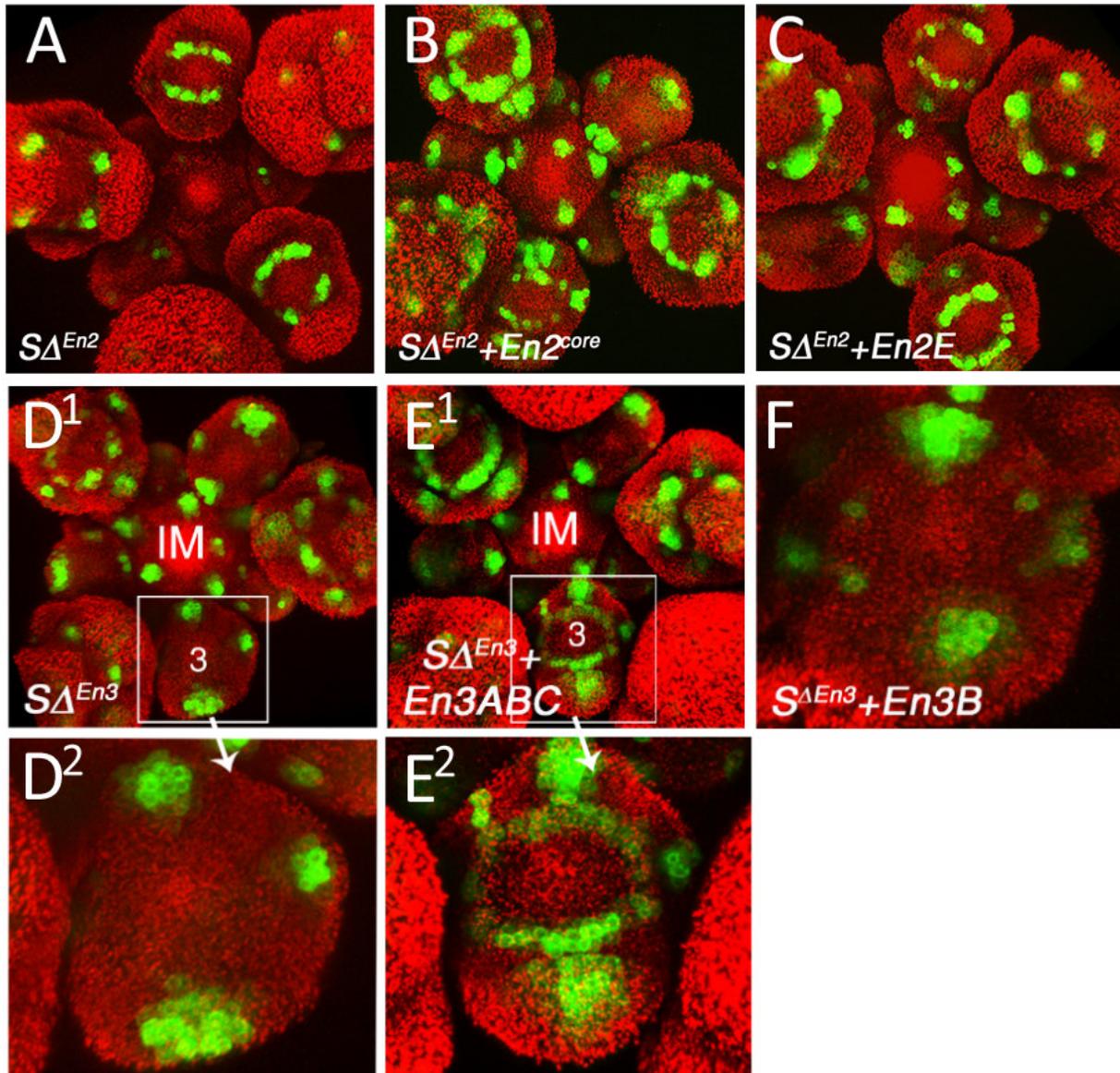


Abb. 19: Expressionsmuster repräsentativer Promotordeletionskonstrukte:

Konfokale Aufnahmen von Infloreszenzapices

Man vergleiche (A) $S\Delta^{En2}::erGFP$ (grün) mit (B): Die 100 bp Kernsequenz in $S\Delta^{En2}::erGFP+En2^{core}$ ist in der Lage das Expressionsmuster wiederherzustellen. (C) Teilweise gelingt eine Rettung mit dem 50 bp Subfragment $En2E$ in $S\Delta^{En2}::erGFP+En2E$, (D1) Deletion von $En3$ in $S\Delta^{En3}::erGFP$, (D2) Vergrößerung eines Stadium 3 FMs. (E1) Wiederherstellung des Expressionsmusters mit dem 390 bp Fragment $En3ABC$ in $S\Delta^{En3}+En3ABC$ (E2) Vergrößerung eines Stadium 3 FMs. (F) $S\Delta^{En3}+En3B::erGFP$: Subfragmente von $En3$, wie $En3B$ sind nicht in der Lage das Expressionsmuster wiederherzustellen. (Fotos A-B und D¹-E² von P. Comelli)

3.2.4 Einführung von Punktmutationen in die *Enhancer*

Es wurde eine Serie von Konstrukten erstellt, bei der putative Transkriptionsfaktor-Bindemotive in den *Enhancer*-Elementen des *DRNL*-Promotor mutiert wurden. Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der analysierten Konstrukte (Abb. 20).

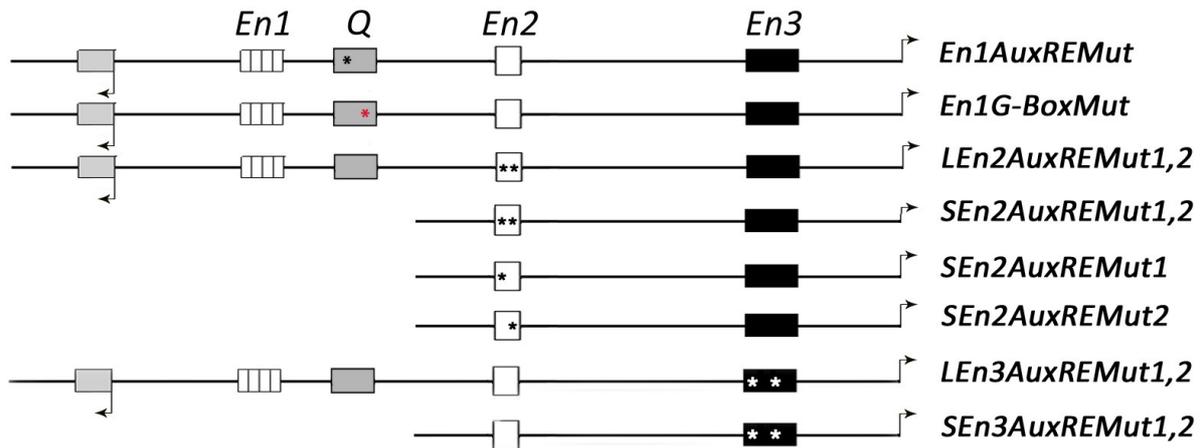


Abb. 20: Schematische Darstellung der Promotor-Konstrukte mit Punktmutationen

Im *Enhancer 1* wurde zunächst eine einzelne Punktmutation in das AuxRE eingeführt bei der die Sequenz GACA in GCCA verändert wurde (*En1AuxREMut*, s.o.). Trotz der Punktmutation blieb das Expressionsmuster des erGFP-Reporters wildtypisch (Abb. 21 A).

In einem weiteren Konstrukt wurde anschließend die G-Box mutiert (CACGTG → CCCGGG). Eine Mutation in diesem Motiv führte in 5 von 9 der analysierten Linien zu einer diskontinuierlichen Expression in der ringförmigen Domäne bei FMs des Stadium 3 und erinnerte an die externe Deletion Δ^{EX3} (vgl. Stadium 3 FMs in Abb. 21 B mit A oder Abb. 15 B²). Bei dieser Punktmutation gab es jedoch, im Gegensatz zu Δ^{EX3} , keinen Verlust des sichelförmigen Felds in Stadium 2 FMs (Abb. 15 B²).

Konstrukte wurden erstellt, bei denen beide AuxREs von *En2* gleichzeitig im Hintergrund des langen Promotors (*LEn2MutAuxRE1,2*) und in der kurzen Version mutiert wurden (*SEEn2MutAuxRE1,2*). Bei *LEn2AuxREMut1,2* zeigte sich keine Änderung des Expressionsmusters (Abb. 21 C), bei *SEEn2AuxREMut1,2* verursachten die Mutationen jedoch einen Verlust der Expression in der IM-Peripherie und den Sepalengründerzellen (Abb. 21 D), was an die externe Deletion Δ^{EX5} oder die interne $S\Delta^{En2}$ erinnert (vgl. z.B. Abb. 19 A).

Um aufzuschlüsseln, ob beide AuxREs oder nur ein einzelnes an der Expression in der IM-Peripherie beteiligt sind wurden daher noch zwei weitere Konstrukte erstellt, bei denen die AuxREs einzeln mutiert wurden (*SEEn2AuxREMut1* und *SEEn2AuxREMut2*). Wurde das distale

AuxRE1 mutiert, führte das zum Signalverlust in der IM-Peripherie. Die Expression des Reporters in den Sepalengründerzellen blieb jedoch weiterhin bestehen, jedoch schwächer, als bei *DRNL_{Short}*. Dagegen brachte eine Mutation im proximalen AuxRE2 die Expression des Reporters im IM und den Sepalen nicht zum Erliegen, schwächte sie jedoch (Abb. 21 F).

Nur die Mutation im distalen AuxRE1 führte also zu einem Verlust des Expressionsmusters (IM-Peripherie). Die Mutation vom proximalen AuxRE2 wirkten sich dagegen nur quantitativ auf das Expressionsmuster aus. Weiterhin hatte die gleichzeitige Mutation beider AuxREs im *En2* schwerwiegendere Folgen und führte zusätzlich noch zum Verlust des Signals in den Sepalen. Beide AuxREs scheinen daher teilweise redundant zu wirken, zumindest in den Sepalengründerzellen.

Die beiden Punktmutationen in *En3* hatten im kurzen Promotor (*SEn3MutAuxRE*) keinerlei detektierbare Auswirkungen auf die Expression des erGFP-Reporters, so dass das Expressionsmuster wildtypisch blieb. Die Mutationen im Gesamtpromotor (*LEn3AuxREMut*) erinnerten jedoch an die interne Deletion von *En3* in *LΔ^{En3}*. Wurde *En3* im Gesamtpromotor entfernt, so änderte sich die Signalstärke in der ringförmigen Domäne in FMs des Stadium 3 (vgl. Abb. 21 G und H mit K). Dieser Effekt ließ sich deutlicher in den Intensitätsdiagrammen in Abb. 21 I und J beobachten. Abb. 21 I zeigt die Signalstärken im IM und den medialen Stamen von *DRNL_{Long}*. Die Deletion von *En3* (Abb. 21 J) oder die Mutation beider AuxREs schwächte die Signalstärke in der ringförmigen Domäne ab, hatte aber keine Auswirkungen auf die Expression im IM.

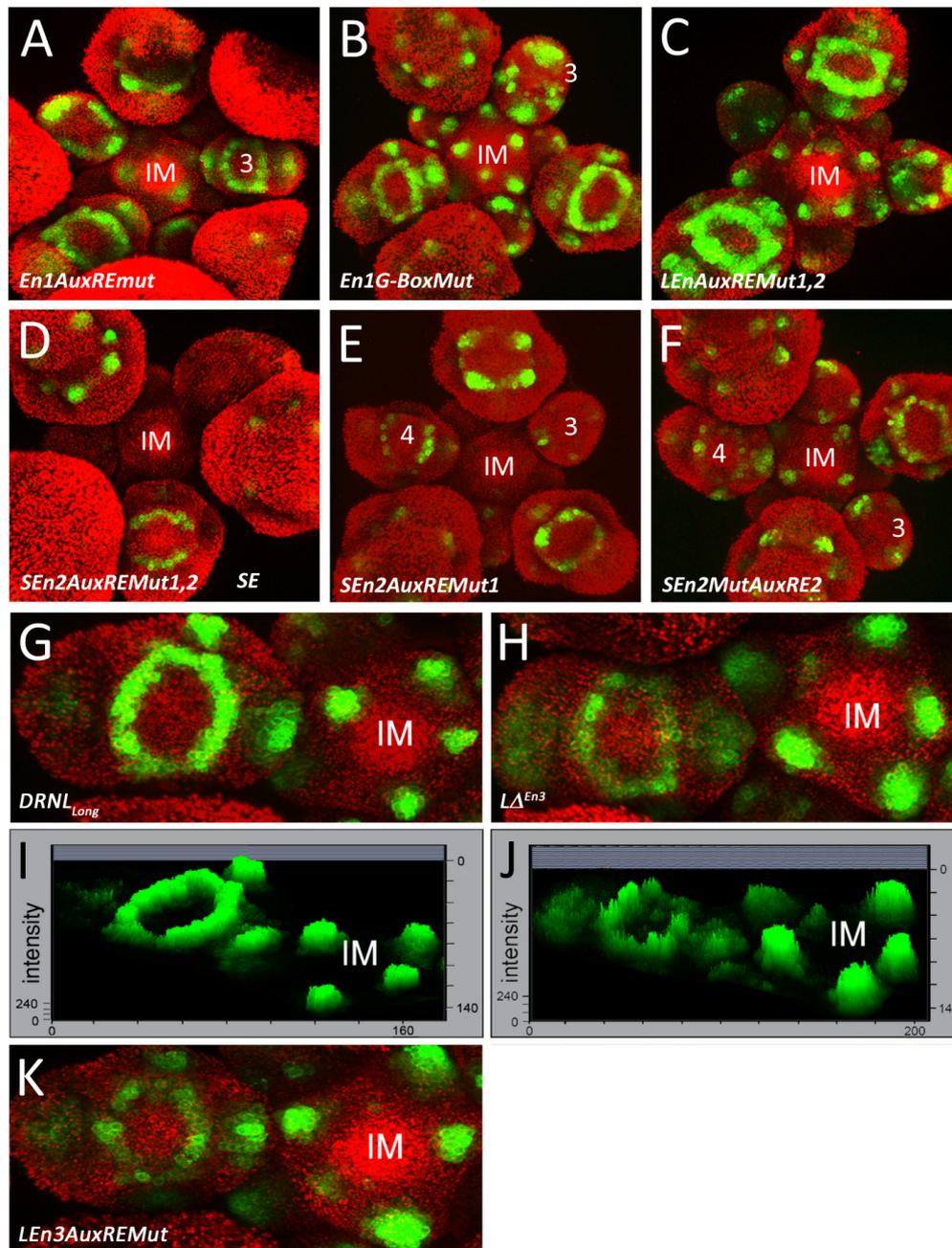


Abb. 21: Auswirkungen von Punktmutationen in den Enhancern auf das Expressionmuster: Konfokale Aufnahmen von Infloreszenzapices und Intensitätsdiagramme
 (A) Die Punktmutation in dem AuxRE in *En1* hatte keine Auswirkungen auf das Expressionsmuster. (B) Die Punktmutation in der G-Box wirkte sich auf die Expression in der ringförmigen Domäne in Stadium 3 FMs aus (vgl. FMs des Stadium 3 in A und B), (C) Die Mutation beider AuxREs in *En2* im Gesamtpromotor (*LEn2AuxREMut1,2*) zeigte keine Änderungen des Expressionsmusters. (D) Im Gegensatz dazu führten Punktmutationen im kurzen Promotor (*SEn2AuxREMut1,2*) zum Verlust der Expression in der IM-Peripherie und den Sepalengründerzellen. (E) Eine Einzelmutation des distalen AuxRE1 führte ebenfalls zum Verlust des IM-Signals. (F) Die Mutation in dem proximalen AuxRE2 führte zu keinem Signalverlust im IM. (G) Nahaufnahme eines Stadium 3 FMs und des IMs, in denen *DRNL_{Long}::erGFP* exprimiert wurde. (H) Die Deletion von *En3* im Gesamtpromotor (*LΔ^{En3}*) führte zu einer Reduktion der Signalintensität in der ringförmigen Domäne in Stadium 3 FMs. (I und J) sind zu den Abbildungen (G und H) dazugehörige Intensitätsdiagramme. (K) Eine Mutation beider AuxREs im Gesamtpromotor hatte dieselben Auswirkungen, wie die Deletion von *En3* in *LΔ^{En3}* (man vergleiche K und H). (Fotos G-K von P. Comelli)

3.2.5 Die Rolle von *En2* bei der Expression im Embryo

Der *DRNL*-Promotor wird ab dem globulären Stadium aktiv und umfasst anfangs den kompletten apikalen Teil des globulären Embryos. Im späten globulären Stadium fokussiert sich die Expressionsdomäne auf zwei Punkte, an denen die Kotyledonen angelegt werden. Die Expression in den Kotyledonen bleibt bis ins Krückstock-Stadium bestehen und umfasst anfangs die L1-Schicht, beschränkt sich jedoch während des Torpedo-Stadiums auf die L2 (Abb. 22 A¹ - A⁶).

Insgesamt hatten nur Modifikationen in *En2* und *En3* eine Auswirkung auf die *DRNL*-Expression im Embryo. Die Modifikationen bezüglich *En3* werden im nächsten Abschnitt näher betrachtet. Alle *En2*-assoziierten Konstrukte und ihre Auswirkung auf die Expression in den Stadien der Embryogenese sind in Abb. 22 C zusammengefasst.

Dabei liefert *En2* den Großteil der Information über das Expressionsmuster des Embryo, denn bei einer Deletion von *En2* kamen die erGFP Signale im Embryo fast vollständig zum Erliegen (repräsentative Bilder in Abb. 22 B¹ - B⁶). Dies war der Fall bei den externen Deletionen Δ^{EX5} - Δ^{EX9} und den beiden internen Deletionen $L\Delta^{En2}$ und $S\Delta^{En2}$. Bei den letzt genannten Konstrukten tauchten jedoch in seltenen Fällen schwache, einzellige Signale im Herz- und im frühen Torpedo-Stadium auf (Abb. 22 D), die jedoch nie die L1 umfassten (vgl. Abb. 22 D mit A⁴). Die Expression in den Blattprimordien kam wenn *En2* entfernt wurde nie zum Erliegen (Abb. 22 B⁶).

Das Wiedereinbringen der 100 bp Kernsequenz *En2^{core}* in $S\Delta^{En2}$ war in der Lage die Expression des erGFPs vollständig in allen Stadien zu retten (Abb. 22 C). Es zeigte sich, dass die *En2^{core}* ausreichend für die embryonale Expression ist, jedoch nicht weiter fragmentiert werden kann. Von den 50 bp großen Subfragmenten *En2D*, *E*, *F* war nur *En2E*, welches beide AuxREs beinhaltet, in der Lage die Expression zu retten, jedoch nur im späten Torpedo- und im Krückstockstadium (Abb. 22 E). Des Weiteren verursachte das Konstrukt $S\Delta^{En2}+En2D$ eine ektopische Expression im Endosperm (Abb. 22 F).

Die Mutation beider AuxREs in *En2* (*SEn2AuxREMut1,2*) führte zu einem Verlust des erGFP-Signals im frühen globulären und dem Krückstock-Stadium sowie zu einer Reduktion der Signalintensität im Herz, im frühen und späten Torpedo-Stadium (repräsentative Bilder in Abb. 22 G und H). Eine schwächere Expression in den drei Stadien war auch bei beiden Einzelmutationen von *En2* der Fall. Allerdings blieb die Expression im frühen globulären Stadium bestehen wenn nur ein einzelnes der beiden AuxREs mutiert wurde, was zeigt, dass beide AuxREs in diesem Stadium redundant arbeiten. Die Mutation im distalen AuxRE1 hatte

des Weiteren keine Auswirkung auf die Expression im Krückstockstadium, im Gegensatz zur Mutation im proximalen AuxRE2. Die Mutation des distalen Elements führte dazu, dass sich auf die Expressionsdomäne in den Kotyledonen im späten Torpedo und im Krückstockstadium ausdehnte und auch nun die L1 einschloss (Abb. 22 I).

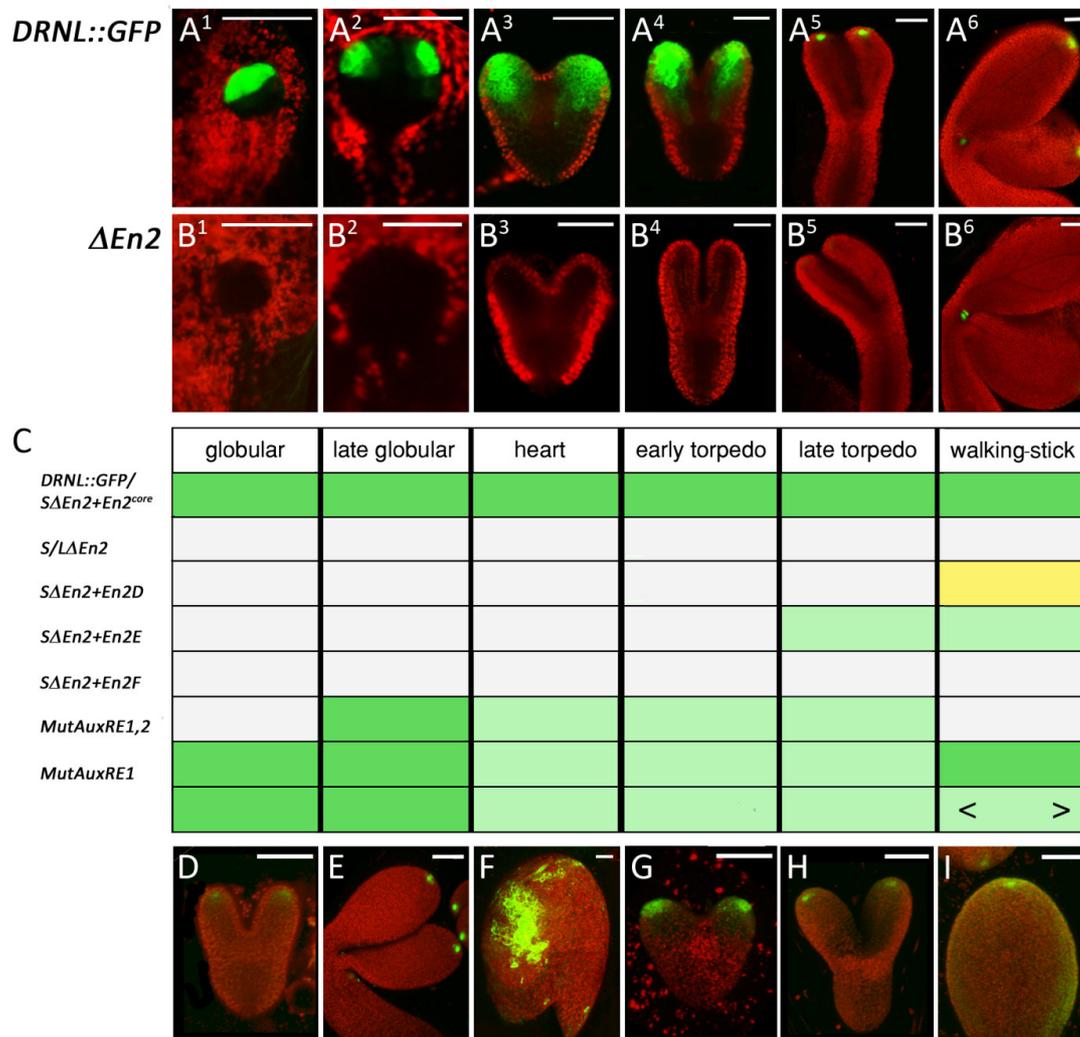


Abb. 22: *DRNL::erGFP* Expression im Embryo und Auswirkungen der Deletion und weiteren Modifikationen von *En2*: Konfokale Aufnahmen von Embryonen

(A1-A6)repräsentative Bilder der wildtypischen *DRNL*-Expression in der Embryonalentwicklung.

(B1-B6) Das Entfernen von *En2* in internen oder externen Deletionen resultierte in einem Signalverlust in allen Stadien. (C) Tabellarische Zusammenfassung der Auswirkungen der Promotorkonstrukte auf die Expression in den Stadien der Embryonalentwicklung. Grüne Farbe bedeutet eine wildtypische Expression, während helles Grün ein abgeschwächtes Signal darstellt. Graue Felder implizieren einen Signalverlust. (D) $L\Delta^{En2}::erGFP$: schwache Signale in den Kotyledonenspitzen nach Deletion von *En2*. (E) Nur *En2E* war in der Lage die Expression im späten Torpedo und dem Krückstockstadium zu retten. (F) *En2D* verursachte eine ektopische Expression im Endosperm. (G, H) Einzelmutationen und Doppelmutationen in *En2* führten zu einer schwächeren Expression im Herz- und dem frühen und späten Torpedo-Stadium (G=*SEn2AuxREMut1,2*; H=*SEn2AuxREMut1*). (I) Mutationen im proximalen AuxRE2 führten zu einer ektopischen Expression in den Kotyledonen des Krückstockstadiums. Messbalken = 20 μ m (Fotos A1-B⁶ von P. Comelli)

3.2.6 Die Rolle von *En3* bei der Expression im Embryo

Die Rolle von *En3* auf die *DRNL*-Expression im Embryo scheint die eines negativen Regulators zu sein, der die Expression auf bestimmte Domänen in späteren Stadien der Embryogenese beschränkt. Die Deletion von *En3* in $S\Delta^{En3}$ führte zu einer ektopischen Expression in der L2 im späten Torpedo- und im Krückstockstadium (Abb. 23 A). Des Weiteren war die Expression in der Vaskulatur in diesem Stadium verstärkt (Abb. 23 B). Das Wiedereinbringen der Fragmente *En3ABC* (Abb. 23 C), *En3A* (Abb. 23 D) und *En3B* (Abb. 23 E) veränderte die Expression wieder hin zum wildtypischen Muster. Dabei war die Rettung mit den Subfragmenten *En3A* und *B* gleichwertig mit einer Rettung mit dem kompletten *En3ABC*-Element. Das zeigt, dass jedes der beiden Subfragmente autonom im Embryo arbeiten kann, im Gegensatz zur Expression in den FMs, wo keines der Subfragmente in der Lage war die Expression in Stadium 3 FMs zu retten. Des Weiteren führte das Zurückbringen des Fragments *En3C* in die 800 bp Deletion zu einer starken ektopischen Expression in der Epidermis in Embryonen ab dem frühen Torpedo-Stadium (Abb. 23 F). Die Mutation beider AuxREs in *En3* hatte keine detektierbaren Effekte auf die Expression im Embryo.

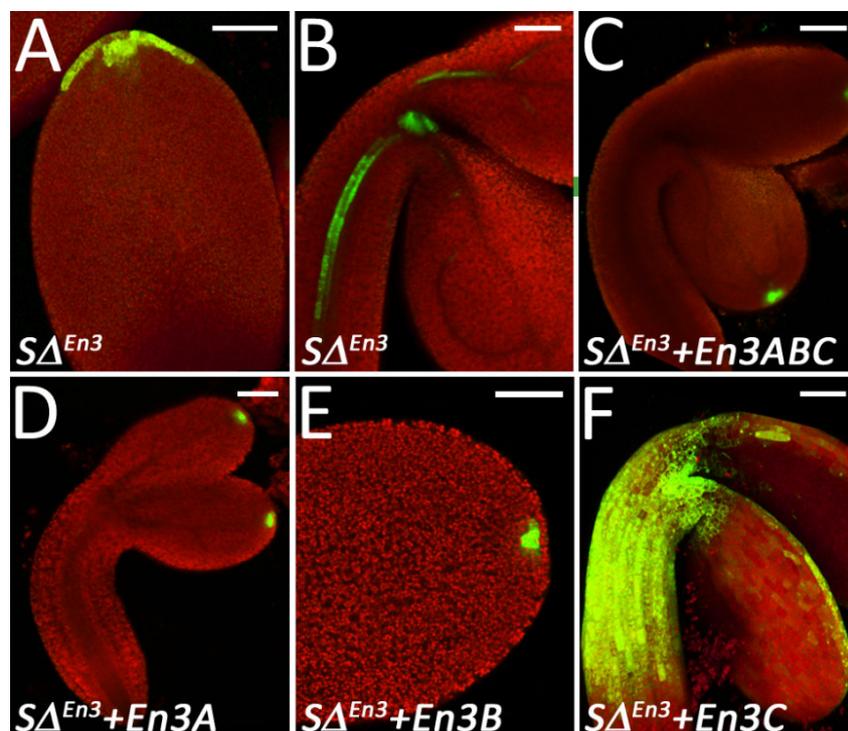


Abb. 23: Auswirkungen der Deletion von *En3* auf die Expression im Embryo
(A und B) Ektopische Expression bei einer Deletion von *En3* in $S\Delta^{En3}::erGFP$ im Krückstockstadium. (C) Wiederherstellung des Expressionsmusters mit *En3ABC* in $S\Delta^{En3}+En3ABC$ (C) und der Subfragmente *En3A* (D) und *En3B* (E). (F) *En3C* in $S\Delta^{En3}+En3C$ verursachte eine ektopische Expression in der Epidermis. Messbalken = 20 μ m (Fotos A, B, D und E von P. Comelli)

3.2.7 Die drei *Enhancer* reichen aus, um das wildtypische *DRNL* Expressionsmuster im IM abzubilden, nicht aber im Embryo

Um der Frage auf den Grund zu gehen, ob noch weitere Sequenzen an der Expression von *DRNL* beteiligt sind wurde das Konstrukt *En123::erGFP* hergestellt, bei dem der Großteil aller schlechter konservierter Promotor-Regionen fehlte (Abb. 24 A).

Das Expressionsmuster von *En123::erGFP* in Infloreszenzen stimmte dabei mit dem Expressionsmuster des Gesamtpromotors überein (vgl. Abb. 24 B mit Abb. 15 A³).

Im späten Torpedo und dem Krückstockstadium wurde jedoch manchmal eine ektopische Expression in der Epidermis (Abb. 24 C) und der L1 der Kotyledonen beobachtet (Abb. 24 D).

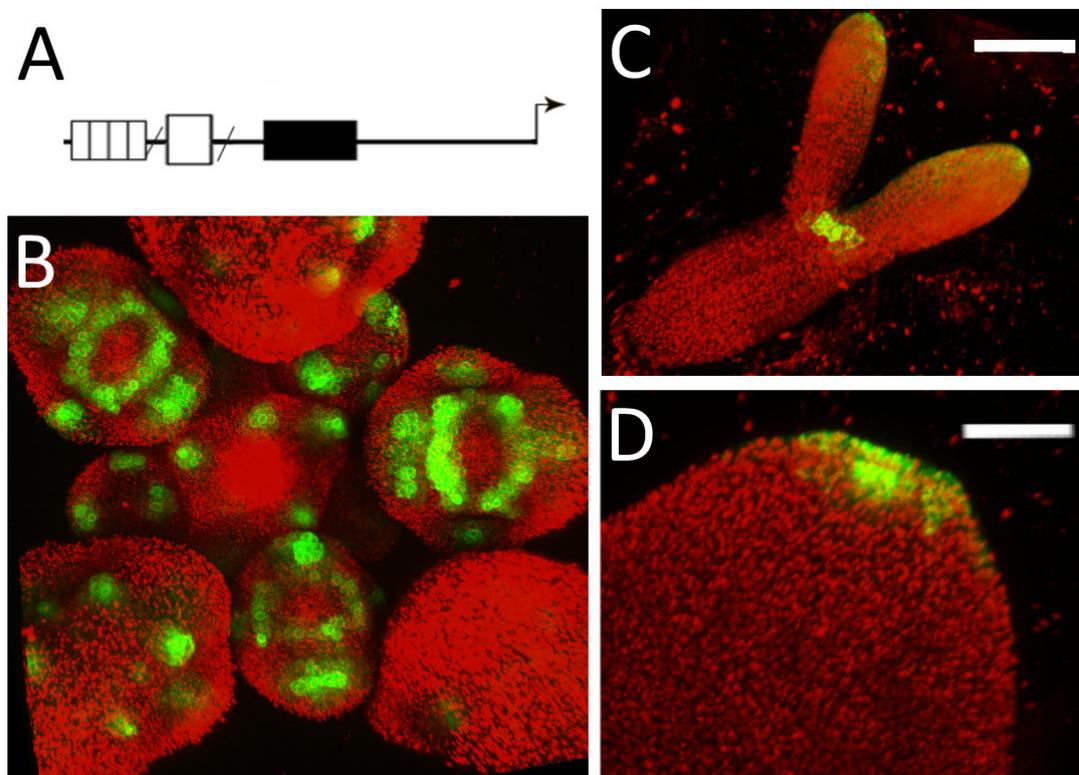


Abb. 24: Die Expression von *En123::erGFP* im Sprossapex und Embryo: Konfokale Aufnahmen

(A) Schematische Darstellung des *En123::erGFP*-Konstrukts. (B) Die Expression von *En123::erGFP* im IM und den FMs ist wildtypisch. Im Embryo verursacht das Konstrukt ektopische Expressionen in der Epidermis (C) und den Kotyledonenspitzen (D). Messbalken = 20 μm

3.2.8 Expression von *DRNL::GFP* in der Mutante *mpS319*

Die Auxinantwort wird durch die Aktivität von ARFs vermittelt und für MP/ARF5 konnte bereits gezeigt werden, dass es bei der Expression des *DRNL*-Paralogs *DRN* eine Rolle bei der Expression im Embryo (Cole et al., 2009) spielt. Des Weiteren zeigen RNA-Sequenzierungsdaten, dass *MP/ARF5* auch in *DRNL* exprimierenden Zellen differentiell

exprimiert wird (Frerichs et al., 2016) und daher wurde untersucht, ob *MP* auch im *DRNL*-Signalweg aktiv sein könnte.

Dazu wurde die Expression des *DRNL*-Gesamtpromotors (*DRNL_{Long}::erGFP*) und des Verkürzten (*DRNL_{Short}::erGFP*) in der *MP*-Mutante *mpS319* analysiert. Die Mutante *mpS319* (SALK_021319) stammt aus einem T-DNA Mutagenese-Experiment und weist multiple Insertionen der T-DNA im *MP*-Gen auf, die schließlich zu Rearrangements innerhalb des Gens geführt haben in deren Folge ein verkürztes *MP*-Protein gebildet wird, dem die C-terminale Domäne fehlt, die jedoch essentiell für die Bindung inhibitorischer Aux/IAA-Proteinen an die ARFs ist (Tiwari et al., 2003). Das verkürzte *MP*-Protein untersteht daher nicht mehr der Kontrolle des Auxinsignalwegs und bei *mpS319* handelt es sich demnach um eine Funktionsgewinnmutante. Homozygote *mpS319* sehen in ihrer vegetativen Phase wildtypisch aus, in der generativen Phase bilden sie jedoch spindelförmige Infloreszenzen, ähnlich derer der *pin* Mutante (Abb. 25 A), die aber in der Lage sind wenige Blüten mit verkümmerten und fehlenden Organen zu bilden. Die Abbildungen 25 B und C zeigen Beispiele für typische *mpS319* Blüten. In Abb. 25 B ist eine Blüte abgebildet, die nur Stamen und ein Gynözium enthält und ein filamentöses Organ, bei dem es sich um eine Sepale handeln könnte. Die Blüte in Abb. 25 C enthält vier miteinander verwachsene Petale, ein Gynözium und zwei sepalenartige Organe. Jede Blüte hatte ein mehr oder weniger normal entwickeltes Gynözium. Alle reproduktive Organe (Gynözien und Stamen), die eher wildtypisch aussehen sind jedoch steril. Embryonen von *mpS319* können eine verkürzte basale Domäne und Kotyledonendefekte aufweisen (Abb. 25 D und E), wobei der Großteil aller Embryonen wildtypisch aussieht.

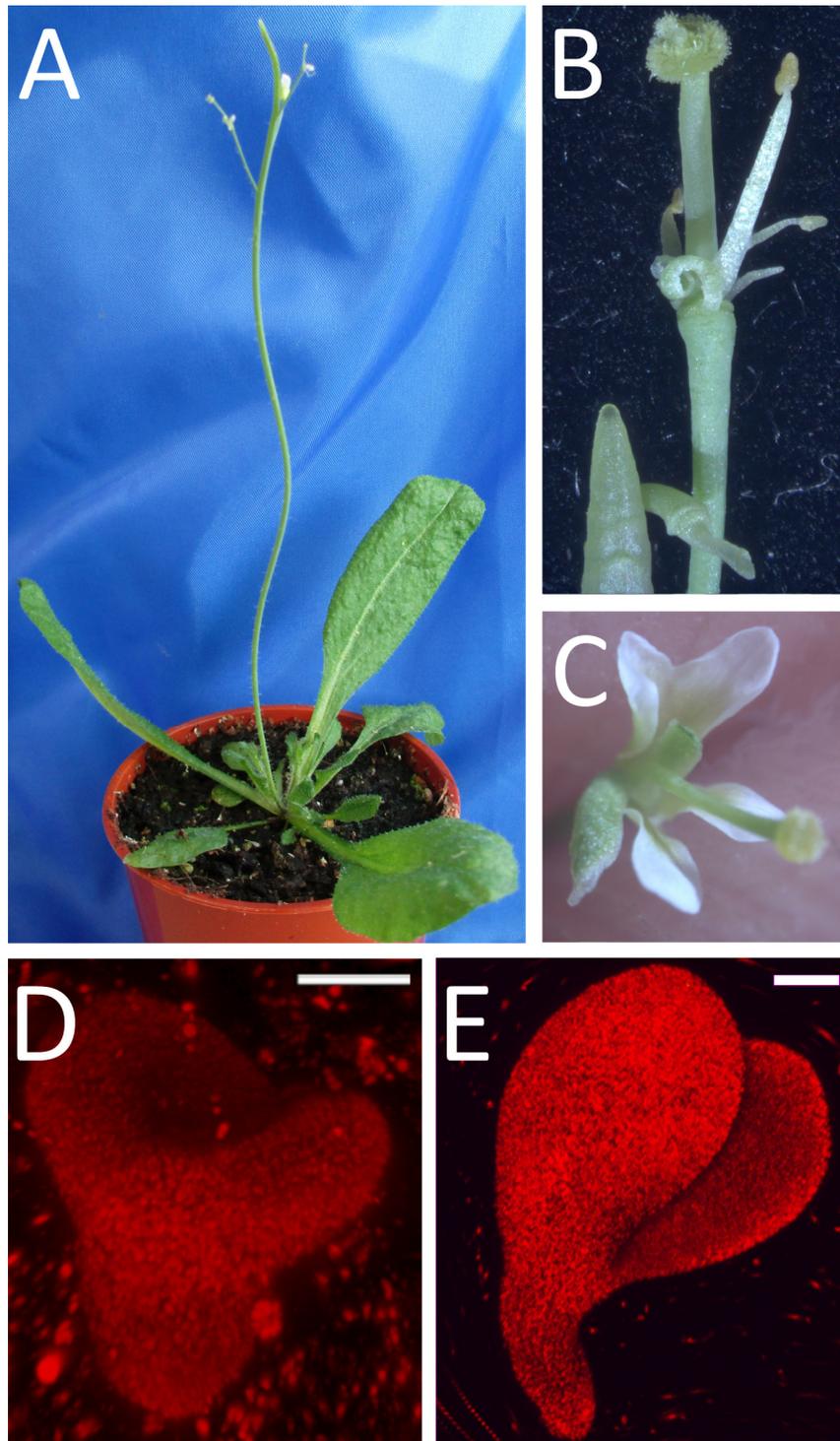


Abb. 25: Habitus der Mutante *mpS319* und Aufnahmen von Blüten und Embryonen
 (A) Habitus der Mutante *mpS319* mit spindelförmiger, primärer Infloreszenz, die zwei verkümmerte Blüten trägt. (B und C) Zwei Beispielbilder für Blüten. Die Blüten hatten in der Regel verkümmerte Organe, die auch miteinander verwachsen sein können, wie die Petale in (C). (D) Embryo mit fusionierten Kotyledonen (Torpedostadium). (E) Embryo mit verkürzter basaler Domäne (Krückstockstadium). (Messbalken = 20 µm)

In den spindelförmigen Infloreszenzen der Mutante *mpS319* wurde *DRNL_{Long}::erGFP* in einer ringförmigen Domäne in der IM Peripherie exprimiert (Abb. 26 A) und im Gegensatz zur Expression im Wildtyp konnte man keine Aufspaltung des Signals in Subdomänen entsprechend der Phyllotaxis beobachten. Die Expression in den FMs war ebenfalls ringförmig um das Zentrum angeordnet und zeigte ebenfalls keine Aufspaltung des Signals in Subdomänen (Abb. 26 A und B). Bei der *DRNL_{Short}::erGFP* war die Signalstärke in der IM-Peripherie drastisch vermindert und nur in wenigen Zellen vorhanden (Abb. 26 B und C). Die Abbildung 26 C zeigt ein IM ohne FM-Primordien, bei dem man einen besseren Blick auf die Expressionsdomäne hat. Die Expression in den FMs sah dagegen vergleichbar mit dem Muster des Gesamtpromotors aus (vgl. Abb. 26 A mit B).

Es wurden überwiegend Embryonen mit veränderter Morphologie dokumentiert, welche Nachkommen heterozygoter *mpS319* Pflanzen waren, die Homozygote darstellen. Sowohl mit dem Gesamtpromotor als auch dem Verkürzten konnten Signale in den morphologisch auffälligen Embryonen detektiert werden, die sich nicht voneinander, weder in der Qualität noch Quantität, unterschieden. Die Expressionsdomänen waren jedoch bei beiden Konstrukten verbreitert. Abb. 26 D zeigt eine Aufnahme eines Embryos im späten globulären Stadium. Das Stadium wurde anhand der Größe des Embryos festgelegt (ca. 20 µm). Wie beim Wildtypen wurde *DRNL* in der apikalen Domäne exprimiert, die Expressionsdomäne zog sich jedoch weiter Richtung Basis des Embryos. Die Expression im Herzstadium (Abb. 26 E) umfasste den gesamten apikalen Bereich im Gegensatz zum Wildtypen, bei dem in diesem Stadium nur die beiden auswachsenden Kotyledonen vorgemustert werden. Im Torpedo-Stadium (Abb. 26 F) und dem Krückstockstadium (Abb. 26 G) konnte man ektopische Expression in der Vaskulatur detektieren und die Expressionsdomäne in den Kotyledonen war verbreitet.

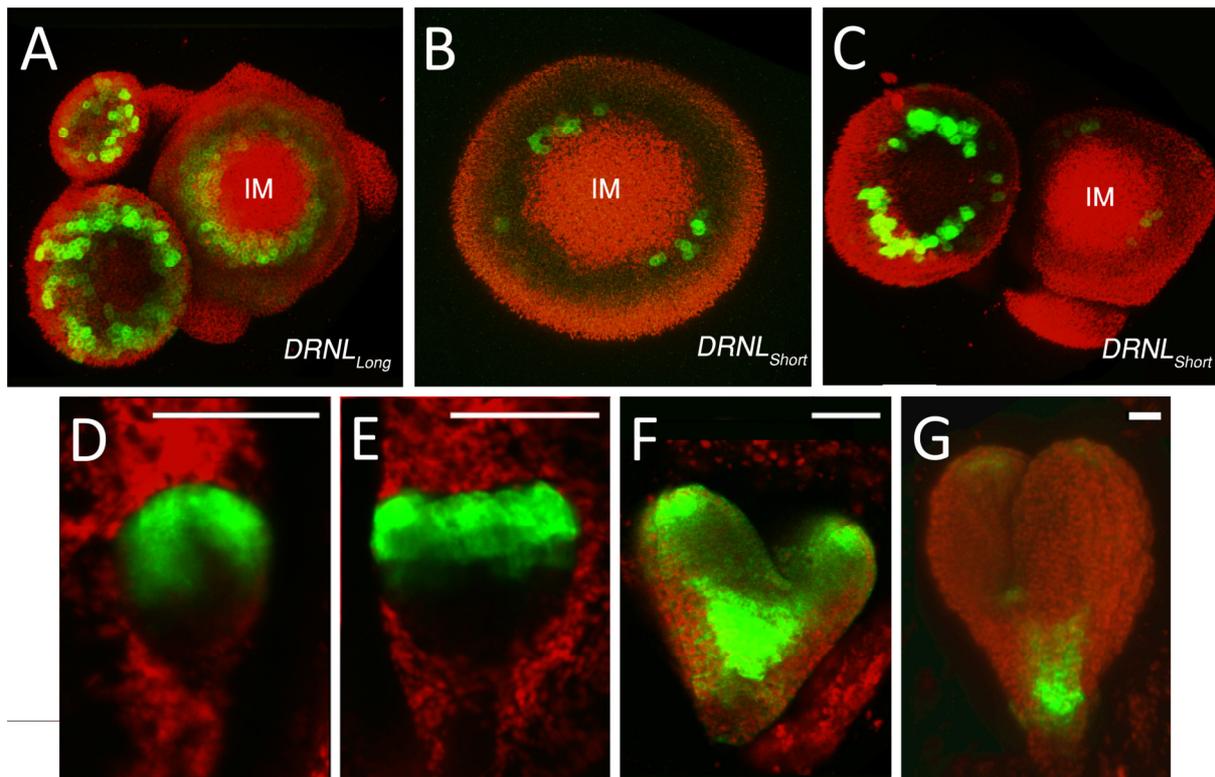


Abb. 26: Die Expression von *DRNL_{Long}* und *DRNL_{Short}* in *mpS319* Infloreszenzapices und Embryonen: Konfokale Aufnahmen

(A) Expression von *DRNL_{Long}::erGFP* wurde im Infloreszenzmeristem (IM) und zweier floraler Meristeme (FMs) (B und C) Expression von *DRNL_{Short}::erGFP* im IM und den FMs. (C) Aufnahme eines IMs ohne FMs (D-G) Repräsentative Bilder der Expression beider Konstrukte in morphologisch auffälligen Embryonen von *mpS319*. Messbalken = 20 μ m

3.3 Etablierung eines Systems zur klonalen Markierung *DRNL*-exprimierender Zellen

Es wurde an einem induzierbaren System gearbeitet mit dessen Einsatz es gelingen soll Zellen, in denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist, klonal zu markieren. Dazu wurden Treiber erstellt, die auf dem *GR-LhG4/pOp* -System beruhen. Insgesamt kamen zwei Treiber zum Einsatz bei denen entweder der *DRNL*-Promotor (*DRNLpOpCre*) oder der *DR5*-Promotor (*DR5pOpCre*) die Expression von *GR-LhG4* antrieb (Material und Methoden 2.4).

3.3.1 Pflanzen mit *DRNLpOpCre*-Treiber zeigen eine Dex-induzierbare Cre-abhängige Rekombination

Insgesamt wurde mit drei *DRNLpOpCre*-Treiber-Linien gearbeitet. Bei der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7* wurden Reporter und Treiberkonstrukt gleichzeitig mit Hilfe der *floral Dip*-Methode in Col-0 eingebracht während *DRNLpOpCre 1.6 x RepEX VI.1* und *DRNLpOpCre IV.5 x RepEX VI.1* zwei aus Kreuzungen stammende Linien sind, die von zwei

unabhängigen *DRNLpOpCre*-Linien abstammen, jedoch mit derselben Reporterlinie (VI.1) gekreuzt wurden.

Bei allen drei Linien zeigten Pflanzen erst nach erfolgter Dexamethason-Behandlung Sektoren mit GUS-Aktivität und die blau gefärbten Sektoren stimmten mit einem rekombinierten Reporter überein, was mit Hilfe einer PCR nachgewiesen wurde. Dazu wurde genomische DNA einer Infloreszenz aus ungefärbtem Gewebe "W" sowie aus Gewebe mit GUS-Aktivität "B" extrahiert und mit den Primern *35S F* und *uidA rev* eine PCR durchgeführt. Bei einer PCR mit diesem Primerpaar entsteht im Falle eines nicht rekombinierten Reporters ein 1459 bp und bei einem rekombinierten Reporter ein 503 bp großes Produkt (siehe Schema in Abb. 27 B). In der Probe "W" überwog das nicht-rekombinierte Produkt, während in der Probe "B" das rekombinierte Produkt überwog. Des Weiteren bestätigte die Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes (in Abb. 27 A mit * markiert) dass es sich um einen rekombinierten Reporter handelte.

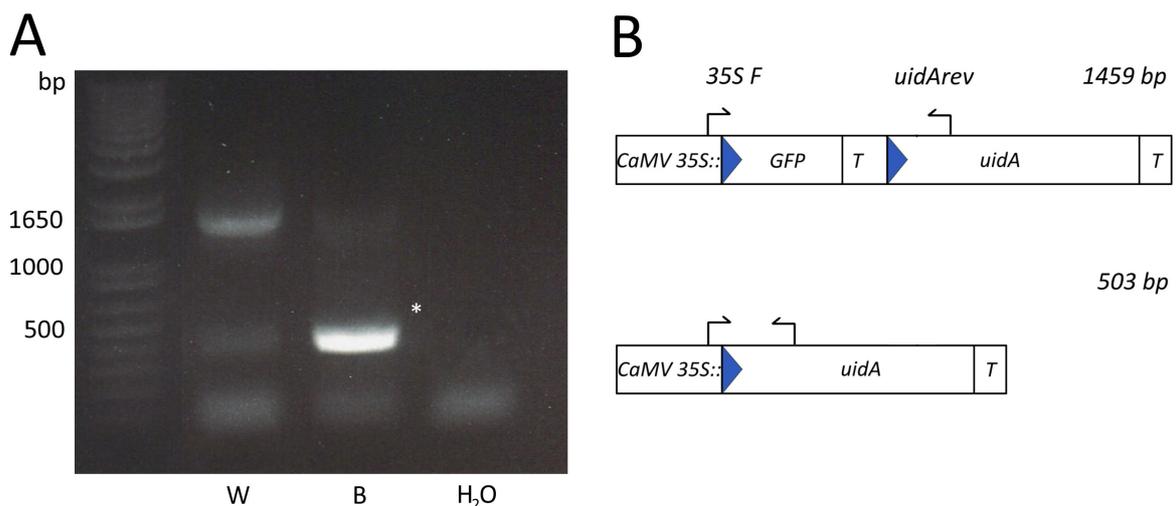


Abb. 27: PCR-basierter Nachweis einer Rekombination des Reporterkonstrukts *RepEX*

(A) Nach erfolgter GUS-Färbung wurde genomische DNA aus ungefärbten Gewebe (W) und Gewebe mit GUS-Aktivität extrahiert und mit dem Primerpaar *35S F* und *uidArev* in einer PCR eingesetzt. Nach erfolgter Elektrophorese erhielt man in der Probe "W" überwiegend ein Produkt, das auf einen nicht rekombinierten Reporter schließen lässt (ca. 1,5 kb). In der Probe "B" erhielt man dagegen ein kleineres Produkt, das auf einen rekombinierten Reporter schließen lässt (ca. 500 bp)

(verwendeter Größenmarker: Invitrogen 1 kb plus ladder)

(B) Schema des Reporters *RepEX* und der Bindestellen der verwendeten Primer und der erwarteten Größen der PCR-Produkte im nicht-rekombinierten Reporter (oben) und im rekombinierten Reporter (unten).

3.3.2 Häufigkeit der von Sektoren betroffenen Organe

Drei Wochen alte *DRNLpOpCre/RepEx #7* Pflanzen wurden mit 10 μ M Dex besprüht und 5 bis 8 Tage nach Dex-Zugabe in GUS-Lösung inkubiert. Die Infloreszenzen inklusive der Hochblätter von 60 Einzelpflanzen (primäre und sekundäre) wurden bezüglich ihrer eventuell aufgetretenen Blaufärbung ausgewertet (Insgesamt 352 Infloreszenzen). Nach der GUS-Behandlung zeigte knapp die Hälfte (48 %) aller Infloreszenzen GUS-Aktivität (Abb. 28 A). Es wurde weiterhin dokumentiert, mit welcher Häufigkeit bestimmte Organe angefärbt waren (Abb. 28 B). Fotos der blau gefärbten Sektoren werden in Abschnitt 3.3.4 detaillierter erläutert.

Die Organe, die am häufigsten Sektoren mit GUS-Aktivität aufwiesen, waren die Hochblätter (149 Stück), dabei konnten zwei Muster beobachtet werden: Blaufärbung in den Hydathoden und der Mittelrippe. Die Blätter mit gefärbter Mittelrippe hatten in den beobachteten Fällen auch angefärbte Hydathoden und waren selten (3 von 149 analysierten Hochblättern).

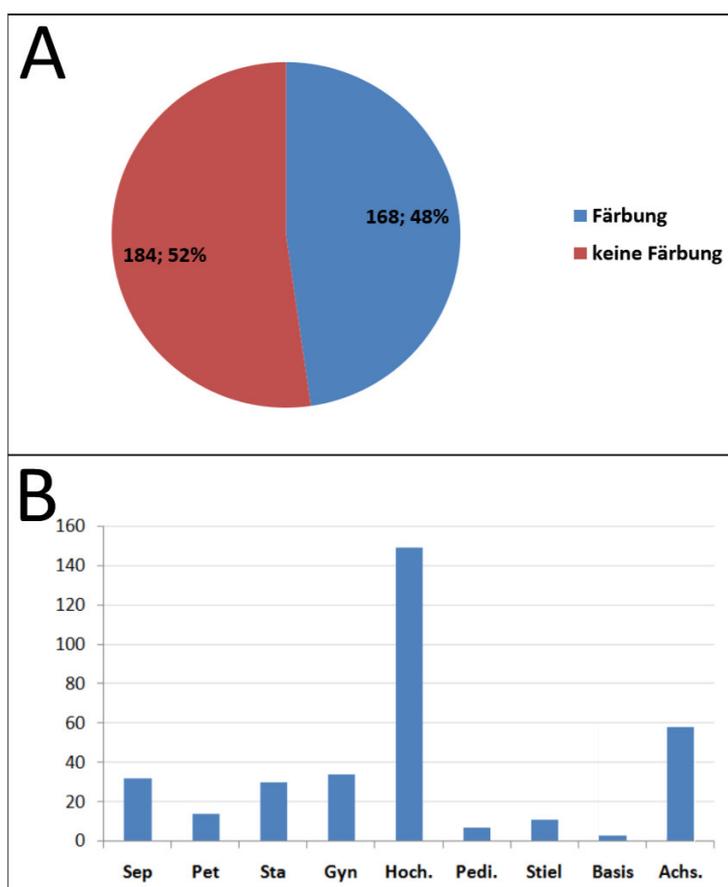


Abb. 28: Häufigkeit der von klonalen-Sektoren betroffenen Organe

(A) Zahl und Prozent aller analysierten Infloreszenzen der Linie *DRNLpOpCre/RepEX#7*. (B) Innerhalb der Infloreszenzen wurden Organe unterschiedlich oft angefärbt: die Sepalen (Sep) 32 mal, die Petalen (Pet) 14, Stamen (Sta) 30, Gynözien (Gyn) 34, die Hochblätter (Hoch.) 150, Pedicel (Pedi.) 7, der Infloreszenzstamm (Stiel) 11, der Blütenboden (Basis) 3 und die Achsenknospen (Achs.) 58 mal. (Grafiken von M. Kastl, modifiziert)

Bei den floralen Organen wiesen Sepalen, Staubgefäße und das Gynözium am häufigsten blau-gefärbte Sektoren auf. Noch häufiger werden jedoch in den Achsen der Hochblätter sich entwickelnden IMs angefärbt.

3.3.3 Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Dex-Behandlung und dem Entwicklungszustand der Blüten

Anhand des Entwicklungszustandes ihrer Blüten wurden einzelne Infloreszenzen Dex-behandelter Versuchspflanzen in zwei Kategorien eingeteilt. In Kategorie A (adult) landeten Infloreszenzen, deren Blüten weiter entwickelt waren und gut sichtbare Petale aufwiesen. Die Anzahl untersuchter Infloreszenzen der Kategorie A betrug 60 Stück.

In Kategorie J (juvenil) wurden Infloreszenzen gruppiert, die nur geschlossene Blütenknospen trugen. In der Kategorie J wurden 68 Infloreszenzen gesammelt und analysiert (Abb. 29 A und B). Die gruppierten Infloreszenzen wurden anschließend in GUS-Lösung inkubiert. Wie in Abbildung Abb. 29 zu sehen ist weist Kategorie J häufiger blau gefärbte Sektoren auf als Kategorie A. Tendenziell waren dabei in Kategorie A überwiegend die Stamen und bei Kategorie J eher Sepalen und Petalen von GUS-Sektoren betroffen (vgl. Abb. 29 C und D).

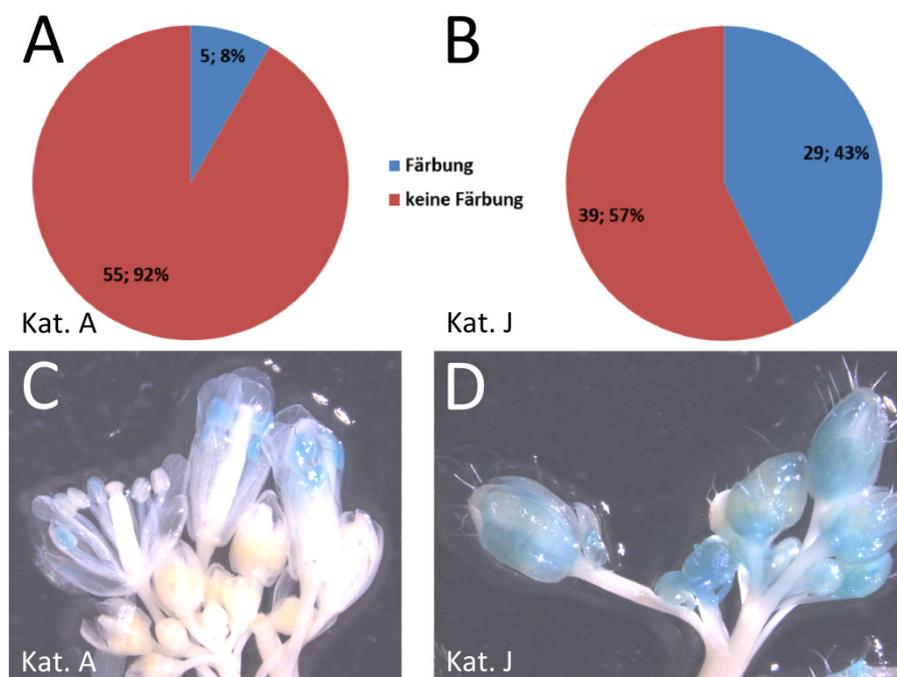


Abb. 29: Einfluss des Blütenentwicklungszustands auf die Färbung

(A und C) Adulte Blüten waren seltener von klonalen Sektoren betroffen (8%) und die GUS-Sektoren beschränkten sich eher auf Organe des dritten Wirtels (siehe C). (B und D) Jüngere Blüten wurden häufiger angefärbt (43%). Bei ihnen waren eher Organe des ersten und zweiten Wirtels betroffen (siehe D).

3.3.4 Muster der klonalen Sektoren in blattartigen Organen

Im folgenden Abschnitt sollen die klonalen Sektoren dargestellt werden, wie man sie in den vegetativen und generativen Geweben nach Dex-Zugabe erhalten hat. Der Großteil der Dokumentation wurde mit der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7* vollzogen. Vergleichbare Muster wurden auch bei den beiden aus Kreuzungen hervorgegangenen Linien beobachtet.

Keilförmige klonale Sektoren ließen sich überwiegend an den Rändern von Rosettenblättern beobachten und umfassen wahrscheinlich die Hydathoden. Die Anzahl der Sektoren, bei denen jeder Sektor als ein einzelnes und unabhängiges Rekombinationsereignis anzusehen ist, variiert von Blatt zu Blatt. Die ältesten Rosettenblätter, die zum Zeitpunkt der Dex-Behandlung ausgewachsen waren, weisen dabei keine oder nur wenige Sektoren an ihren Rändern auf. Die Sektoren der älteren Blätter befinden sich überwiegend am basalem Teil des Blattes. Bei den beiden jüngsten Blättern tauchten dagegen auch Sektoren auf der Lamina und der Mittelrippe auf, überwiegend am apikalen Teil des Blattes (Abb. 30 A).

In Abb. 30 B ist die Vergrößerung zweier Sektoren, wie sie an den Rändern beobachtet wurden, zu sehen. Die Sektoren sind unterschiedlich groß und meist keilförmig. In Abb. 30 C ist ein junges Blatt abgebildet, das drei von einander unabhängig entstandene Sektoren aufweist. Dabei befindet sich ein Sektor auf der Mittelrippe, ein größerer an der Blattspitze und ein kleinerer, dreieckiger auf der Lamina. Blätter, deren Lamina komplett blau, oder zur Hälfte blau gefärbt waren wurden im Rahmen dieser Versuche nicht beobachtet.

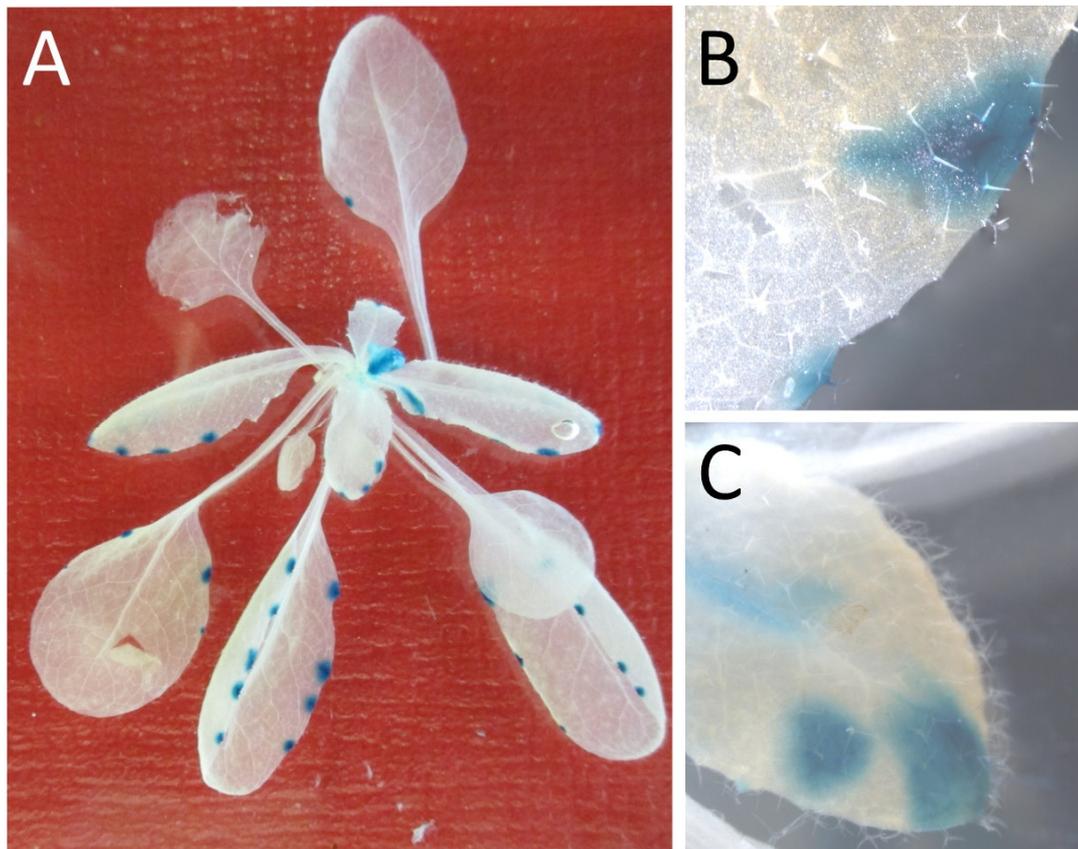


Abb. 30: Klonale GUS-Sektoren in den Rosettenblättern der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7*. Gewebe ohne GUS-Aktivität sind nach Entfärbung mit Ethanol weiß, während Sektoren mit GUS-Aktivität eine blaue Färbung aufweisen. (A) zeigt eine Aufsicht einer kompletten Pflanze. Ältere Blätter wiesen keine oder nur wenig GUS-Aktivität auf. Erst ab dem fünften Blatt tauchten kleine, blaue Sektoren an den Rändern auf. (B und C) Detailaufnahmen klonaler Sektoren.

Die Sektoren in den Hochblättern glichen denen der Rosettenblätter und waren überwiegend an den Rändern der Organe oder der Spitze zu finden (Abb. 31 A und B). Dabei konnte man pro Hochblatt auch mehrere klonale Sektoren beobachten, die unabhängig voneinander entstanden sind (Abb. 31 A). Es wurde ebenfalls Blaufärbung an der Mittelrippe (Abb. 31 C) beobachtet und Sektoren auf der Lamina (Abb. 31 D), die auch meist keilförmig waren. Bei dem Blatt in (Abb. 31 D) handelt es sich um zwei unabhängige Sektoren, die ineinander laufen. Zusätzlich wies das Blatt zwei kleinere Sektoren am Rand auf. Abb. 31 E zeigt eine Infloreszenz mit einem größeren Sektor, der sich bis auf die Hälfte des Hochblatts ausdehnt.

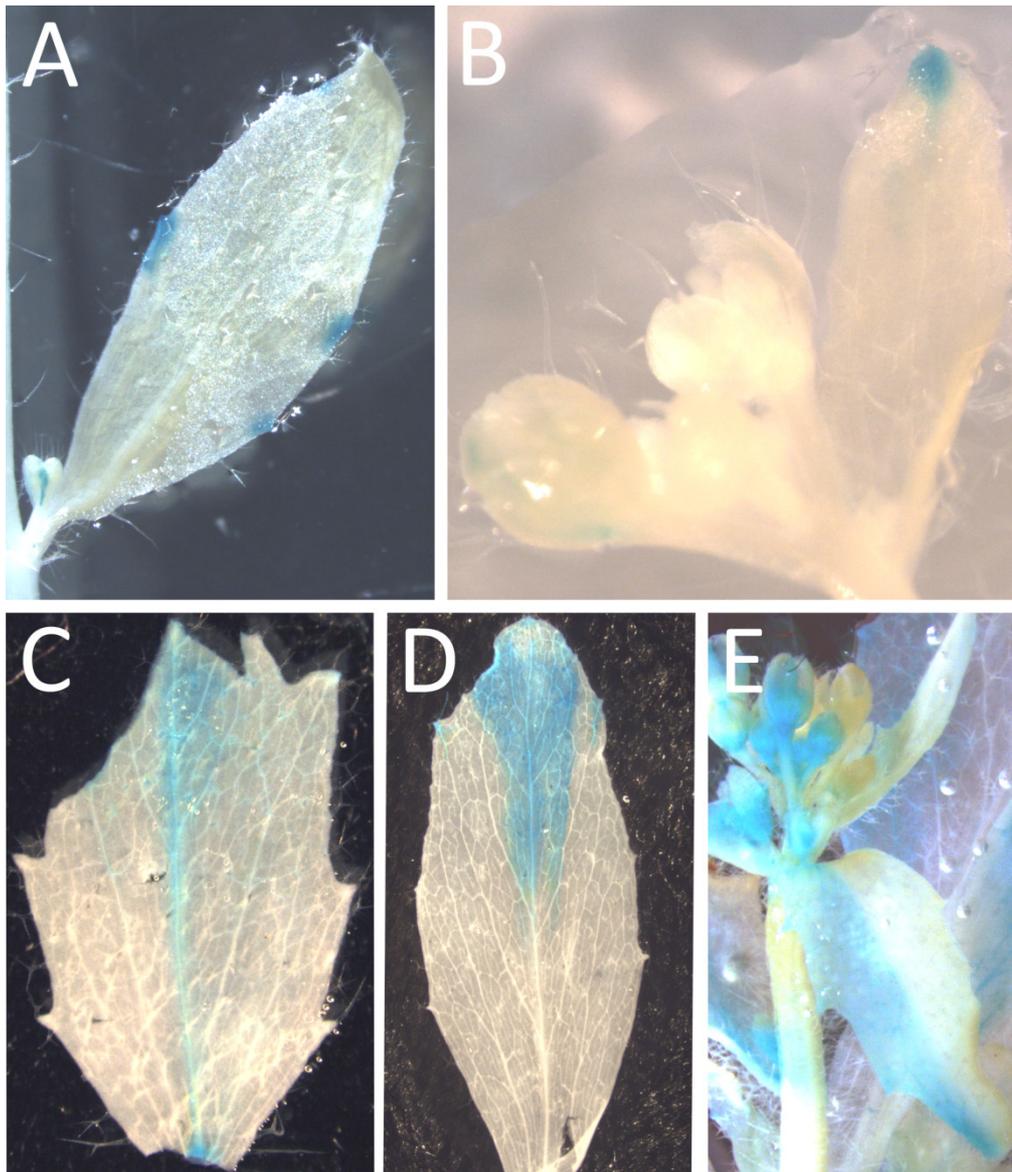


Abb. 31: Klonale GUS-Sektoren in den Hochblättern der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7*

Ein häufig beobachtetest Muster in den Hochblättern sind keilförmige blaue Sektoren an den Rändern (A) oder an der Spitze des Blattes (B). (C) zeigt ein Hochblatt mit Sektor auf der Mittelrippe, der zur Spitze sich verbreitet. (D) Ein Blatt mit zwei unabhängigen klonalen Sektoren auf der Lamina. (E) Ein größerer klonaler Sektor, der sich in das Hochblatt erstreckt.

3.3.5 Muster der klonalen Sektoren in Blütenorganen

Die klonalen Sektoren, die bei Sepalen beobachtet werden konnten, waren auf die Mittelrippe beschränkt. Dabei war der Sektor breit, wie bei der Blüte in Abb. 32 A oder dünn, wie bei Abb. 32 B und C. Breitere Sektoren fanden sich dabei auf der abaxialen Sepale, die schmalere dagegen auf der Adaxialen.

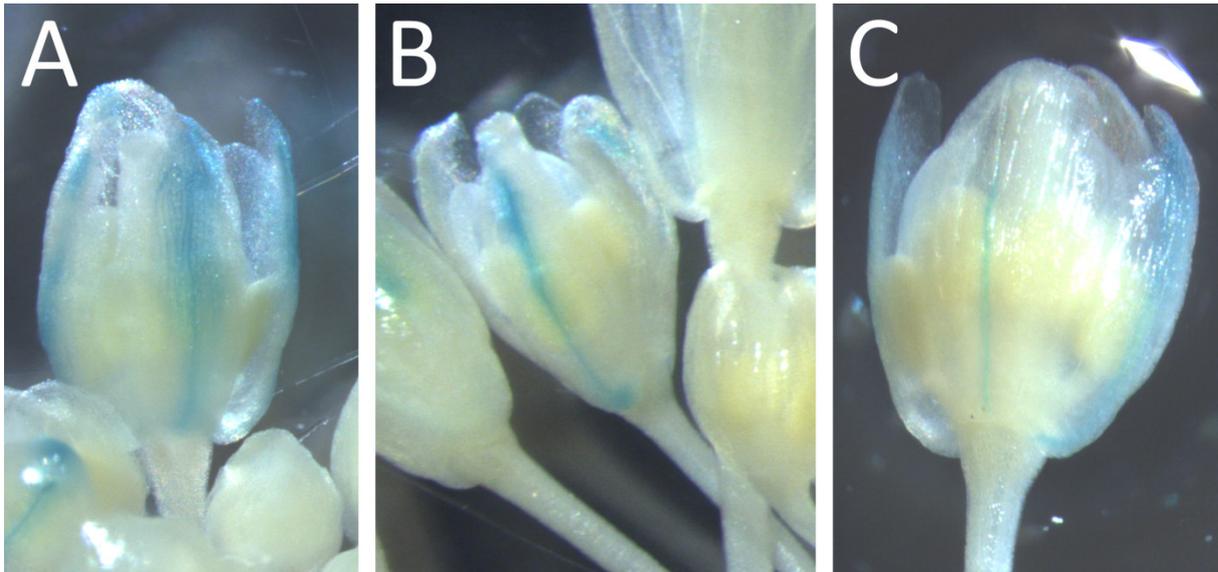


Abb. 32: Klonale GUS-Sektoren in den Sepalen der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7*

Die Blaufärbung in den Sepalen umfasst entweder fast das gesamte Organ (A), oder ist auf die Mittelrippe beschränkt (B,C).

In den Petalen wurden folgende Sektoren beobachtet: keilförmige Sektoren, die zur Petalenbasis hin schmaler wurden (Abb. 33 A) oder Sektoren, die die Mittelrippe umfassten und den Muster in den Sepalen glichen (Abb. 33 B).

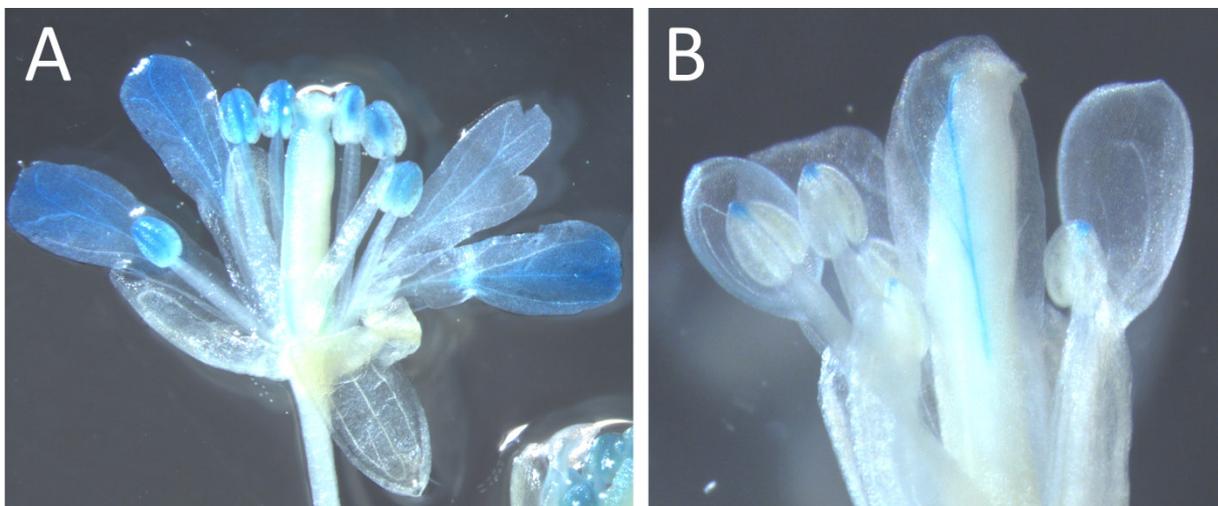


Abb. 33: Klonale GUS-Sektoren in den Petalen der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7*

In den Petalen fand man entweder größere, keilförmige blaue Sektoren (A) oder kleinere, die auf die Mittelrippe beschränkt waren (B).

Betrachtet man einzelne Stamen, so erhielt man 5 Arten von Mustern (Abb. 34 A-D und J). Es gab Stamen, bei denen nur die Antheren blau gefärbt waren (Abb. 34 A) oder das komplette Organ (Abb. 34 B). Die Antheren mancher Stamen wiesen nur einen kleinen Sektor in ihren Spitzen auf (Abb. 34 C), andere Antheren hatten blau gefärbte Konnektive (Abb. 34 D). Im Falle blau gefärbter Konnektive erstreckte sich die Färbung teilweise ins Filament, bzw. in die

Vaskulatur des Filaments. Dabei konnte die Vaskulatur durchgehend gefärbt sein, oder unterbrochen wie in Abb. 34 D. Selten zu beobachten waren Stamen, bei denen nur die Filamente gefärbt waren (Abb. 34 J). Betrachtete man alle sechs Stamen einer einzelnen Blüte, so ergaben sich gemeinsam mit den oben beschriebenen Mustern, folgende Muster (Abb. 34 E - J). Im Falle komplett eingefärbter Organe waren meist alle sechs Stamen betroffen, wie die Blüte in Abb. 34 E. Es wurden aber auch Blüten beobachtet, bei denen ein einzelnes Organ, oder zwei, blau waren (Abb. 34 F). In diesem Fall tauchten auch Blaufärbungen an der dem Stamen gegenüberliegender Sepale und im Gynözium, auf der dem Stamen zugewandten Seite, auf. Stamen, bei denen nur die Antheren gefärbt waren (komplett blau, oder nur Teile), tauchten in folgenden Kombinationen auf: alle sechs Stamen betroffen (Abb. 34 G), nur zwei betroffen (Abb. 34 H) oder vier betroffen (Abb. 34 I). Die farblosen Stamen der Blüte aus Abb. 34 I sind kleiner, als der Rest. Womöglich handelt es sich hier um die lateralen Stamen. Im Falle blau gefärbter Filamente, aber farbloser Antheren waren alle sechs Organe betroffen.

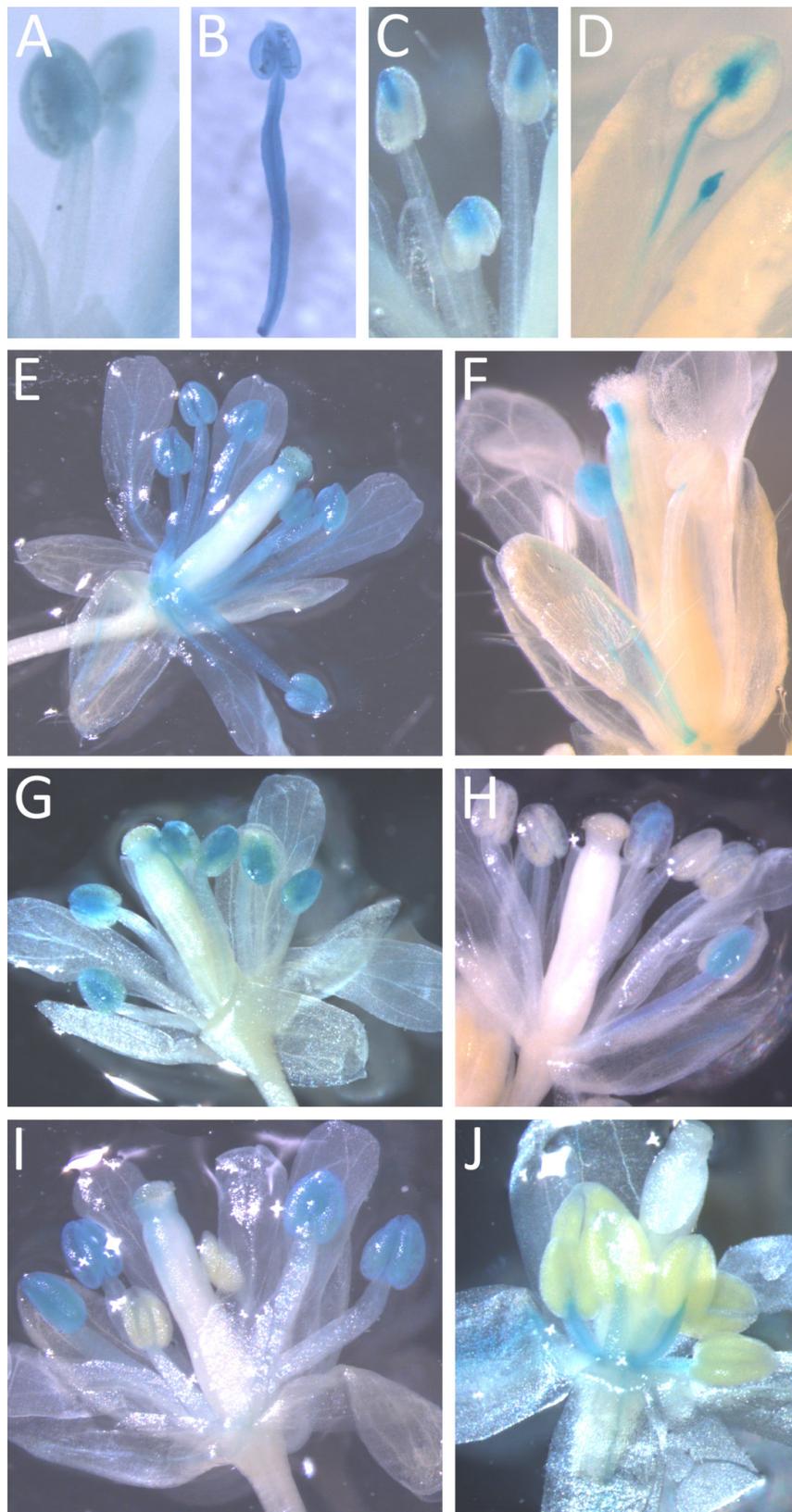


Abb. 34: Klonale GUS-Sektoren in den Stamen der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7*

Die Bilder (A) bis (D) zeigen Nahaufnahmen der Blaufärbungsmuster einzelner Organe.

Bei den Stamen konnten nur die Antheren gefärbt sein (A), das ganze Organ (B), nur die Spitze der Antheren (C), die Konnektive mit einem Teil des Filaments (D) oder nur die Filamente (J). Die Bilder (E) bis (F) zeigen die Kombinationen der sechs gefärbten und ungefärbten Stamen. Es konnten alle Organe Blaufärbung aufweisen (E, G, J), ein einzelnes (F), oder zwei (H) oder vier (I).

Das überwiegende Muster im Gynözium umfasste ein oder zwei kleinere Sektoren im oberen Bereich des Organs, die, im Falle von zwei Sektoren, spiegelbildlich zueinander angeordnet waren (Abb. 35 A). Es wurden auch Organe beobachtet, bei denen der apikale Bereich, ausgenommen dem Stigma, blau angefärbt wurde (Abb. 35 B). Ein angefärbtes Stigma wurde bei keiner der untersuchten Blüten beobachtet. Des Weiteren erhielt man Gynözien, bei denen ein streifenförmiger Sektor das Organ von oben bis unten durchzog (Abb. 35 C und D) und Gynözien, die aus einem weißen und einem blauen Karpell bestanden (Abb. 35 E). Ein Gynözium, das komplett blau angefärbt wurde, wurde ebenfalls beobachtet (Abb. 35 F).

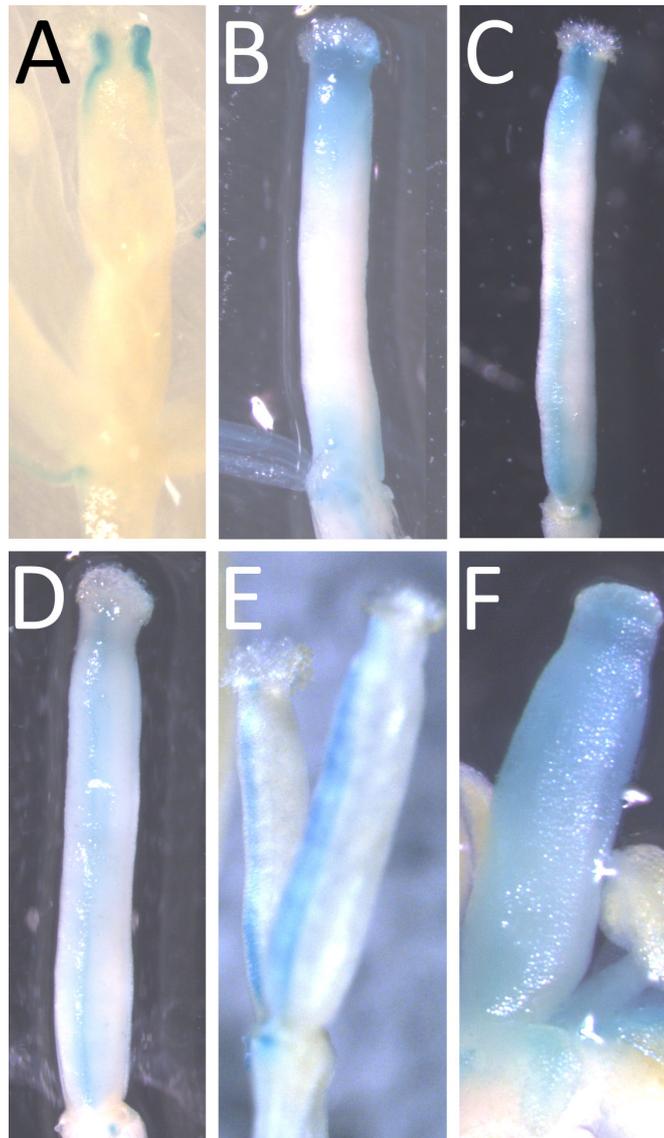


Abb. 35: Klonale GUS-Sektoren im Gynözium der Linie *DRNLpOpCre/RepEx#7* (A und B) Apikale Sektoren unterhalb des Stigmas. (C und D) Gynözien mit blauem, streifenförmigen Sektor entlang der apikal-basalen Achse. (E) Gynözien, die aus einem blauen und einem weißen Karpell bestanden (E) und komplett blaue Organe (F). (Aufnahme A von M. Kastl)

Sektoren mit GUS-Aktivität konnten auch im Blütenboden beobachtet werden (Abb. 36 A und B). Dabei war entweder der gesamte Blütenboden betroffen (Abb. 36 A) oder nur eine Seite (Abb. 36 B). Der Sektor in Abb. 36 B erstreckt sich auch in weitere Organe, wie zwei Stamen und erinnert an den Sektor aus Abb. 34 F. Ebenfalls lies sich GUS-Aktivität in den Pedicelen (Abb. 36 C) und im Infloreszenzstämmchen nachweisen (Abb. 36 D).

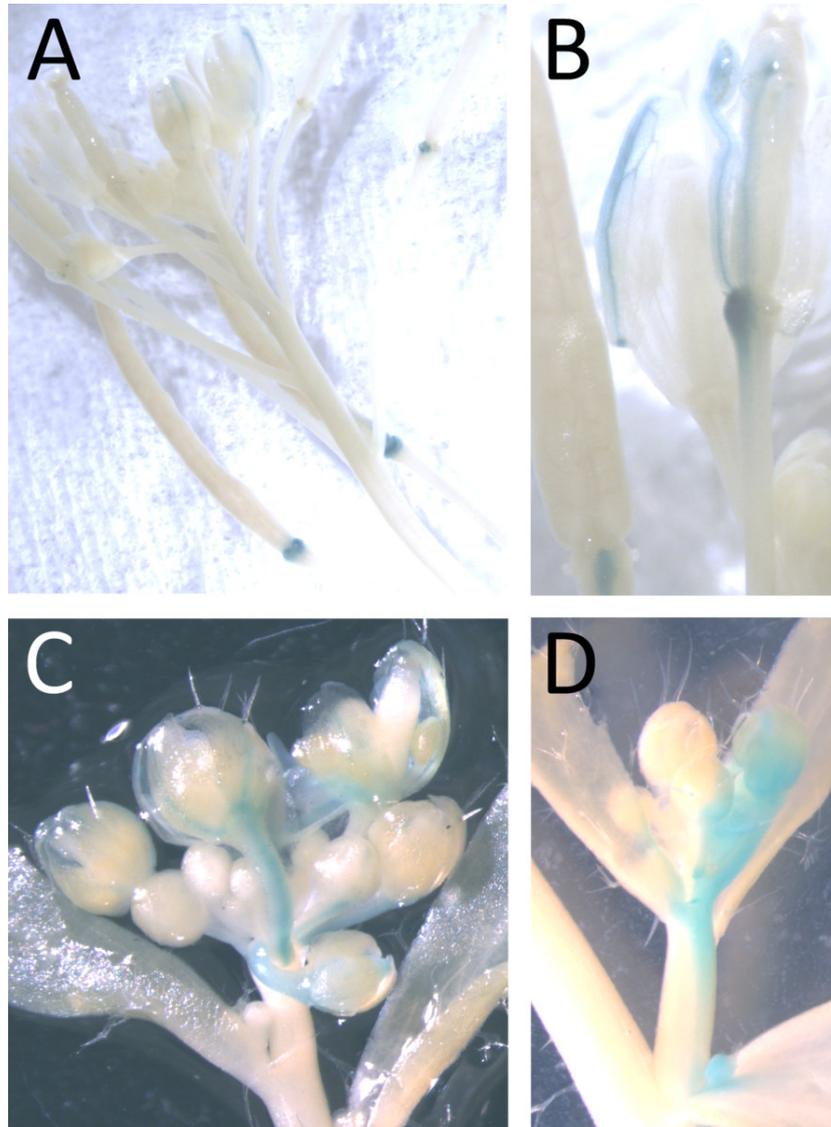


Abb. 36: Weitere Klonale GUS-Sektoren die bei *DRNLpOpCre/RepEX#7* beobachtet wurden
 Blaufärbung konnte man im Blütenboden sehen. Dabei war entweder der komplette Blütenboden eingefärbt (A) oder nur ein Teil (B). Beim letzteren Fall waren meist auch andere Organe von einer Färbung betroffen, wie die Stamen (B). die abaxiale Seite der Pedicel konnte auch von Blaufärbung betroffen sein (C). Junge Achsenknospen wurden auch häufig angefärbt. Dabei war die Färbung ausschließlich auf der abaxialen Seite (D).

3.3.6 Das Muster der klonalen Sektoren ist Promotor-abhängig

Die Art der klonalen Sektoren ist Promotor-abhängig, denn es gibt Unterschiede ob ein *DRNLpOpCre* oder *DR5pOp*-Treiber verwendet wurde.

Im Folgenden wurden mit zwei *DR5popCre*-Linien gearbeitet: *DR5pOpCre/RepEx#2*, bei der Reporter und Treiber gleichzeitig in Col-0 mit Hilfe der *floral dip*-Methode eingebracht wurden und *DR5pOpCre III.3 x RepEX VI.1*, die aus einer Kreuzung stammt und bei der dieselbe Reporterlinie eingekreuzt wurde, die auch mit den *DRNLpOp*-Treibern kombiniert wurde.

Die Abbildungen 37 A bis D zeigen Wurzeln von Keimlingen der Linie *DR5pOpCre/RepEx#2*, die auf MS-Platten mit 10 µM Dex angezogen und drei Tage nach der Keimung komplett mit GUS-Lösung inkubiert wurden. In der Wurzel erhielt man Sektoren, die die Kolumella und die laterale Wurzelhaube betrafen (Abb. 37 A) oder nur die Kolumella (Abb. 37 B). Sektoren wurden auch im Wurzelmeristem, bzw. unterhalb der Wurzelhaube beobachtet (Abb. 37 C und D). In Infloreszenzen dieser Linie konnte man Sektoren in den Sepalen beobachten (Abb. 37 E), während Stamen und Petale frei von GUS-Aktivität waren. Seltener konnten auch Sektoren im Gynözium beobachtet werden, doch die Majorität der Gynözien wies keine Sektoren auf. (Abb. 37 F) zeigt eine Pflanze aus der Kreuzung *DR5pOpCre III.3 x RepEX VI.1*, welche im Alter von einer Woche Dex-behandelt und eine weitere Woche später in GUS-Lösung inkubiert wurde. Die Rosettenblätter wiesen größere Sektoren auf (Abb. 37 G und H), bei denen überwiegend die Vaskulatur des Blattes betroffen war und die sich von den Sektoren, die vom *DRNLpOpCre-Treiber* erzeugt wurden, unterschieden (vgl. Abb. 37 G und H mit I und J). Abb. 37 G zeigt z.B. ein Blatt mit einem großen Sektor in der Vaskulatur, der (ausgenommen der Mittelrippe) fast das gesamte Blatt umspannt. Je jünger die Blätter dabei waren, desto größer waren die Sektoren (Abb. 37 H).

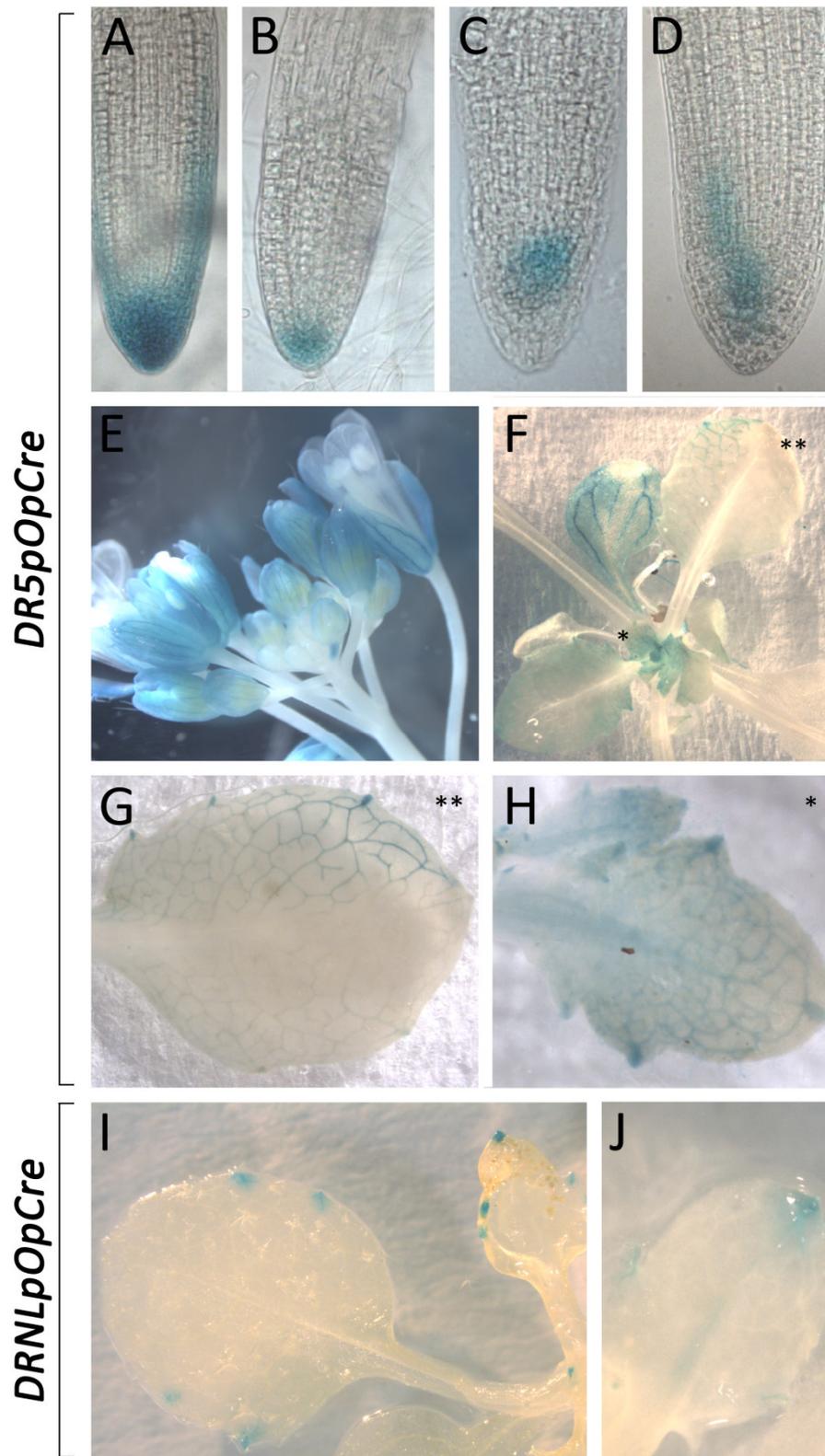


Abb. 37: Vergleich klonaler GUS-Sektoren von Pflanzen mit *DR5*- und *DRNLpOp*-Treiber (A-D) GUS-Sektoren in Wurzeln von Keimlingen und (E) Infloreszenzen der Linie. (F) GUS-Sektoren in Rosettenblättern der Linie *DR5pOpCre III.3 x RepEX VI.1*, (G und H) zeigen vergrößerte Aufnahmen zweier Blätter derselben Linie. (I und J) Sektoren in Pflanzen mit *DRNLpOp*-Treiber, die aus einer Kreuzung mit der Linie *RepEX VI.1* hervorgingen. Man vergleiche sie mit (F-H).

3.3.7 Zusammenfassung *GR-LhG4/popCre*-Treiber

Bei Pflanzen mit *GR-LhG4/popCre*-Treibern kommt es nach einer Dexamethason-Applikation zu einer Cre-abhängigen Rekombination des Reporters. Die Art der klonalen Sektoren ist dabei abhängig vom verwendeten Promotor des Treibers.

3.4 Genetische Ablation *DRNL* exprimierender Zellen

Transgene Pflanzen, die das Konstrukt *DRNLpOpDTA* beinhalten stellen nach Dex-Induktion in Zellen, in denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist, das toxische Diphtherie-Toxin A her. Dies hat den Tod der betreffenden Zelle zur Folge (Material und Methoden 2.5).

3.4.1 Die Dex-Applikation 3 Tage alter Keimlinge führt zu Defekten in Blättern und der Phyllotaxis

Im ersten Ansatz wurden 3 Tage alte *Arabidopsis* Keimlinge mit einer 10 µM Dex-Lösung benetzt und die Entwicklung eine Woche nach der Behandlung dokumentiert. Es wurde mit vier Linien gearbeitet (*II.3*, *III.2*, *V.1*, *VII.1*), welche aus unabhängigen Transformationsereignissen stammten.

Bei den untersuchten Pflanzen konnte man in allen Linien Deformationen der Rosettenblätter beobachten. Dabei gab es zwei Arten der Fehlbildungen: Blätter mit doppelter Lamina (Abb. 38 A) oder Einkerbungen am Rand der Blattspreite (Abb. 38 B). Nach der Transition von vegetativer zur generativen Phase konnte man eine Störung in der Phyllotaxis beobachten, wie Infloreszenzstämmchen und Hochblätter, die in direkter Nachbarschaft zueinander wuchsen (Abb. 38 C und D). Es wurden auch Hochblätter beobachtet, die mit dem Stamm verwachsen waren (Abb. 38 E).

Des Weiteren hatte die Dex-Behandlung sehr junger Keimlingen keine Auswirkungen auf die Blüten, die ihr wildtypisches Aussehen behielten.

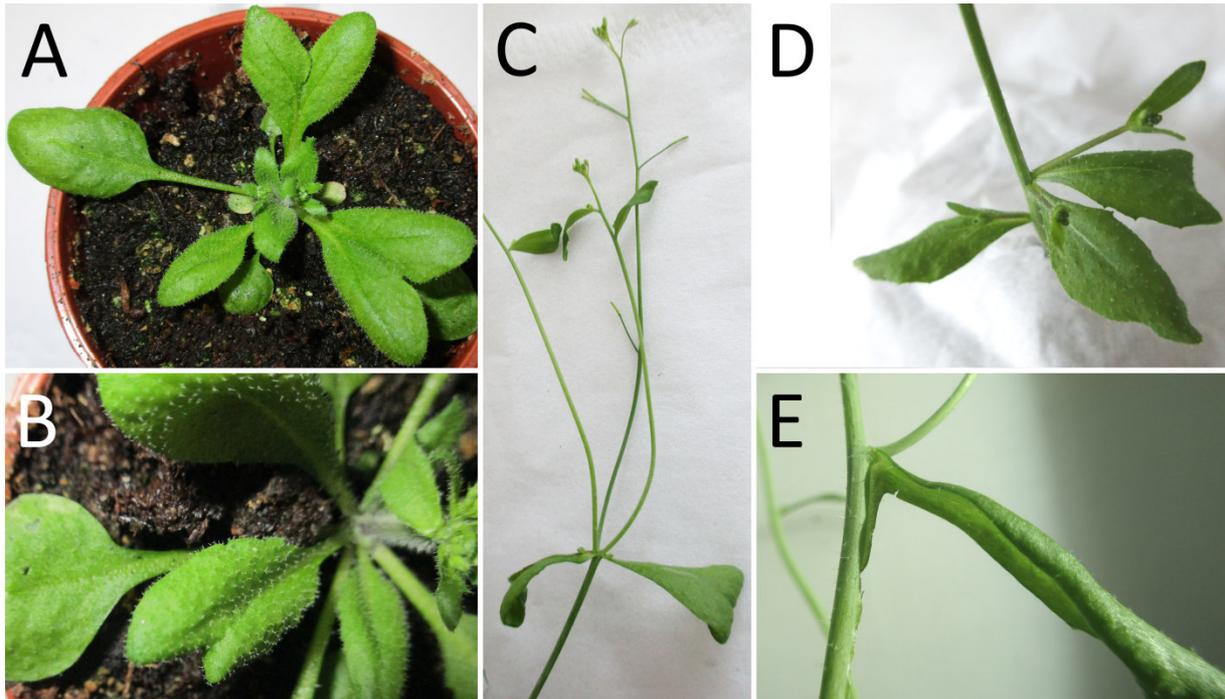


Abb. 38: Phänotypen nach genetischer Ablation *DRNL*-exprimierender Zellen

Die Ablation *DRNL*-exprimierender Zellen zu diesem Zeitpunkt resultierte in Blättern mit doppelter Lamina (A) oder Blättern mit Einkerbungen an ihren Rändern (B). Des Weiteren hatte die Ablation Effekte auf die Phyllotaxie der Hochblätter und Infloreszenzstämmchen (C, D). Es wurden auch Blätter beobachtet, die mit dem Infloreszenzstämmchen verwachsen waren (E).

3.4.2 Die Dex-Applikation drei Wochen alter Pflanzen hat Auswirkungen auf den Blütenphänotyp

Da sich die vier Linien im vorangegangenen Versuch ähnlich verhalten haben, wurde in weiteren Versuchen nur mit der Linie *II.3* gearbeitet. Ca. zwei bis drei Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen dieser Linie wurden mit einer 10 μ M Dex-Lösung behandelt.

Eine Dex-Applikation zu diesem Zeitpunkt hatte Auswirkungen auf den Blütenphänotyp, dabei ließen sich 6 Kategorien von Phänotypen/Defekten beobachten. Es sei noch erwähnt, dass die im Folgenden beschriebenen Phänotypen meist als Kombinationen in einzelnen Blüten auftauchten:

1. Deformierte Organe: Blüten konnten eine wildtypische Anzahl an Organen aufweisen. Die Morphologie war verändert (Abb. 39 A), die Organe sahen eingedellt aus. Diesen Effekt konnte man meist in älteren Blüten beobachten, d.h. bereits elaborierten Blüten die sich innerhalb einer Infloreszenz weit außen liegend befanden.

2. Fehlende Organe: Einigen Blüten fehlten komplette Organe (Abb. 39 A, B, C, D, E, F und G). Es gab aber auch Blüten, bei denen Organteile fehlten, z.B. die Antheren der Stamen (Abb. 39 B, weißer Pfeil).
3. Störungen der Phyllotaxis: Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen konnte man beobachten, dass Organe, Infloreszenzen oder Primordien in nächster Nähe zueinander angelegt wurden, statt mit dem für *Arabidopsis* typischen Abstand zueinander. In Abb. 39 D, kann man beispielsweise drei Blüten sehen, die in direkter Nachbarschaft zueinander liegen.
4. Offene Organe: Das Gynözium besteht beim Wildtypen aus zwei miteinander verwachsenen Karpellen. Bei manchen Blüten waren die Karpelle jedoch nicht miteinander verwachsen (Abb. 39 E).
5. Gemischte Organidentitäten: Manche Organe wiesen Merkmale zweier verschiedener Organtypen auf, wie die Blüte in (Abb. 39 F, weißer Pfeil), die ein Petalen-Stamen-Mischorgan beinhaltete.
6. Überzählige Organe: Es wurden Blüten beobachtet, bei denen Extraorgane vorhanden waren, z:B Abb. 39 G eine Blüte mit fünf Sepalen und H eine mit drei Gynözien.

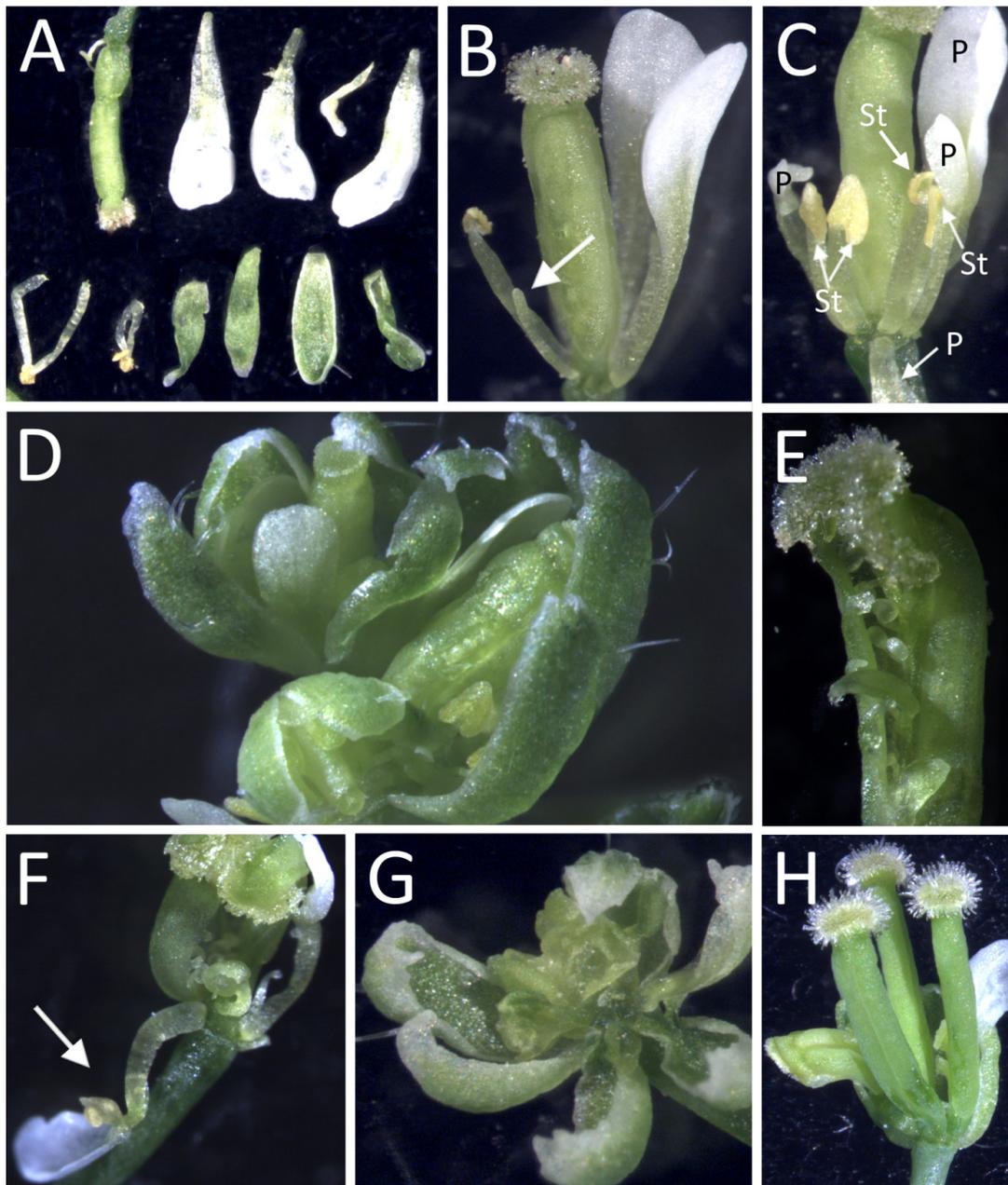


Abb. 39: Blütenphänotypen nach Ablation *DRNL*-exprimierender Zellen

Man erhielt Blüten, deren Organe verformt und/oder kümmerlich aussahen

(A). Deformierte Organe einer Einzelblüte, der zwei Stamen fehlen. (B) zeigt eine Blüte, der man die Sepalen mit einer Pinzette entfernt hat. Ihr fehlen vier Stamen und zwei Petale. (C) zeigt eine Blüte, die nur mediale Stamen beinhaltet. Ihre Sepalen wurden ebenfalls weg präpariert. (D) Drei Blüten, die in nächster Nähe zueinander angelegt wurden, und denen Organe des zweiten und dritten Wirtels fehlen. (E) Blüte mit unfusionierten Karpelle und frei liegenden Ovulen. (F) Blüte mit petaloidem Stamen. (G) weist überzählige Sepalen, auf, während die Organe in inner liegenden Wirteln aufgewickelt sind oder eine unbekannte Identität aufweisen. (H) Blüte mit drei Gynözien.

4. Diskussion

4.1.1 Beiträge der *DRNL*-Promotorelemente

In einem Ansatz bestehend aus phylogenetischen Analysen und Promotor-Deletionskonstrukten wurden vier *cis*-regulatorische Elemente im *DRNL*-Promotor identifiziert, die redundante, einzigartige oder synergistische Rollen bei der Transkription im Infloreszenzmeristem, den floralen Meristemen und dem Embryo spielen. Diese vier Elemente wurden in *Enhancer 1*, *Quencher*, *Enhancer 2* und *Enhancer 3* benannt.

Enhancer 1 ist allein für die Expression in den beiden sichelförmigen Expressionsdomänen zuständig, welche in floralen Meristemen des Stadium 2 jeweils die Petalen- und mediale Stamengründerzellen vormustern. Der Verlust von *En1*, z.B. beim Promotordeletionskonstrukt $\Delta^{EX}3::erGFP$, führte zu einem vollständigen Verlust des GFP-Signals in diesen Feldern. Des Weiteren hat *En1* einen quantitativen Einfluss auf die Expression in der ringförmigen Domäne in FMs des Stadium 3, welche die vier medialen Stamen vormustert. Fehlt *En1*, so ist die Expression in dieser Domäne diskontinuierlich und einzellig. Ein ähnlicher Effekt wurde beobachtet, wenn eine Punktmutation in die G-Box von *En1* eingeführt wurde (*LEn1G-BoxMut::erGFP*).

Enhancer 2 ist das relevanteste Promotorelement, da es phyllotaktische Signale in der IM-Peripherie perzipiert, die schließlich zur spiraligen Anordnung der floralen Meristeme und der kreuzständigen Anordnung der Sepalen führen. Der einzigartige Beitrag von *En2* beschränkt sich auf die Expression in den Sepalengründerzellen in Stadium 3 FMs ($L\Delta^{En2}::erGFP$). In Zusammenarbeit mit *En1* bildet er das IM-Signal ab. Des Weiteren ist *En2* für die Expression im Embryo verantwortlich. Der Verlust von *En2* in sowohl $S\Delta^{En2}$ als auch $L\Delta^{En2}$ hatte einen Signalverlust in allen embryonalen Stadien zur Folge, jedoch nicht in den Blattprimordien. Womöglich arbeiten mehrere Elemente redundant in den Blattanlagen, da die Expression in dieser Domäne erst bei größeren externen Deletionen terminiert, während das alleinige Fehlen von *En1*, *En2* oder *En3* keinen Effekt hat.

Die 100 bp lange Kernsequenz des *En2* (*En2^{core}*) ist hochkonserviert und besteht höchstwahrscheinlich aus dicht aneinandergereihten Transkriptionsfaktor-Bindestellen oder regulatorischen Elementen, an denen sich Proteinkomplexe ähnlich dem Enhanceosom (Panne, 2008) zusammenfinden und so die Spezifikation von Organgründerzellen steuern. Dafür spricht die Tatsache, dass die JASPAR-Datenbank in der *En2^{core}*-Sequenz eine Vielzahl an möglichen Transkriptionsfaktor-Bindestellen findet. Die 100 bp Kernsequenz reicht aus,

um sowohl die Expression in der 400 bp Deletion L/SA^{En2} in der IM-Peripherie ($SA^{En2}+En2^{core}::erGFP$), den Sepalengründerzellen ($LA^{En2}+En2^{core}$), als auch im Embryo ($SA^{En2}+En2^{core}::erGFP$) wiederherzustellen.

Enhancer 3 arbeitet synergistisch mit *En1* bei der Expression in der ringförmigen Domäne in Stadium 3 FMs. Hierfür spricht die Tatsache, dass das GFP-Signal in dieser Domäne fast vollständig zum Erliegen kommt, wenn neben *En1* auch noch *En3* fehlt ($SA^{En3}::erGFP$). Unabhängig von *En1* reguliert *En3* die Expression in späten embryonalen Stadien (Torpedo und Krückstock) negativ, da sein Fehlen zu einer ektopischen Expression in der L1 von Kotyledonen führt. Einen einzigartigen Beitrag scheint *En3* jedoch nicht zu haben. Sein Fehlen in $LA^{En3}::erGFP$ führt lediglich zu einer Abnahme in der Signalintensität der ringförmigen Expressionsdomäne der medialen Stamen. *En3* besteht aus zwei größeren Teilen: dem Brassicaceen-spezifischen *En3A* und *En3B*, der auch in *A. arabicum* und *C. hassleriana* konserviert ist. Das 77 bp kleine Subfragment *En3C* ist schlechter konserviert. Reinsertionen von *En3C* in SA^{En3} hatten keine Auswirkung auf die Expression im FM und führten im Embryo zu ektopischen Expressionen in der Hypokotyl-Epidermis. Dies ist allerdings ein Artefakt, da der *DRNL*-Promotor in diesem Bereich normalerweise nicht aktiv ist. Eine Reinsertion von *En3A* oder *En3B* in SA^{En3} rettet die Expression in FMs in einem deutlich geringeren Ausmaß, als die Reinsertion des 390 bp *En3ABC*-Fragments, welches die Expression in der ringförmigen Domäne auf das Niveau von $DRNL_{short}::erGFP$ rettet. Für die Expression in den Gründerzellen der medialen Stamen ist demnach der gesamte *En3* notwendig. Womöglich arbeiten beide Subfragmente synergistisch miteinander. Im Gegensatz dazu ist bei der quantitativen Interaktion von *En1* und *En3* nur *En3B*, nicht *En3A*, nötig. Nur dieses Subfragment ist in der Lage die Signalintensitäten in $LA^{En3}::erGFP3$ wiederherzustellen. Darüber hinaus können *En3A* und *En3B* in SA^{En3} unabhängig voneinander die Expression im Embryo zum Wildtyp hin retten. Bei *En3* handelt es sich demnach um ein Element, dessen beide Subfragmente synergistisch (mediale Stamen), redundant (Embryo) jedoch auch einzigartige Funktionen erfüllen (*En1-En3*-Interaktion). Die Nähe des *En3* zum Transkriptionsstart, die bei allen orthologen Promotoren gefunden wurde und der Befund, dass *En3* keinen einzigartigen Beitrag zum Expressionsmuster liefert, sondern an quantitativen Interaktionen beteiligt ist, könnte auch dafür sprechen, dass es sich hier um ein allgemeines Element des *DRNL*-Promotors handelt, dessen Aufgabe sich darauf beschränkt Signale distal gelegener regulatorischer Elemente zu integrieren.

Quencher scheint kein Expressionsmuster zu bedienen, da sich sein Verlust in dem Entwicklungsfenster, das betrachtet wurde (florale Meristeme bis Stadium 5) nicht im Fehlen einer Expressionsdomäne bemerkbar machte. Sein Verlust hatte in $LA^Q::erGFP$ jedoch quantitative Effekte zur Folge, die sich als Unterschiede der Signalintensitäten gewisser Expressionsdomänen zueinander äußerten. Einen ähnlichen Effekt konnte man auch bei $LA^{En3}::erGFP$ beobachten. Die Signalintensitäten der Domänen, welche von *En3* und *En1* bedient werden, also derer für Organe des zweiten und dritten Wirtels, gaben ein stärkeres Signal relativ zu den restlichen Expressionsdomänen von sich. Des Weiteren scheint das Expressionsmuster von $En123::erGFP$, dem *Q* fehlt, im IM und den FMs wildtypisch zu sein. Dies galt allerdings nicht für die Expression im Embryo bei dem $En123::erGFP$ ektopisch in der Epidermis im späten Torpedo- und Krückstockstadium exprimiert wurde. Die Aufgabe von *Q* ist dem zu Folge die Expressionsstärken von *En1*- und *En3*-bedienten Domänen und die embryonale Expression in späteren Stadien negativ zu regulieren.

Es konnte nicht eindeutig bestimmt werden, welcher der *Enhancer* für die Expression in den Karpell-Gründerzellen zuständig ist, die in einem kurzen Zeitfenster in floralen Meristemen des vierten Stadiums beobachtet werden können. Da diese Expressionsdomänen nur bei längeren externen Deletionskonstrukten verschwinden, legt das den Schluss nahe, dass mehrere *Enhancer* redundant die Expression in diesen Domänen steuern.

Zusammengefasst finden sich im *DRNL*-Promotor vier Elemente, von denen drei am Expressionsmuster (*Enhancer*) arbeiten und ein Element, das nur Transkriptionsstärken reguliert (*Quencher*).

4.1.2 Die *Enhancer* Elemente sind evolutionär konserviert

Die phylogenetischen Analysen des *DRNL*-Promotors unterschiedlicher Brassicaceen ergab, dass die fünf Elemente: das kleine Leseraster *At1g24600*, *En1*, *Q*, *En2* und *En3* stets in der gleichen Abfolge auf einer mikrosyntänen Region lokalisiert sind, die ebenfalls in der basalen Brassicacee *A. arabicum* vorzufinden ist. Auch bei der Cleomacee *Cleome hassleriana*, die zu der Schwestern-Familie der Brassicaceen gehört und sich vor ca. 30 - 40 Millionen Jahren einen gemeinsamen Vorfahren mit den Brassicaceen teilte (Kagale et al. 2014), findet man diese Anordnung. Da zu dem Zeitpunkt, an dem diese Arbeit entstand das Genom-Sequenzierungsprojekt noch nicht abgeschlossen und die Sequenzen noch von größeren Lücken durchzogen waren, lässt sich nicht mit Gewissheit sagen, ob *En1* auch in *C. hassleriana* vorhanden ist.

Die Elemente *At1g24600* und *En1* sind immer näher zu dem Gen der Rubisco-Methyl-Transferase (*At1g24610*, *RMT*) lokalisiert und könnten Elemente darstellen, die auch die Transkription von *At1g24610*, welches für ein Protein aus der Rubisco-Methyltransferase Familie kodiert oder *At1g24600* beeinflussen. Laut der Datenbank TAIR (www.arabidopsis.org) werden alle drei offene Leseraster *At1g24610*, *DRNL* und *At1g24600* in den selben Geweben exprimiert. Des Weiteren zeigt ein Experiment, bei dem das offene Leseraster von *At1g24600* durch *erGFP* ersetzt hat, dass das Konstrukt im IM, den FMs und den Embryonen von *Arabidopsis* ein Muster abbildet, das stark an *DRNL::CER/GFP* erinnert. Dies beweist, dass diese Region in der Lage ist bidirektional zu arbeiten (P. Comelli, unveröffentlichte Daten). Dass *At1g24600* und *En1* Elemente darstellen, die wichtig für die *DRNL*-Expression sind, zeigen Rettungsexperimente, bei denen der Phänotyp der *DRNL* Mutante *bcm1* komplementiert werden sollte. *bcm1* fehlen Organe des zweiten und des dritten Wirtels (Nag et al., 2007). Das *DRNL*-Promotor-Konstrukt $\Delta^{EX}I::erGFP$ ist zwar in der Lage alle Aspekte der *DRNL*-Expression abzubilden, zumindest in den floralen Meristemen bis Stadium 5 (spätere Stadien wurden nicht dokumentiert). $\Delta^{EX}I::DRNL$ rettet den *bcm1* Phänotypen nur mit geringerem Erfolg, als der 5,6 kb große Gesamtpromotor (P. Comelli, unveröffentlichte Daten). Es stellt sich die Frage, was die Rolle von *At1g24600* sein könnte. Aus der Literatur ist über das offene Leseraster noch nicht viel bekannt. De Torres-Zabala et al. zeigten, dass nach Behandlung mit dem Virulenzfaktor T3E die Expression von *At1g24600* um das 3,2 fache in *Arabidopsis* ansteigt und es womöglich eine Rolle bei der Abszisin säure-vermittelten Abwehr von Pathogenen spielen könnte (De Torres-Zabala et al., 2007). Es könnte sich aber auch um eine bisher unbeschriebene Komponente in der Blütenentwicklung handeln. Im Kontext von *DRNL* könnte dieses ORF für eine offene Chromatin-Struktur sorgen, wenn es transkribiert wird. Weiterhin muss das Protein, das von *At1g24600* kodiert wird, ebenfalls eine Funktion erfüllen, denn im Laufe der Evolution hat sich seine Aminosäuresequenz nicht stark verändert (Adrian Roggen, Bachelorarbeit).

4.1.3 Integration des Auxinsignalwegs

Mutationen in den vier kanonischen AuxREs des *DRNL*-Promotors und der Umstand, dass der *DR5*-Reporter kaum Überlappungen mit Expressionsdomänen des *DRNL*-Promotors aufweist (Chandler et al., 2011b, Chandler & Werr, 2014), zeigen, dass der kanonische Auxinsignalweg keine oder höchstens eine untergeordnete Rolle bei der Expression von *DRNL* spielen kann. Forschungsergebnisse belegen, dass die Auxinantwort *in vivo* komplizierter ausfällt und dass der synthetische *DR5*-Reporter, der aus einer fünffachen

Wiederholung des kanonischen TGTCTC-Bindemotivs besteht, wahrscheinlich nur einen Teilaspekt der Auxinantwort abbilden kann, da er womöglich keine natürliche Umgebung darstellt in der ARFs binden. In den letzten beiden Basen des kanonischen Motivs werden Variationen toleriert, jedoch nicht in der Kernsequenz TGTC (Boer et al., 2014, Mironova et al. 2014). Yamaguchi et al. zeigten durch Punktmutationen, dass nicht-kanonische AuxREs bei der Expression des *LFY*-Promotors eine Rolle spielen (Yamaguchi et al., 2013). ARFs binden als Homo- oder Heterodimere entweder mit anderen ARFs oder Transkriptionsfaktoren anderer Familien. In der Literatur wurden Interaktionen von ARFs mit Transkriptionsfaktoren aus der bHLH-Familie, z.B. ARF6 und PIF4 bei der Zellstreckung (Oh et al., 2014) und ARF8 und BIGPETALp bei der Petalen-Organogenese (Varaud et al., 2011), beschrieben. Daher erscheint es logisch, dass sich AuxREs oft in Nachbarschaft zu anderen AuxREs oder G-Boxen befinden. Nicht-kanonische AuxREs sind in allen vier *DRNL*-Promotorelementen zu finden und zwischen den analysierten Brassicaceen und *Cleome hassleriana* konserviert. In den *DRNL*-Promotor-Elemente treten AuxREs paarweise oder in Nachbarschaft zu G-Boxen auf, die Bindemotive für Transkriptionsfaktoren aus der bHLH-Familie darstellen.

Das Binden von ARFs in den Elementen *En1* und *En3A* vollzieht sich möglicherweise zusammen mit PIF-Transkriptionsfaktoren, wofür der Umstand spricht, dass *En1* und *En3A* in der Nachbarschaft ihrer AuxREs G-Boxen in einem optimalen Abstand, der bei *En1* 7 bp und bei *En3* 4 bp beträgt (Boer et al., 2014), beinhalten. Weiterhin konnte im Rahmen eines Chromatin-Immunopräzipitationsversuchs gezeigt werden, dass PIF3 mit hoher Wahrscheinlichkeit an die *En1*-G-Box bindet (Zhang et al., 2013). Das Vorhandensein ähnlicher Motive in *En1* und *En3* könnte die Grundlage der Redundanz darstellen. Möglicherweise könnte auch ein Redundanzpartner aus der PIF-Familie in *En3A* binden.

Punktmutationen in den AuxREs von *En1* und *En3* führen im Gesamtpromotor zu keinem qualitativen Effekt, da keine Domäne des *DRNL*-Expressionsmusters verloren geht. In *LEn3AuxREMut* führen Mutationen in den AuxREs zur Abnahme der Expressionsstärke in der Domäne der medialen Stamen (FMs Stadium 3 - 4) und erinnern so an die Deletion des *En3* in $L\Delta^{En3}$, während Mutationen in *SEn3AuxREMut* keinen offensichtlichen Effekt haben. Eine Punktmutation im AuxRE von *En1* hatte in dem Zeitraum, der betrachtet wurde (florale Meristeme bis zum Stadium 5), augenscheinlich keinen Einfluss auf das Expressionsmuster. Jedoch können quantitative Effekte nicht ausgeschlossen werden. Während der Fluoreszenzmikroskopischen Dokumentation von *LEn1AuxREMut::erGFP* erweckten die Proben, IMs und FMs, den Anschein, als sei die Expression aller Domänen verstärkt. Ob sich

jedoch tatsächlich die Mutation im AuxRE in einer Zunahme des kompletten Signals niederschlägt, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Sicher kann gesagt werden, dass die quantitative Interaktion von *En1* und *En3* intakte AuxREs in *En3* voraussetzt, die Expression in der ringförmigen Domäne jedoch nicht. Die Expression in der ringförmigen Domäne der medialen Stamen setzt aber eine intakte G-Box in *En1* voraus, da Mutationen in der G-Box von *En1* Einfluss auf die Expression in dieser Domäne haben, welche bei einer Mutation diskontinuierlich ist und an SA^{En3} erinnert. Allerdings trat dieser Effekt nicht bei allen analysierten Proben auf.

Interessant wäre es die G-Box von *En3* im verkürzten Promotor $DRNL_{Short}$ zu mutieren und die Ergebnisse mit SA^{En3} zu vergleichen. Möglicherweise könnte eine Mutation in der *En3*-G-Box in Abwesenheit von *En1* ebenfalls dazu führen, dass die Expression in der ringförmigen Domäne vollständig zum Erliegen kommt. Die Interaktion von PIFs oder bHLH-Transkriptionsfaktoren mit ARFs in *En1* und *En3* könnte möglicherweise die redundante Expression in den Gründerzellen der medialen Stamen steuern.

Weiterhin wäre es interessant zu erforschen, ob der Auxinsignalweg in *Q* eine Rolle spielt. Das Element *Q* besitzt zwei AuxREs in derselben Orientierung, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mutiert wurden. Die Deletion von *Q* äußert sich in einem ähnlichen quantitativen Effekt, wie der Verlust von *En3* und die Mutation der AuxREs in $LEn3AuxREMut$. Dieses Element hat auch Einfluss auf die Expression von *En1* und *En3* bedienten Expressionsdomänen. Interessant wäre es zu verfolgen, ob sich Punktmutationen in *Q* ebenfalls in quantitativen Effekten niederschlagen. sollte dies so sein und zeigten weitere Experimente, dass es tatsächlich quantitative Effekte in $LEn1AuxREMut$ gibt, sprächen die Befunde dafür, dass der Auxinsignalweg in den Elementen *E1*, *Q* und *En3* keine musterbildende Rolle spielt sondern lediglich die Expressionsstärken der Domänen reguliert.

Verglichen mit *En3* scheint der Auxinsignalweg in *En2* anders integriert zu sein, obwohl beide Elemente mit *En1* interagieren. Intakte AuxREs sind essentiell für die Funktion des *En2*. $SEn2MutAuxRE1,2$ hat dieselbe Auswirkung, wie die 400 bp Deletion in SA^{En2} : Das Signal im IM und den Sepalengründerzellen geht verloren. Weiterhin kann das 50 bp Subfragment *En2E*, das beide AuxREs beinhaltet, die Expression in der IM-Peripherie, den FMs und in den späten embryonalen Stadien retten ($SA^{En2}+En2E$). Aufgrund der Redundanz treten die Effekte nur in Abwesenheit von *En1*. $LEn1AuxRE1Mut1,2::erGFP$ bildet ein wildtypisches Muster im IM und den FMs ab. Des Weiteren scheint das distale AuxRE1 eine größere Rolle bei der Expression in der IM-Peripherie zu spielen. Einzelmutationen in ihm führen zu einem Verlust des Signals in der IM-Peripherie ($SEn2AuxREMut1$), während eine

Mutationen im proximalen AuxRE2 lediglich zu einer Schwächung des Signals führt (*Sen2AuxRE2Mut*). Beide Einzelmutationen in *DRNL_{Short}* bewirken eine schwächere Expression in den Sepalengründerzellen in FMs aller Stadien, was zeigt, dass sie hier synergistisch wirken.

Bei der Expression in den embryonalen Stadien stellt sich die Situation etwas anders dar: es gibt keine Redundanz von *En2* und *En1*. Die 400 bp Deletion in *L*- und- *SA^{En2}* führt zu einem fast kompletten Verlust des Signals in allen Stadien. Die Mutationen in beiden AuxREs (*L/SAuxREMut1,2*) haben den gleichen Effekt: Die Expression im globulären Stadium und dem Krückstockstadium geht verloren und die Expression im Herz und im Torpedostadium ist abgeschwächt. Bei beiden Einzelmutationen geht die Expression in keinem der embryonalen Stadien verloren, weder im globulären Stadium noch dem Krückstockstadium, was zeigt, dass beide AuxREs im Embryo wahrscheinlich redundant arbeiten. Es gibt lediglich einen Unterschied in der Expression im Krückstockstadium: Die Mutation im distalen AuxRE1 zeigte keine Auswirkungen, während die Mutation im proximalen AuxRE2 zu einer ektopischen Expression in der L1-Schicht der Kotyledonen führte.

Da intakte AuxREs für die Funktion des *En2* entscheidend sind und ARF5/MP bei der Expression des Paralogs *DRN* im Embryo eine Rolle spielt (Cole et al., 2009) wurde die Expression von *DRN_{Long}::erGFP* und *DRNL_{Short}::erGFP* in der Funktionsgewinn-Mutante *mpS319* untersucht. Die Expression beider Konstrukte unterscheidet sich in den morphologisch auffälligen Embryonen nicht voneinander. Die Expressionsdomäne im Herzstadium ist verbreitert und umfasst den apikalen Bereich. Im Torpedo- und dem Krückstockstadium ist die Expression in der Vaskulatur stark verbreitert. In der IM-Peripherie wird *DRNL_{Long}::erGFP* in einer ringförmigen Domäne um das IM- und das FM-Zentrum ektopisch exprimiert. Es fehlt jedoch die Fokussierung auf einzelne Expressionsdomänen, wie beim Wildtyp. *DRNL_{Short}::erGFP* wird in den FMs in der gleichen Weise exprimiert. Im IM ist die Signalstärke des erGFPs bei *DRNL_{Short}::erGFP* jedoch drastisch vermindert.

Sowohl im Embryo (zumindest ab dem Herzstadium) und in der IM- und FM-Peripherie kommt es in *mpS319* zu einer ektopischen Expression von *DRNL*, was einen Hinweis darauf liefert, dass MP die Expression von *DRNL* in der embryonalen Entwicklung der Vaskulatur und bei der Blütenentwicklung kontrolliert. Dabei ist die Expression in der IM-Peripherie abhängig von einem intakten *En1*, was die Expression von *DRNL_{Short}::erGFP* belegt.

Um diese Frage zu klären, ob MP eine stromaufwärts von *DRNL* agierende Komponente ist wurden bereits ChIP-qPCR Versuche begonnen, deren Ergebnisse zur Zeit leider noch nicht vorliegen.

Zusammengefasst benötigt die Aktivität des *DRNL*-Promotors in der IM-Peripherie ein intaktes distales AuxRE1 an das möglicherweise MP binden könnte, was noch geklärt werden muss. Bei der Expression in den Sepalengründerzellen arbeiten beide AuxREs synergistisch, da der Ausfall jeweils eines einzelnen AuxREs geringfügigere Folgen hat, als der Ausfall beider. Da Einzelmutationen im Embryo, zumindest im globulären und dem Krückstockstadium, kaum Auswirkungen haben ist davon auszugehen, dass die AuxREs hier redundant arbeiten.

4.1.4 Weiterreichende Analyse von *En2*

En2 ist spiegelsymmetrisch aufgebaut. Beide AuxREs werden ebenfalls von G-Boxen flankiert, die jedoch eine schlechtere Konservierung aufweisen, aber von der JASPAR-Datenbank noch immer als solche erkannt werden. Möglich ist, dass in *En2* ebenfalls ARFs gemeinsam mit bHLH-Faktoren binden oder ARF-Dimere an beide AuxREs, die invers zueinander orientiert und durch eine 19 bp Sequenz getrennt sind, binden. Besagte Sequenz ist innerhalb der sechs analysierten Brassicaceen invariant. Der Abstand beider AuxREs ist weitaus größer, als der optimale Abstand von 5 - 8 bp (Boer et al., 2014). ARF-Dimere könnten dennoch beide AuxREs binden. Es ist möglich, dass der Abstand beider AuxREs einer Drehung der DNA-Helix entspricht, so dass es denkbar wäre, dass ARF-Dimere, wenn sie an beide Motive binden, in physikalischem Kontakt zueinander treten könnten. Denkbar wäre es auch, dass die 19 bp Sequenz eine Schleife bildet, so dass beide AuxREs näher zueinander rücken könnten. Da das 50 bp Subfragment *En2E*, das beide AuxREs beinhaltet, in der Lage ist die Expression in der IM-Peripherie, den FM's und in den späten embryonalen Stadien zu retten (*SA^{En2}+En2E*). Es zeigt, dass AuxREs eine große Rolle spielen.

Während diese Arbeit entstand wurden weitere Versuche durchgeführt, die geholfen haben die Funktionsweise des *En2* weiter aufzuschlüsseln. Drei 5 bp Deletionen ($\Delta 5$ bp1-3) wurden in der Sequenz zwischen beiden AuxREs eingeführt, die die Elemente relativ zueinander verschieben und so die Frage klären sollten, ob eventuell beide AuxREs miteinander interagieren. Weiterhin wurden neun Konstrukte erstellt, bei denen eine 10 bp lange Sequenz der Basenfolge ATATATATAT durch die *En2*-Kernsequenz "geschoben" (*Scan1-9*) und sie so systematisch mit Mutationen durchzogen wurde (Abb. 40). Die Ergebnisse der Versuche sind in den Abbildungen 41 und 42 zusammengefasst.

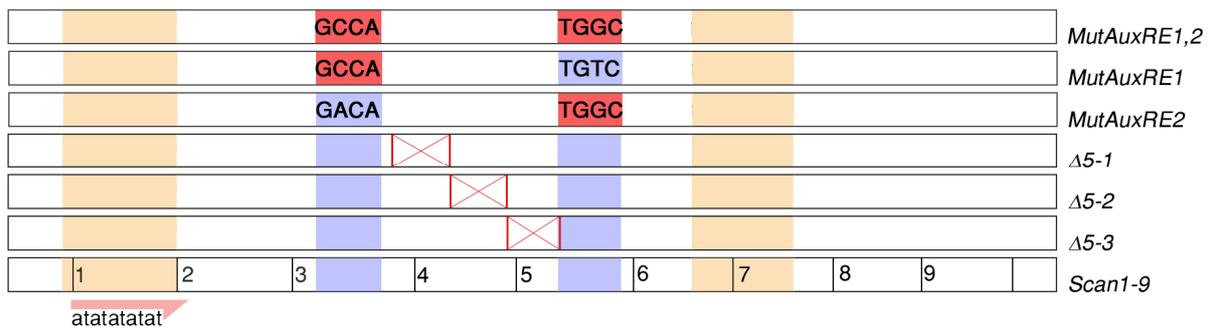


Abb. 40: Schematische Darstellung von Promotorkonstrukten, bei denen *En2*core modifiziert wurde. AuxREs sind blau, Mutationen rot und die G-Boxen sind orange markiert.

Da alle drei 5 bp-Deletionen und *Scan4*, bei dem der Bereich zwischen beiden AuxREs betroffen ist, ähnliche Effekte bei der Expression im IM, den FMs und den embryonalen Stadien zeigen, ist vermutlich der Abstand der AuxREs zueinander nicht entscheidend. Die Änderungen in der Expression resultieren eher daher, dass eine Transkriptionsfaktor-Bindestelle zerstört wurde. Die Expression in der IM-Peripherie kommt komplett zum Erliegen wenn entweder das distale oder das proximale AuxRE oder die proximale G-Box von einer 10 bp Mutation betroffen ist (*Scan3*, *Scan5* und *Scan7*). Möglicherweise könnten die 10 bp Mutationen mehrere Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf einmal betreffen, weswegen sie zu stärkeren Effekten führen, als Punktmutationen in den AuxREs. Die Sequenz ATATATATAT beinhaltet des Weiteren auch eine Bindestelle für Faktoren der AHL-Familie (Jun et al., 2014), so dass durchaus denkbar ist, dass weitere Transkriptionsfaktoren in der Mutation binden und es so zu Neuarrangierungen innerhalb des Transkriptionsfaktorkomplexes kommt deren Konsequenzen nicht absehbar sind.

En2 ist über einen langen Zeitraum aktiv, von der IM-Peripherie und floralen Meristemen bis ins Stadium 5 sowie fast während der gesamten Embryogenese. Daher müsste innerhalb des

Transkriptionsfaktor-Komplexes die Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren zeitlich und räumlich in den unterschiedlichen Expressionsdomänen variieren. Unterschiedliche Bereiche der Kernsequenz spielen demzufolge eine Rolle bei den unterschiedlichen Expressionsdomänen. Bei der Expression in der IM-Peripherie ist fast der komplette *En2^{core}* nötig während die Expression in Sepalen von FMs des Stadiums 2 bis 4 abhängig vom AuxRE1 und der proximalen G-Box2 ist (*Scan 3, 7, 8*). Mutationen im proximalen AuxRE2, sowie *Scan4* und *8*, führen darüber hinaus zur Minderung der Expression in Sepalengründerzellen bei FMs des Stadium 4. Im frühen globulären Stadium der Embryogenese hat, ausgenommen *Scan2* und *Scan9*, jede Mutation Auswirkung auf die Expression des erGFP-Markers. Das Stadium, das nie von der 10 bp Mutation betroffen war, ist das späte Torpedo-Stadium. Es ist allerdings betroffen, wenn beide AuxREs gleichzeitig mutiert sind (*L/SEn2AuxREMut1,2*). Eventuell haben Einzelmutationen keinen so großen Effekt, da es bei der embryonalen Expression viel Redundanz innerhalb des *En2* gibt. Selten kommt es bei Einzelmutationen zum vollständigen Verlust des erGFP-Signals. Sie äußern sich eher in einer Abschwächung des Signals. Weiterhin führen die meisten 10 bp Mutationen (ausgenommen *Scan2* und *Scan9*) zu einer Minderung des erGFP-Signals in der IM-Peripherie. Fast alle *Scan*-Mutationen haben eine Beeinträchtigung der Expression in der IM-Peripherie zu Folge, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Bindung von ARFs und weiteren Transkriptionsfaktoren in einem größeren Komplex, ähnlich dem Enhanceosom (Panne, 2008), stattfindet, was wiederum eine mögliche Erklärung dafür liefern würde, dass die Rettung mit dem Subfragment, dem die entsprechenden flankierenden Sequenzen fehlen, in $S\Delta^{En2}+En2E$ nicht in allen Fällen rettet.

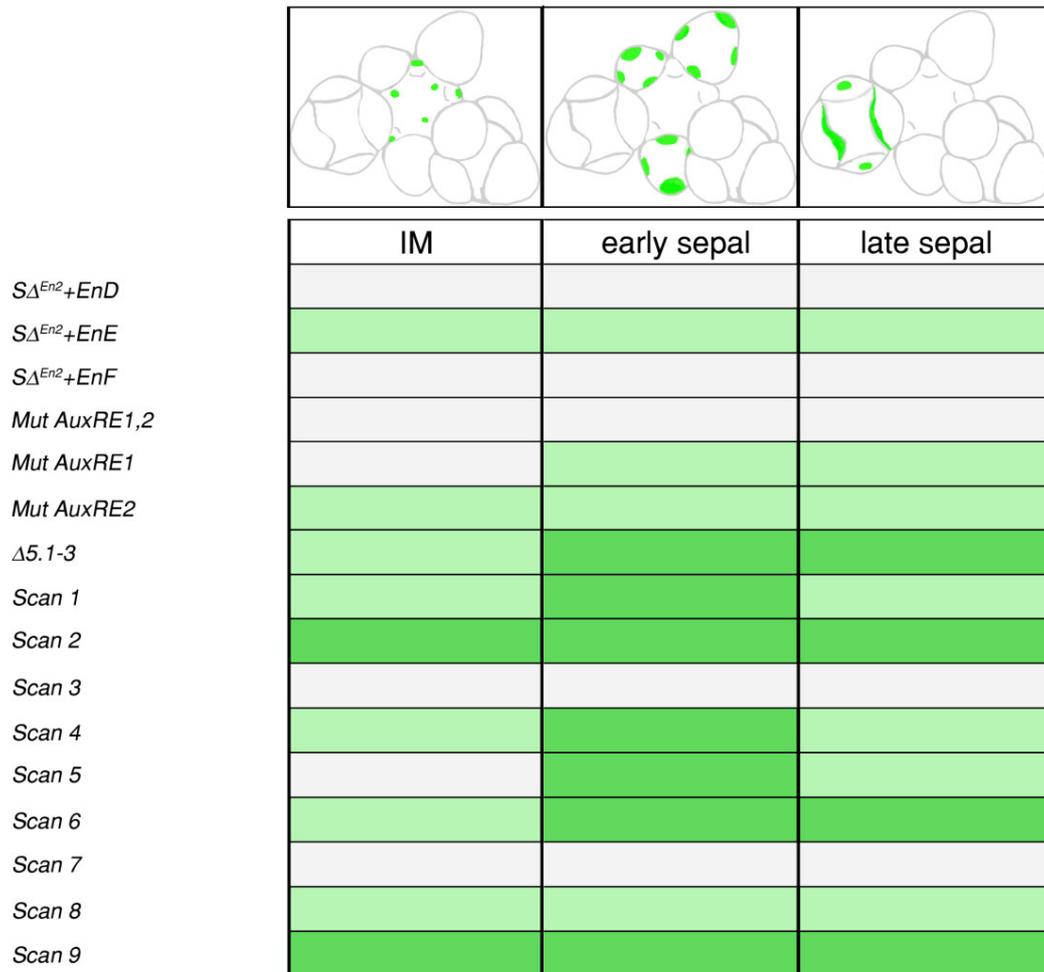


Abb. 41: Auswirkungen von Modifikationen im *En2^{core}* auf die Expression im IM und den FMs
 Weiße Felder repräsentieren einen Signalverlust während hellgrüne Felder eine schwächere Expression bedeuten. Dunkelgrüne Felder bedeuten eine wildtypische Expression.

	globular	late globular	heart	early torpedo	late torpedo	walking-stick
$S_{\Delta^{En2+EnD}}$						
$S_{\Delta^{En2+EnE}}$						
$S_{\Delta^{En2+EnF}}$						
Mut AuxRE1,2				< >		
Mut AuxRE1				< >	< >	
Mut AuxRE2				< >	< >	< >
$\Delta 5.1-3$						
Scan 1						
Scan 2						
Scan 3						
Scan 4						
Scan 5						
Scan 6				+++		< >
Scan 7						
Scan 8						
Scan 9				+++		< >

Abb. 42: Auswirkungen von Modifikationen im $En2^{core}$ auf die Expression embryonaler Stadien
 Weiße Felder repräsentieren einen Signalverlust während hellgrüne Felder eine schwächere Expression bedeuten. Dunkelgrüne Felder bedeuten eine wildtypische Expression. +++ entspricht einer verstärkten Expression während "< >" eine verbreiterte, ektopische Domäne bedeutet.

Zusammengefasst handelt es sich bei $En2$ um ein *cis*-regulatorisches Element des *DRNL*-Promotors, welches in der Lage ist Signale in der IM-Peripherie zu perzipieren, die schließlich zur phyllotaktischen Anordnung der Organe bei *Arabidopsis* führen. Bei der Phyllotaxis spielt der Auxinsignalweg durchaus eine Rolle. Die Befunde sprechen jedoch dafür, dass die Bindung von ARFs in $En2$ in einem größeren Proteinkomplex, ähnlich dem Enhanceosom, stattfindet.

4.2 Klonale Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein System in *Arabidopsis* etabliert, das es erlaubt von *DRNL*-Aktivität markierte Gründerzellen klonal zu markieren. Es handelt sich um ein zwei Komponenten System bestehend aus einem Treiber- und einem Reporterkonstrukt. Der Treiber stellt nach erfolgter Dexamethason-Applikation in den Zellen, in denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist, die Cre-Rekombinase her, die ein Rekombinationsereignis im Reporterkonstrukt katalysieren kann. Nach einer erfolgten Rekombination treibt dann der *35S*-Promotor aus *CaMV* des rekombinierten Reporters das Gen für *GUS* an. Da der rekombinierte Reporter auf Tochterzellen vererbt wird lassen sich so Tage nach Dex-Induktion klonale Sektoren im Pflanzenmaterial, in denen das GUS-Enzym aktiv ist, durch eine simple Färbung visualisieren (Material und Methoden 2.4).

Transgene Pflanzenlinien, welche im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurden, bildeten erst nach einer Dexamethason-Behandlung Sektoren mit GUS-Aktivität, während unbehandelte Kontrollpflanzen keine Aktivität aufwiesen und farblos blieben. Weiterhin korrelierten blaue Sektoren mit einem rekombinierten Reporterkonstrukt, was mit Hilfe einer PCR und einer anschließenden Sequenzierung gezeigt werden konnte.

Die drei Linien mit dem *DRNLpOpCre*-Treiber stammten aus unabhängigen Transformationsereignissen und wurden entweder mit der selben Reporterlinie kombiniert oder mit einer Unabhängigen. Dabei zeigte sich, dass alle Linien nach Induktion vergleichbare klonale Sektoren bilden. Die beobachteten Muster waren demnach charakteristisch und in unabhängigen Linien reproduzierbar. Weiterhin kamen zwei unabhängige Linien mit *DR5pOpCre*-Treibern zum Einsatz, deren klonale Sektoren sich von denen mit *DRNLpOpCre*-Treiber unterschieden. Die Art der erzeugten klonalen Sektoren hing demnach davon ab, welcher Promotor in der Treiberlinie zum Einsatz kam.

Zusammengefasst haben wir hier ein System mit dessen Hilfe man Zellschicksale verfolgen kann, das induzierbar ist, keine Hintergrund-Aktivität hat und nur in den Zellen arbeitet, in denen der gewählte Treiberpromotor aktiv ist. Es eignet sich somit, um das Schicksal von Zellen in denen der *DRNL*- oder *DR5*-Promotor aktiv ist zu verfolgen. Im Folgenden werden die mit diesem System erzielten Ergebnisse diskutiert.

4.2.1 Häufigkeit angefärbter Organe

Die klonalen Analysen wurden überwiegend mit der Linie *DRNLpOpCre/RepEx #7*, in die Treiber- und Reporterkonstrukte gleichzeitig mit Hilfe der *floral dip* Methode eingebracht wurden, durchgeführt. Die Muster der klonalen Sektoren konnten in zwei unabhängigen

Linien, die aus Kreuzungen hervorgingen, reproduziert werden und waren demnach charakteristisch.

Die Hälfte aller analysierten Infloreszenzen wies keine GUS-Sektoren auf. Womöglich handelte es sich hier um Infloreszenzen, die relativ zum Dex-Applikationszeitpunkt keine *DRNL*-Promotoraktivität mehr aufwiesen wodurch keine Cre-Rekombinase gebildet werden und es nicht zu Rekombinationen kommen konnte. Bei den von GUS-Sektoren betroffenen Infloreszenzen variierte die Anzahl betroffener Organe. Am Häufigsten waren die Hochblätter, und diese wiederum überwiegend an den Hydathoden betroffen. Ein Infloreszenzmeristem ist in der Lage mehrere Hochblätter gleichzeitig anzulegen und der *DRNL*-Promotor ist möglicherweise über einen längeren Zeitraum in den Hydathoden aktiv. Bis auf die Organe des zweiten Wirtels waren alle Organe ähnlich häufig betroffen, was nicht verwundert, da der *DRNL*-Promotor in Petalen-Gründerzellen nur in einem kurzen Zeitfenster (florale Meristeme des Stadiums 2) aktiv ist. Des Weiteren entstehen Petalen aus einer kleinen Gruppe von Gründerzellen, während der *DRNL*-Promotor in den anderen Organen über einen längeren Zeitraum und auch in einer größeren Gruppe von Zellen aktiv ist. Häufig wurden auch junge Achsenmeristeme angefärbt, da *DRNL* überwiegend in jungen Geweben aktiv ist. Da mehrere Achsenmeristeme gleichzeitig angefärbt wurden legt dies den Schluss nahe, dass sekundäre Meristeme in den Achsenknospen gleichzeitig angelegt werden. Weiterhin legt der Zeitpunkt der Dexamethason-Applikation relativ zum Entwicklungszustand der Blüten den betroffenen Wirtel fest. Anhand der betroffenen Organe lassen sich demnach Rückschlüsse auf den Entwicklungszustand der Blüten relativ zur Dex-Applikation schließen. Blüten, die zum Zeitpunkt der Dexamethason-Applikation weiter elaboriert waren (KatA), wiesen überwiegend Sektoren im dritten Wirtel auf. Jüngere Blüten (KatJ) hatten dagegen eher Sektoren in den Sepalen. Die in Wirteln angelegten Blütenorgane werden von Außen nach Innen spezifiziert. Blüten bei denen überwiegend der dritte Wirtel von GUS-Sektoren betroffen ist hatten die Spezifikation des ersten und zweiten Wirtels schon abgeschlossen und wiesen folglich keine *DRNL*-Aktivität mehr auf. Bei jüngeren Blüten war der *DRNL*-Promotor im ersten Wirtel aktiv und musterte sukzessiv die Sepalengründerzellen vor, während weiter innen liegende Wirtel noch nicht spezifiziert waren.

4.2.2 In blattartigen Organen ist *DRNL* überwiegend in den Hydathoden aktiv

Der Großteil der Sektoren in Rosettenblättern befand sich überwiegend am Rand an Stellen, an denen sich die Hydathoden befinden. Hydathoden sind wasserabscheidende Drüsen, die

mit dem vaskulären System verbunden sind und es Pflanzen erlauben Wasser aktiv oder passiv auszuscheiden (Guttation). Dass der *DRNL*-Promotor in den Hydathoden aktiv ist und die beobachteten Sektoren keine Artefakte sind bestätigen auch *DRNL::GUS*-Linien, bei denen man ebenfalls GUS-Aktivität an den Blatträndern beobachten kann (Nag et al., 2007). Bei älteren Blättern befanden sich die Sektoren überwiegend am basalen Teil des Blattes, während bei jüngeren Blättern die Sektoren in der Nähe oder direkt auf der Blattspitze waren. Des Weiteren konnte man selten in jüngeren Blättern Sektoren auf der Mittelrippe beobachten, was wieder eine Assoziation mit dem vaskulären System darstellt. Noch seltener erhielt man Sektoren auf der Lamina. Da Blätter ein basales Wachstum aufweisen, sind Gewebe an der Spitze älter als die Gewebe an der Basis. Die Beobachtungen lassen sich damit begründen, wie weit das Blatt relativ zum Dexamethason-Applikationszeitpunkt entwickelt war und dadurch dass der *DRNL*-Promotor nicht mehr in älteren Geweben aktiv ist. Auffallend ist, dass das überwiegende Muster die Hydathoden betrifft und nicht, wie man erwartet hätte, größere Sektoren auf der Lamina entstehen. Rosettenblätter gehen aus zwei bis acht Gründerzellen hervor (Bossinger & Smith, 1996). Man würde bei diesen Organen durchaus Sektoren erwarten, die das halbe Blatt oder wenigstens ein Achtel der Blattfläche ausmachen. Statt dessen erhielt man überwiegend Sektoren in vaskulären Geweben. Die Ursache hierfür könnte sein, dass das Zeitfenster, an denen *DRNL* in den Blatt-Gründerzellen aktiv ist, schwierig zu treffen ist, oder, dass *DRNL* nicht in den Gründerzellen von Rosettenblättern exprimiert wird. In embryonalen Kotyledonen wird *DRNL* ab dem Torpedostadium in subepidermalen Geweben, die wahrscheinlich die Provaskulatur darstellen, exprimiert. Eventuell ist es in echten Blättern ähnlich und *DRNL* ist nur in der Provaskulatur und später den Hydathoden-Gründerzellen aktiv. In weiteren Experimenten müsste zunächst überprüft werden, ob Sektoren auf der Lamina nicht auch ein Artefakt sein könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konzentrierte man sich mehr auf die Analyse von Infloreszenzen. Dabei wurden nicht annähernd so viele Rosettenblätter analysiert, wie andere Organe. Im Gegensatz zu den Rosettenblättern fand man in Hochblättern durchaus Sektoren, die darauf schließen lassen, dass *DRNL* ein Gründerzellmarker der Hochblätter ist. Neben den bekannten Sektoren an den Blatträndern und der Mittelrippe fanden sich weiterhin Sektoren auf dem Lamina.

Auffallend ist, dass in blattartigen Organen die Sektoren überwiegend vaskuläres Gewebe betreffen, was den Schluss nahe legt, dass *DRNL* eine Rolle in der Entwicklung der Vaskulatur spielt. *drnl* Mutanten haben zumindest eine komplexere Nervatur in den Kotyledonen (John Chandler, unveröffentlichte Daten). Eklund et al. zeigten, dass *DRNL* in

der Lage ist die Expression von Genen der *SHI/STY*-Familie zu aktivieren, die bei der Entwicklung der Blattnervatur eine Rolle spielen, indem sie wiederum die Expression von Enzymen der Auxinbiosynthese (*YUC4* und *YUC8*) steuern (Eklund et al., 2011). Des Weiteren wurden Arbeiten publiziert, die *DRN*, das Mitglied der *SHI/STY*-Familie *SRS5*, *MP* und einen bisher unbekanntem Faktor *Dof5.8* in Beziehung zueinander setzen. Pflanzen, in denen *Dof5.8* überexprimiert wird zeigen eine Reduktion in der Komplexität ihrer Blattnervatur, die durch die ektopische Expression von *DRN* und *SRS5* vom *MP*-Promotor gerettet werden kann. *Dof5.8* wird direkt durch *MP* aktiviert. Seine Überexpression in *MP::Dof5.8*-Linien führt zu einer reduzierten Transkriptmenge von *DRN* und einigen *SHI/STY*-Genen (Konishi et al., 2015). In *En2^{core}*, in der hochkonservierten 19 bp-Sequenz zwischen den beiden AuxREs, findet sich auch eine Bindestelle für Dof-Transkriptionsfaktoren (siehe Anhang), so dass es interessant zu klären wäre, ob *DRNL* nicht auch in diesen Regelkreis integriert ist.

4.2.3 Klonale Sektoren der Blütenorgane

Auch in den Sepalen und den Petalen finden sich klonale Sektoren in der Mittelrippe. Wieder ist überwiegend vaskuläres Gewebe betroffen, welches seinen Ursprung in der L3-Schicht hat. Die Sepalen gehen aus acht Gründerzellen hervor, die sich in allen drei Zellschichten befinden (Bossinger & Smith, 1996). Es konnten komplett blau gefärbte Sepalen beobachtet werden, bei denen es möglicherweise zu einer Rekombination in der oder den Gründerzellen der L1, welche die Epidermis bilden, gekommen ist. Denkbar ist auch, dass es zu Rekombinationen in der oder den Gründerzellen der L2, welche das Mesophyll bilden, gekommen ist, die Epidermis ohne GUS-Aktivität blieb und daher nach der Färbung transparent erscheint. Dieser Sachverhalt ließe sich mit Querschnitten durch das Sepalengewebe und anschließender Mikroskopie klären. Innerhalb einer Blüte waren meist mehrere Sepalen betroffen. Die Sektoren auf der abaxialen Seite waren größer, als die auf der adaxialen Seite, oder die adaxiale Sepale blieb gänzlich farblos. Da *DRNL* zuerst die abaxialen Sepale vormustert, gefolgt von den beiden lateralen und zuletzt die Adaxiale, lässt sich dieses Muster mit dem Dex-Applikationszeitpunkt relativ zur Aktivität des *DRNL*-Promotors in den Sepalengründerzellen erklären. Neben Sektoren in der Vaskulatur konnte man bei den Petalen auch größere keilförmige Sektoren im apikalen Bereich, die sich bis zur Basis hin ziehen, beobachten. Auffallend ist, dass die Sektoren in den drei Petalen in der Abb. 33 A sich ähnlich sehen, aber wahrscheinlich unabhängige Ereignisse darstellen. Es muss zum selben Zeitpunkt zu synchronen Rekombinationsereignissen gekommen sein, die eventuell in

floralen Meristemen des Stadium 5 statt gefunden haben, wenn *DRNL* Organprimordien des zweiten, dritten und vierten Wirtels vormustert. Dafür spricht, dass die Sepalen der Blüte in Abb. 33 A keine GUS-Aktivität zeigen, während GUS-Sektoren in allen sechs Antheren zu sehen sind. Dem entspricht der Umstand, dass *DRNL* in FMs des Stadium 5 nicht mehr in den Sepalen, jedoch in den Stamengründerzellen aktiv ist.

Stamen bestehen aus zwei getrennten Teilen: dem Filament und den Antheren. Ihren Ursprung haben sie in vier Gründerzellen (Bossinger & Smith, 1996). Zellen der L1 bilden die Stamenepidermis, die Mikrosporangienzellen stammen aus Zellen der L2 und das Konnektiv und die Vaskulatur stammt aus der L3. Die klonalen Sektoren in den Stamen umfassten entweder nur Teile des Organs oder das Filament. Bei den Sektoren in den Antheren gab es Unterschiede: Entweder waren die Antheren komplett blau, was für eine Rekombination zu einem früheren Zeitpunkt spricht, oder nur zum Teil gefärbt. Solche kleineren Sektoren stellen womöglich Rekombinationen zu späteren Zeitpunkten dar. Es wurden auch Sektoren, die nur in den Konnektiven auftraten, beobachtet. Die Sektoren in den Stamen zeigen, dass diese Organe aus unterschiedlichen Zellschichten stammen müssen und dass Filamente nach den Antheren auswachsen oder angelegt werden. Weiterhin fällt wieder die Synchronität der Rekombinationen auf. Man erhielt Blüten, bei denen alle sechs Stamen von gleichen Sektoren betroffen waren (z.B. Blüten, bei denen alle Antheren blau waren). Da die einzelnen Sektoren keinen Kontakt zueinander haben, muss es sich hier um mehrere unabhängige Rekombinationsereignisse handeln. Weiterhin bestätigen die klonalen Sektoren, dass mediale und laterale Stamen aus einem räumlich und zeitlich getrennten Ursprung stammen müssen (vgl. Abb 34 H und I).

Das Gynözium hat seinen Ursprung in acht Gründerzellen und setzt sich aus zwei miteinander verwachsenen Karpellen zusammen (Baossinger & Smith, 1996). In den Gynözien wurden überwiegend Sektoren im oberen Bereich, dem Stylus, erhalten. Meistens waren dies zwei spiegelbildlich zueinander angeordnete kleinere Sektoren oder ein einzelner größerer Sektor, während der Rest des Gynözioms ungefärbt blieb. Daraus lässt sich schließen, dass Karpelle auch ein basales Wachstum haben und Gewebe am Apex älter sind. Das Stigma wurde nie angefärbt, was den Schluss nahe legt, dass *DRNL* bei seiner Bildung keine Rolle spielt. Es hat seinen Ursprung in der L1, während der Stylus aus der L2 entstammendem Gewebe besteht, welches mit einer aus der L1 stammenden Epidermis überzogen ist. Es könnte sich also bei den beiden spiegelbildlichen Sektoren im Stylus um die zwei *DRNL*-Expressionsdomänen handeln, die man in floralen Meristemen des Stadium 3 beobachten kann und von denen angenommen wird, dass sie die beiden Karpelle vormustern. Neben diesen überwiegenden

Sektoren am Stylus erhielt man auch seltenere klonale Sektoren, die streifenförmig von der Basis zum Apex reichten und sich mit den Erwartungen an einen Gründerzellmarker decken. Womöglich stellen diese streifenförmigen Sektoren frühe Rekombinationsereignisse dar, während die zuerst beschriebenen späte Ereignisse sind. In seltenen Fällen erhielt man Gynözien, die zur Hälfte blau waren oder auch komplett gefärbte Organe, bei denen es möglicherweise zu Rekombinationen in einem Teil der Gründerzellen gekommen ist. Klonale Sektoren wurden auch im Blütenboden, bzw. an der Basis des Gynöziums, beobachtet, die sich manchmal in weitere Blütenorgane erstrecken konnten. Bei ihnen muss es sich um ein Rekombinationsereignis in tiefer liegenden Schichten, wie der L3 handeln. Dafür spricht die Beobachtung, dass solche Sektoren sich auch in die Vaskulatur der Organe ausdehnen konnten. Des Weiteren fanden sich abaxial klonale Sektoren in Pedicelen, die den Anschein erwecken, als seien sie subepidermal.

4.2.4 Zellen, in denen der *DR5*-Promotor aktiv ist, haben ein anderes Schicksal als von *DRNL*-markierte Zellen

Die klonalen Sektoren von Pflanzen mit *DR5*-Treiber unterscheiden sich deutlich von Pflanzen mit *DRNL*-Treiber. Bei Pflanzen mit *DR5pOpCre*-Treiber konnten klonale Sektoren in der Wurzel beobachtet werden, die sich mit Dokumentationen über die Aktivität des *DR5*-Reporters decken (Sabatini et al., 1999). In der Wurzel konnte die Wurzelhaube oder das Organisationszentrum des Wurzelmeristems betroffen sein. In Blütenmeristemen waren überwiegend Sepalen von Sektoren betroffen. Seltener fanden sich kleinere Sektoren am Gynözium. Die Organe des zweiten und dritten Wirtels waren jedoch nie von GUS-Sektoren betroffen, was ein weiterer Beleg dafür ist, dass Zellen in denen die kanonische Auxinantwort aktiv ist und von *DRNL*-markierte Gründerzellen andere Schicksale haben. Lediglich in Sepalen gab es Überschneidungen. Die Sektoren im Gynözium könnten auch Artefakte sein, da *DR5::GFP* nicht im Zentrum von FMs exprimiert wird. Die Sektoren in den Rosettenblättern zeigen deutliche Unterschiede zu *DRNLpOpCre*-Pflanzen. Man vergleiche dazu Abb. 37 F, G, H mit I und J. Die Pflanzen in den genannten Abbildungen wurden mit derselben Reporterlinie gekreuzt. Sie unterscheiden sich nur in der Art ihres Treibers. Pflanzen mit *DRNLpOpCre*-Treiber (Abb. 37 I und J) weisen die bekannten Sektoren in den Hydathoden auf, während bei Pflanzen mit *DR5pOpCre*-Treiber klonale Sektoren die Blattspreite betreffen können. Des Weiteren war auch die Vaskulatur und neben den Hydathoden und der Mittelrippe auch sekundäre Blattvenen betroffen. Die Sektoren in jüngeren Blättern waren größer und umspannten teilweise die komplette Nervatur des Blattes.

Da sekundäre Venen nach der Mittelrippe angelegt werden, kam es in den jüngeren Blättern wahrscheinlich zu mehreren Rekombinationsereignissen. Es empfiehlt sich den Versuch ebenfalls mit einer niedrigeren Dex-Konzentration durchzuführen. Mit beiden Treibern lassen sich Sektoren in den Hydathoden erzeugen. Über dies wird der *DR5::GUS* Reporter auch stark in Hydathoden exprimiert (Garett et al., 2012). Möglicherweise spielt der kanonische Auxinsignalweg bei der Expression von *DRNL* in dieser Domäne eine Rolle. Da die Auxinantwort bei der Bildung der Vaskulatur maßgeblich von MP gesteuert wird, könnte man die Expression von *DRNL::erGFP* in den Hydathoden einer MP-Mutante untersuchen.

4.3 Genetische Ablation

In Blattartigen Geweben korrelieren die Ablationsphänotypen mit den vorher beschriebenen GUS-Sektoren. Es wurden Blätter mit eingekerbten Rändern beobachtet, bei denen es wahrscheinlich zur DT-A-abhängigen Abtötung von Zellen während der Hydathodenentwicklung gekommen ist. Diese Einkerbungen am Blatttrand entsprechen den Stellen, an denen man bei den Pflanzen der vorangegangenen Versuchen GUS-Sektoren beobachten konnte. Des Weiteren wurden Blätter mit einer doppelten Lamina beobachtet, die aussahen, als seien zwei Blätter ineinander gewachsen und deren Petiole zwei Mittelrippen aufwies. Die genetische Ablation hatte auch Störungen in der Phyllotaxis zur Folge. Infloreszenzstämmchen oder Hochblättern wurden in direkter Nachbarschaft zueinander angelegt und nicht in dem für *Arabidopsis* charakteristischen Winkel. Störungen in der Phyllotaxis, zu denen auch die Blätter mit der doppelten Lamina gehören, die entstanden sein könnten indem Blattprimordien in direkter Nähe zueinander initiiert wurden, lassen sich auch auslösen, wenn die Provaskulatur von Blattprimordien von Tomaten mit Hilfe eines Lasers ablatiert wird (Deb et al., 2014). Des Weiteren fielen Organverwachsungen auf, wie Hochblätter, die mit dem Infloreszenzstamm verwachsen waren. Einen ähnlichen Phänotyp erhält man bei Pflanzen, die eine Hyperakkumulation des Hormons Brassinosteroid in ihren Organgrenzen aufweisen, wie *lob* (Bell et al., 2012). *LOB* wird in Organgrenzen exprimiert und reguliert die Akkumulation von Brassinosteroiden negativ. RNAseq-Experimente belegen auch, dass *LOB* in *DRNL* exprimierenden Zellen um den Faktor 8 differentiell exprimiert wird (Frerichs et al., 2016). In Blüten erhält man nach Induktion und erfolgter Ablation häufig deformierte, zerknautschte aussehende Organe, die teilweise kleiner waren, als wildtypische Blütenorgane. Auch kam es vor, dass ganze Organe fehlten, oder nur Organteile, wie die z.B. Antheren. Ebenfalls konnten nur die Antheren von GUS-Sektoren oder auch ganze Stamen betroffen sein, so dass das Fehlen von Organen oder Organteilen nicht überrascht.

Deformierte und kleinere Organe könnten mit dem Fehlen von Zellen, die nicht ersetzt wurden, erklärt werden. Abgetötete Zellen, in denen der *DRNL* Promotor aktiv war, werden demnach nicht kompensiert, wie es z.B. bei manchen Initialen im Wurzelmeristem der Fall ist. Nach Laser-Ablationen der kortikalen oder epidermalen Initialen können Teilungen in tiefer liegenden Gewebe neue Zellen an die Stellen der Ablatierten liefern, die dann das Schicksal der ablatierten Initialen annehmen (Scheres et al., 1996). Zellen, in denen *DRNL* aktiv ist, sind scheinbar nicht so flexibel. Ihr Schicksal scheint festgelegt zu sein. Eine Störung in der Phyllotaxis konnte bei den Blüten ebenfalls beobachtet werden, wie Blüten, die in nächster Nähe angelegt wurden. Weiterhin hatte die Ablation zur Folge, dass die beiden Karpelle in manchen Blüten unfusioniert vorlagen. Eventuell wurden Zellen des Replums abgetötet. Es wurden auch Blüten erhalten, deren Organe Mischidentitäten aufwiesen oder keiner Identität zuzuordnen waren. Seltener erhielt man Blüten mit überzähligen Organen. Das könnte daran liegen, dass eventuell mehrere florale Organprimordien in Nachbarschaft zueinander initiiert wurden.

4.4 Fazit

Die Muster der klonalen Sektoren lassen sich mit der transkriptionellen Aktivität des *DRNL*-Promotors erklären. Sie sind in unabhängigen Linien reproduzierbar und hängen maßgeblich von dem Entwicklungszustand der Organe relativ zum Dexamethason-Applikationszeitpunkt ab. Wie man es von einem Gründerzellmarker erwarten würde, konnten Rekombinationsereignisse in unterschiedlichen Zellschichten erhalten werden (mindestens L1 und L3). Bei allen Organen konnte die Vaskulatur betroffen sein, so dass eine Rolle von *DRNL* in der Entwicklung der Provaskulatur nahe liegt und weiter erforscht werden sollte. Das Ergebnis der genetische Ablation von Zellen, in denen der *DRNL*-Promotor aktiv ist, deckt sich mit den Beobachtungen der klonalen Analysen. Des Weiteren zeigen die Ablationsversuche, dass nach dem Abtöten Zellen, in denen *DRNL* aktiv war, nicht kompensiert werden.

5. Anhang

5.1 Vektorkarten

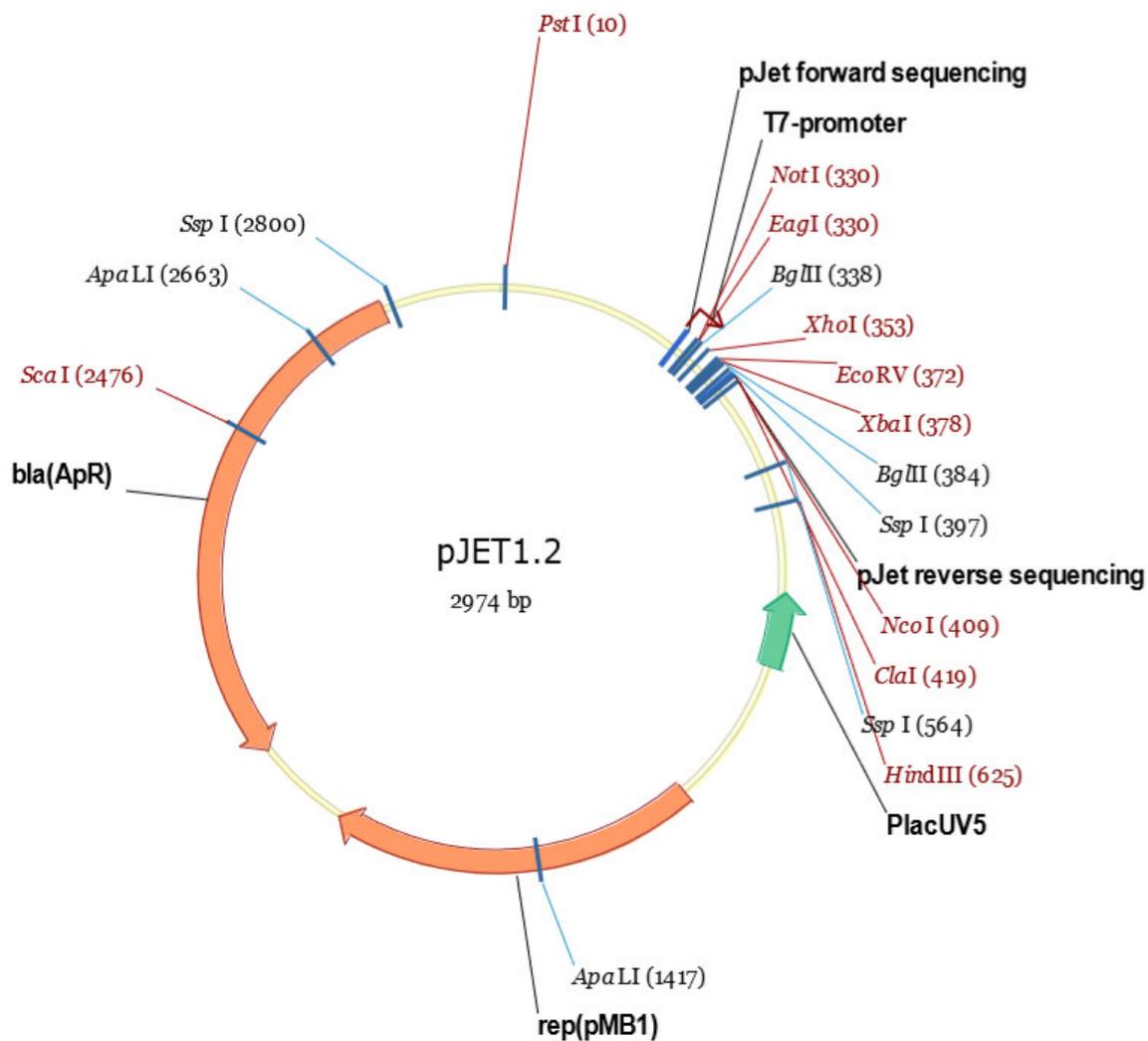


Abb. 43: pJET1.2 Vektorkarte (Thermo Scientific)

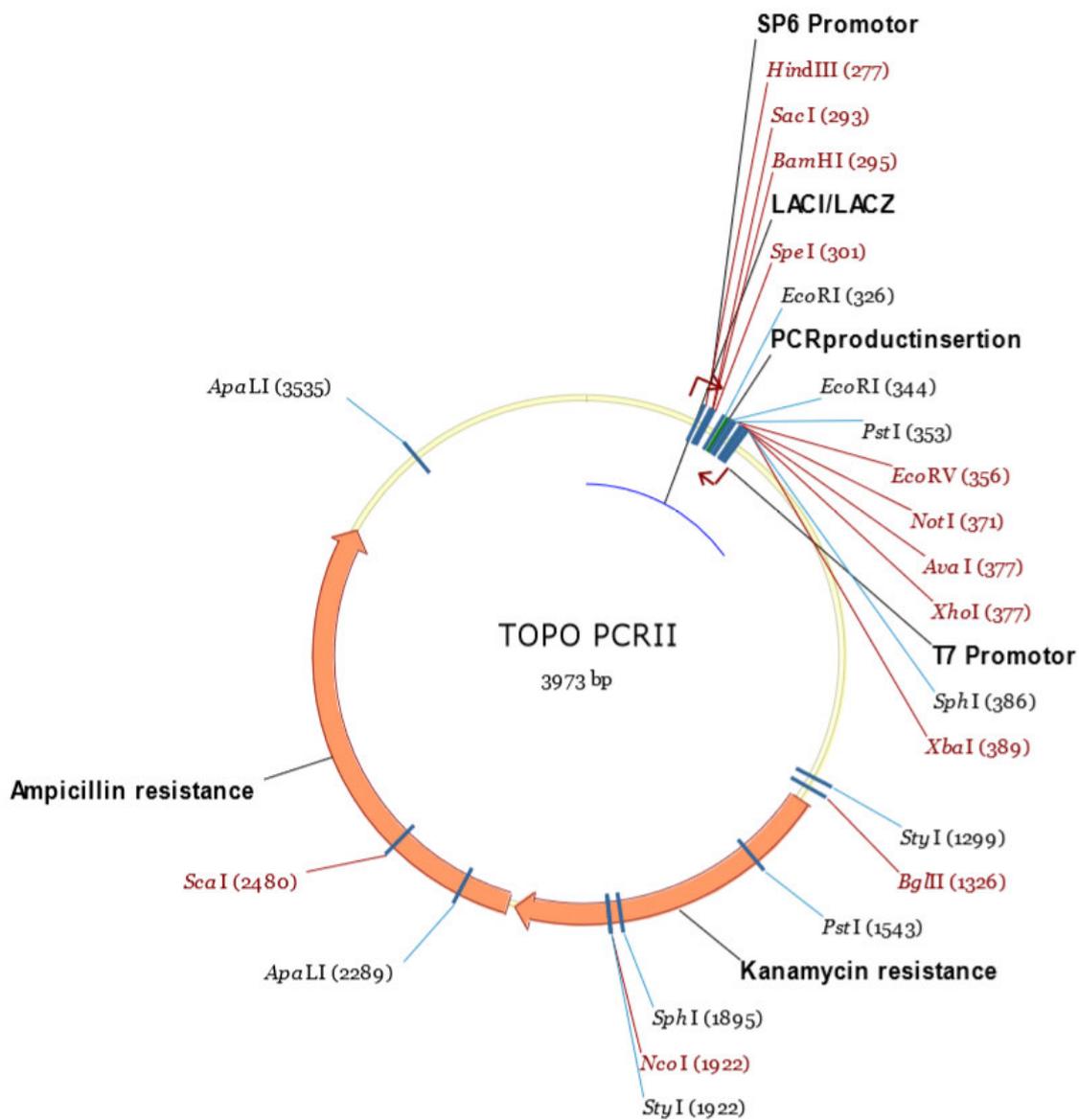


Abb. 44: pTOPO PCR II Vektorkarte (Invitrogen)

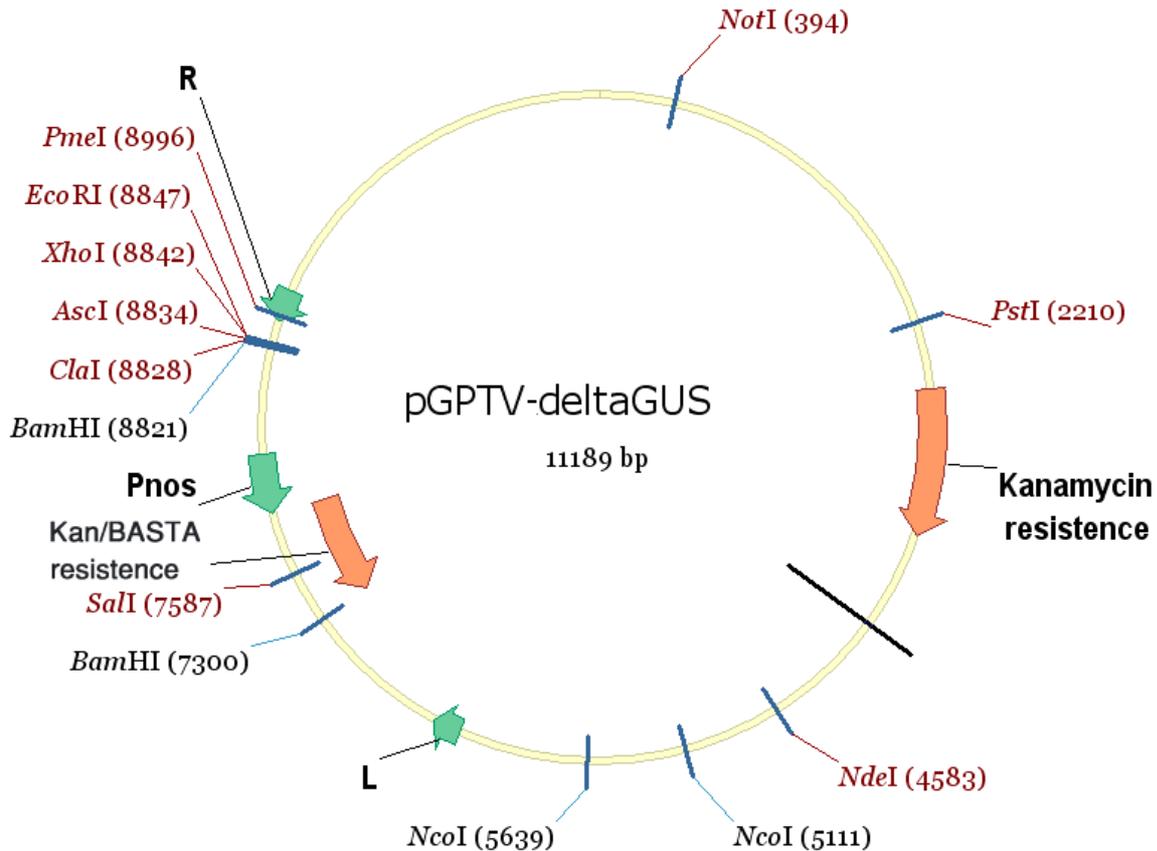


Abb. 45: pGPTV-Vektor (Überlacker & Werr)

5.2 Primerlisten

5.2.1 Promotordeletionskonstrukte

In der folgenden Tabelle sind die Primer aufgelistet, die eingesetzt wurden, um die Promotorkonstrukte herzustellen. Restriktionsenzym-Schnittstellen sind fett schwarz hervorgehoben, während halbe *FseI*-Schnittstellen fett rot markiert sind. Produkte von Primer mit halben *FseI*-Schnittstellen verbinden sich nach einer inversen PCR und Autoligation zu vollständigen *FseI*-Schnittstellen, über die DNA-Fragmente wiedereingebracht werden können. Mutationen in Primern sind rot hervorgehoben. Die Kombination der Primer für spezielle *DRNL*-Promotorkonstrukte lässt sich Tabelle 6 entnehmen.

Tab. 5

Primername	Sequenz 5' → 3'
-5568 AscI F	GGCGCGCCGAAAGACCTCACCAGAAGGG
DRNLUS XmaI R	CCCGGGTTGGACCTAAGGAAATTTTAAAGC
erGFP XmaI F	CCCGGGATGAAGACTAATCTTTTTTCTCTTTC
erGFP XmaI AscI R	CCCGGGGGCGCGCCAGCTTGCCTGCAGGTC
pPC AscI R	[phos] GGCGCGCCAAGGGCGAATTCGATATC
-4569 AscI F	[phos]TAAGATTCTTCAAAGATTA
- 4210 AscI F	[phos]GTCAAATTTGTACAGAGCATC
-3871 AscI F	[phos]GTATCGTATATGATACAAAATTG
-3132 AscI F	[phos]TAAGATCCACTAACACATGACTAC
-2323 AscI F	[phos]GACCGTTATGTTTCGGTCAAGCTC
-1913 AscI F	[phos]TCATAACTCATAAAGTTACAAATTAATTC
-1121 AscI F	[phos]TTATATTTAGGGCTCGAATATG
-323 AscI F	[phos]TTAAGATAAAAATAGTACATC
-56 AscI F	[phos]AATAAAAATGTATATTTTATTTT
Δ^{En2} F	[phos] GGCCG ACCGTTATGTTTCGGTCAAGCTC
Δ^{En2} R	[phos] GGCCG TTACACGTATAAGAAAATCATG
Δ^{En3} F	[phos] GGCC TTAAGATAAAAATAGTACATC
Δ^{En3} R	[phos] GGCCG TTGAATGCAAAAAAAAAAAAAATCC GTC
Δ^Q F	GGCCAATGAATTAGTAACTTAA
Δ^Q R	AAGAATTCTAGAGCAAGACAAGTG
En1AuxREmut F	CTCAGATGTGATAG CCA ACCACGTCACG
En1AuxREmut R	ATGGACTTTATGGGATTG
En1G-BoxMut F	GACAACCACGT CCCGGG GATCTTTTGTTCG
En1G-BoxMut R	TATCACATCTGAGTTTGAT
En2AuxREmut1,2 F	[phos]CGTTTAGAAGAGAGGG CCA ATTCTGGTA TCAACTTTAAT TGGC GTACCATTGC
En2AuxREmut1,2 R	[phos]CGTGGGTTTTTTCTCTGCACAATGC
En2AuxREmut1 F	[phos]CGTTTAGAAGAGAGGG CCA ATTCTGGTA TCAACTTTAATGTCGTACCATTGC

En2AuxREmut2 F	[phos]CGTTTAGAAGAGAGGGCGACAATTCTGGTA TCAACTTTAAT TGGC GTACCATTGC
En3AuxREmut 1 F	[phos]GAGCCCTAGTTGA GCCA AATCCACGTGAC
En3AuxREmut 1 R	[phos]TTTCTTCATGGTGTAGCCTCTTTAGGGC
En3AuxREmut 2 F	[phos]GAATGGAGCTTTACAG GCCA TTAATTGATCA AG
En3AuxREmut 2 R	[phos]ATATTCGAGCCCTAAATATAAGGGCCGGC C
En1 F	GGCGCGCCGTCAAATTTGTACAGAGCATC
En1 R	ACGCGTGAAACACAAATATCGAATGTTTA
En2 F	GGCCGGCCAGCGATCGATATCAC
En2 R	GGCCGGCCTATTTTAATATTTTG
En2 ^{core} F	GGCCGGCCAAAACCCACGCGTT TAG
En2 ^{core} R	GGCCGGCCAAAATGAAGGGGCAAAGC
En2D F	GGCCGGCCAAAACCCACGCGTTTAGAAG
En2D R	GGCCGGCCTTAAAGTTGATACCAGAATTG
En2E F	GGCCGGCCGCGACAATTCTGGTATCAAC
En2E R	GGCCGGCCGTAGGTTACATGCAATGGTACG
En2F F	GGCCGGCCTGTCGTACCATTGCATGTAACC
En2F R	GGCCGGCCAAAATGAAGGGGCAAAGCTAC
En3A F	GGCCGGCCAATTAGTGGTGGAGATTG
En3A R	GGCCGGCCTTTTTTAATCTGTAAACCAAAG
En3B F	GGCCGGCCGCAAACCCCTAAATAAG
En3B R	GGCGGCCAAATTATGATGTTGGAGTTG
En3ABC F	GGCCGGCCAATTAGTGGTGGAGATTG
En3ABC R	GGCCGGCCAATAATAATGAATTACAG

Tab. 6

Konstruktnamen	F-Primer	R-Primer
DRNLUS	-5568 AscI-F	DRNLUS XmaI-R
+ erGFP	erGFP XmaI F	erGFP XmaI AscI R
Δ^{EX1}	-4569 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX2}	- 4210 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX3}	-3871 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX4}	-3132 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX5}	-2323 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX6}	-1913 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX7}	-1121 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX8}	-323 AscI F	pPC AscI R
Δ^{EX9}	-56 AscI F	pPC AscI R
L/S Δ^{En2}	Δ^{En2} F	Δ^{En2} R
L Δ^Q	Δ^Q F	Δ^Q R
L/S Δ^{En3}	Δ^{En3} F	Δ^{En3} R
L/S Δ^{En2} +En2core	En2 ^{core} F	En2 ^{core} R
+En2D	En2D F	En2D R
+En2E	En2E F	En2E R
+En2F	En2F F	En2F R
L/S Δ^{En3} +En3ABC	En3A F	En3C R
+En3A	En3A F	En3A R
+En3B	En3B F	En3B R
+En3C	En3C F	En3C R
L/SEn2 AuxREmut1,2	En2 AuxREmut1,2 F	En2 AuxREmut1,2 R
SEn2 AuxREmut1	En2 AuxREmut1 F	En2 AuxREmut1,2 R
SEn2 AuxREmut2	En2 AuxREmut2 F	En2 AuxREmut1,2 R
En3 AuxREmut	En3AuxREmut 1 F	En3AuxREmut 1 R
	En3AuxREmut 2 F	En3AuxREmut 2 R
En123 (Δ^{EX6} +En2+En1)	-1913 AscI F	pPC AscI R
	En1 F	En1 R
	En2 F	En 2 R

5.2.1 Konstrukte für klonale Analysen und genetische Ablationen

In der folgenden Tabelle sind Primer aufgeführt, mit deren Hilfe die Treiberkonstrukte *DRNLpOpCre* und *DR5pOpCre*, sowie das Ablationskonstrukt *DRNLpOpDTA* hergestellt wurden. Tabelle 8 lassen sich alle Zwischenschritte der Klonierung entnehmen.

Tab. 7

Primername	Sequenz 5' → 3'
NdeI_Cre_F	CATATGTCCAATTTACTGACC
Cre_TAG_R	CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG
OCS_NotI-R	GCGGCCGCTCCTGCTGAGCCTCGACATGTTG
XbaI_DTA_R	TCTAGATCGCCTGACACGATTTCTG
NotI_AscI_pop_F	GCGGCCGCGGCGCGCCCACCGGTGGTTTAAAC
AscI_DRNLUS_F	GGCGCGCCAGAAGGGTTAAGTTGCTACT
AscI_DR5_F	GGCGCGCCGGTATCGCAGCCCCCTTTTG
XbaI_DR5_R	TCTAGAGCTAAGCTTACCATTGTAAT
DTA_ATG_F	ATGTTGTTGATTCTTCTAAATC
StuI_LhG4_F	AGGCCTATGGCTAGTGAAGCTCGAAAAAC
NotI_PAS_R	GCGGCCGCTAGAAGTATTTTACAAATAC

Die Klonierung der Treiber- und des Deletionskonstrukts vollzog sich in mehreren Zwischenschritten, die in Tabelle 8 zusammengefasst sind. In der linken Spalte findet sich der Name des Zwischenkonstrukts. In der zweiten und dritten Spalte sind jeweils die Namen der Primerpaare und des PCR-Templates aufgeführt, welche in den Rezipientenvektor (vierte Spalte) nach erfolgtem Restriktionsverdau (fünfte Spalte) eingebracht wurden.

Tab. 8

Zwischenkonstrukt	Primerpaar	PCR-Template	Rezipient	Restr.
GR-LhG4-PAS	StuI_LhG4_F NotI_PAS_R	pMCEffector (Cole)	pTOPO (Invitrogen)	-
pop::Cre-OCS	NdeI_Cre_F Cre_TAG_R	pCRE-GR ^{DEX} (Chambon)	pJET+pop::OC S (Cole)	<i>SmaI</i>

GR-LhG4- PAS+pop:: Cre-OCS	OCS_NotI-R NotI_AscI_pop _F	pJET+pop:: Cre-OCS (Glowa)	GR-LhG4-PAS (Glowa)	<i>NotI</i>
DRNLUS+GR- LhG4- PAS+pop:: Cre-OCS	AscI_DRNLUS _F DRNLUS_R	pGPTV+DRNLUS:: erG FP (Comelli)	GR-LhG4- PAS+pop:: Cre-OCS (Glowa)	<i>StuI</i>
GR-LhG4- PAS+pop:: DTA-OCS	OCS_NotI-R NotI_AscI_pop _F	pJET+pop:: DTA-OCS (Glowa)	GR-LhG4-PAS (Glowa)	<i>NotI</i>
pop:: DTA-OCS	DTA_ATG_F XbaI_DTA_R	pEN-L1-DTA-L2 (Novack)	pJET+pop:: OC S (Cole)	<i>SmaI</i>
DRNLUS+GR- LhG4- PAS+pop:: DTA-OCS	AscI_DRNLUS _F DRNLUS_R	pGPTV+DRNLUS:: erG FP (Comelli)	GR-LhG4- PAS+pop:: DTA-OCS (Glowa)	<i>StuI</i>

In Tabelle 9 sind die Primer zusammengefasst, die bei der Herstellung des Reporters RepEX verwendet wurden. Tabelle 10 lassen sich alle Zwischenschritte der Klonierung entnehmen.

Tab. 9

Primername	Sequenz 5' → 3'
loxN_GFP_NotI_F	GCGGCCGCATAACTTCGTATAGTATACCTTATAC GAAGTTATGTACCATGAAGACTAATCTTTTTC
GFP_NcoI_R	CCATGGAACAGGTAGTTTTCC
XbaI_uidA_F	TCTAGATGTTACGTCCTGTAGAAACC
XbaI_uidA_R	TCTAGATCATTGTTTGCCTCCCTGCT
BamHI_nos_F	GGATCCTCGAGTAGCGATCGTTCAAAC
BamHI_loxN_R	GGATCCATAACTTCGTATAAAGGTATAC
uidA_ATG_F	ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCC
D_A_R	ATAACTTCGTATAAAGGTATAC

Die Klonierung des Reporterkonstrukts vollzog sich in mehreren Zwischenschritten, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind. In der linken Spalte findet sich der Name der Zwischenkonstrukte. In der zweiten und dritten Spalte sind jeweils die Namen der Primerpaare und des PCR-Templates aufgeführt, welche in das backbone (vierte Spalte) nach erfolgtem Verdau (fünfte Spalte) eingebracht wurden.

Tab. 10

Zwischenkonstrukt	Primerpaar	PCR-Template	Rezipient	Restr.
35S::erGFP+uidA-PAS	XbaI_uidA_F XbaI_uidA_R	pGPTV+uidA (Werr & Überlacker)	pRT- 35S□::erGFP- PAS (Cole)	<i>XbaI</i>
35S::erGFP-NOS-loxN-uidA-PAS	BamHI_NOS_F BamHI_loxN_R	pBOB (Wachsman)	35S::erGFP+uidA- PAS	<i>BamHI</i>
35S::loxN-erGFP-NOS-loxN-uidA-PAS	loxN_GFP_NotI_F GFP_NcoI_R	pRT- 35SW::erGFP- PAS (Cole)	35S::erGFP-NOS- loxN-uidA-PAS	<i>NotI</i> <i>NcoI</i>

5.3 Sonstige Primer

Folgendes Primerpaar wurde verwendet, um mit Hilfe einer PCR Rekombinationen im Reporter *RepEX* nachzuweisen.

Tab. 11

Primernamen	Sequenz 5' → 3'
35S F	TTACAGTCGACCCATAACTTCG
uidA rev	TCAATTCCACAGTTTTTCGCG

5.3 JASPAR-Datenbankanalyse

In der folgenden Tabelle ist das Ergebnis der JASPAR-Datenbankanalyse für die En2^{core}-Sequenz zusammengefasst. Die Ergebnisse für die anderen *Enhancer* und *Q* befinden sich auf dem Datenträger.

193 putative sites were predicted with these settings (80%) in sequence named En2core							
Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0982.1	DOF2.4	4.327	0.838586671700039	1	7	1	aaaaacc
MA0984.1	DOF5.7	4.017	0.83130013093233	1	8	1	aaaaacc
MA0550.1	BZR1	7.052	0.826983082165407	4	17	1	aaccacgcgtt a
MA0964.1	BIM1	6.937	0.877986851085612	5	14	-1	acgcgtgggt
MA0549.1	BZR2	6.320	0.817359361807914	5	15	-1	aacgcgtgggt
MA0560.1	PIF3	6.620	0.829283404384633	5	14	1	accacgcgt
MA0956.1	BEE2	5.206	0.844012832979977	6	15	-1	aacgcgtggg
MA0956.1	BEE2	5.206	0.844012832979977	6	15	1	cccacgcgtt
MA0965.1	BIM2	4.797	0.825267581961269	6	15	-1	aacgcgtggg
MA0965.1	BIM2	4.797	0.825267581961269	6	15	1	cccacgcgtt
MA0966.1	BIM3	4.702	0.810282253303299	6	15	-1	aacgcgtggg
MA0966.1	BIM3	4.702	0.810282253303299	6	15	1	cccacgcgtt
MA0968.1	bZIP68	6.209	0.866627016503258	6	14	-1	acgcgtggg
MA0969.1	CMTA2	7.482	0.90019675906171	6	14	1	cccacgcgt
MA0970.1	CMTA3	8.764	0.950922362349544	6	14	-1	acgcgtggg
MA0557.1	FHY3	10.276	0.876711876167322	6	17	1	cccacgcgtta
MA0988.1	PHYPADRAFT_143875	4.958	0.819724356109138	6	15	-1	aacgcgtggg
MA0988.1	PHYPADRAFT_143875	4.958	0.819724356109138	6	15	1	cccacgcgtt
MA1011.1	PHYPADRAFT_72483	6.556	0.876402723212984	6	15	-1	aacgcgtggg
MA1011.1	PHYPADRAFT_72483	6.556	0.876402723212984	6	15	1	cccacgcgtt
MA0561.1	PIF4	5.961	0.837057917247439	6	13	-1	cgcggtggg
MA1061.1	SPT	7.047	0.860817975618176	6	14	1	cccacgcgt
MA0962.1	BHLH34	9.786	0.924214609271621	7	14	-1	acgcgtgg

MA0969.1	CMTA2	3.821	0.800416976898929	7	15	-1	aacgcgtgg
MA0128.1	EmBP-1	8.374	0.863294513527227	7	14	-1	acgcgtgg
MA0568.1	MYC3	6.194	0.84329899654316	7	14	-1	acgcgtgg
MA0568.1	MYC3	6.194	0.84329899654316	7	14	1	ccacgcgt
MA1033.1	OJ1058_F05.8	7.544	0.870497874744488	7	14	-1	acgcgtgg
MA1033.1	OJ1058_F05.8	6.568	0.851102355523877	7	14	1	ccacgcgt
MA1021.1	PHYPADRAFT_48267	4.967	0.803390193081978	7	14	1	ccacgcgt
MA1061.1	SPT	5.158	0.816632802477147	7	15	-1	aacgcgtgg
MA1074.1	UNE10	4.918	0.812039163349691	7	14	1	ccacgcgt
MA0973.1	CDF2	4.857	0.802526437219908	9	18	-1	ctaaacgcgt
MA0974.1	CDF3	4.702	0.802669866945778	9	17	-1	taaacgcgt
MA0969.1	CMTA2	9.937	0.96710726581113	9	17	-1	taaacgcgt
MA0970.1	CMTA3	8.904	0.954632822579071	9	17	1	acgcgttta
MA0981.1	DOF1.8	5.626	0.885333722224106	9	18	-1	ctaaacgcgt
MA0987.1	PHYPADRAFT_140773	5.641	0.889252958115081	9	18	-1	ctaaacgcgt
MA1022.1	PHYPADRAFT_38837	5.990	0.882318892535187	9	18	-1	ctaaacgcgt
MA0021.1	Dof3	4.362	0.818348034268571	10	15	-1	aacgcg
MA0984.1	DOF5.7	3.861	0.826650040628691	10	17	-1	taaacgcg
MA0989.1	PHYPADRAFT_153324	5.932	0.887998078604638	10	18	-1	ctaaacgcg
MA0982.1	DOF2.4	5.417	0.884272514545368	11	17	-1	taaacgc
MA0983.1	DOF5.6	6.566	0.918114050450435	11	18	-1	ctaaacgc
MA1071.1	DOF5.3	5.953	0.936588574175074	12	18	-1	ctaaacg
MA0984.1	DOF5.7	5.156	0.865251751803129	17	24	1	agaagaga
MA0984.1	DOF5.7	3.905	0.827961604560486	19	26	1	aagagagg
MA0120.1	id1	6.136	0.816151173342077	20	31	-1	tgctgcctctct
MA0999.1	ERF098	5.370	0.837869362581413	23	30	1	gaggcgac
MA1051.1	RAP2-3	6.371	0.841266968479399	23	30	1	gaggcgac
MA1009.1	ARF3	4.832	0.800626789273305	24	31	-1	tgctgcct
MA1004.1	ERF13	4.424	0.808453303691586	24	31	1	aggcgaca
MA0993.1	ERF7	5.375	0.812369008534628	24	33	1	aggcgacaat

MA0942.1	ARF1	4.980	0.820599974002736	25	32	1	ggcgacaa
MA0943.1	ARF5	7.574	0.877120453885296	25	32	1	ggcgacaa
MA0944.1	ARF8	9.390	0.938539905399994	25	33	-1	attgtcgcc
MA0082.1	squamosa	7.746	0.815459900095936	29	42	1	acaattctggtatc
MA0952.1	ATHB-51	5.223	0.823109449847963	30	37	-1	cagaattg
MA0945.1	ARR1	4.692	0.810223749957339	35	44	1	ctggtatcaa
MA1016.1	GATA15	3.737	0.80627038421284	37	45	-1	gttgatacc
MA1079.1	WRKY21	4.620	0.802204077611676	37	46	1	ggtatcaact
MA1039.1	MYB4	5.091	0.829034718991856	39	46	-1	agttgata
MA0973.1	CDF2	7.258	0.864303751192835	42	51	-1	attaaagttg
MA0974.1	CDF3	7.401	0.87554697721206	42	50	-1	ttaaagttg
MA0981.1	DOF1.8	7.579	0.965816734911052	42	51	-1	attaaagttg
MA0984.1	DOF5.7	3.223	0.807632363617655	42	49	-1	taaagttg
MA0987.1	PHYPADRAFT_140773	7.541	0.963725098096249	42	51	-1	attaaagttg
MA1022.1	PHYPADRAFT_38837	7.178	0.929613769942266	42	51	-1	attaaagttg
MA0020.1	Dof2	6.086	0.8684839414205	43	48	-1	aaagtt
MA0977.1	DOF2.5	6.338	0.860182916321196	43	50	-1	ttaaagtt
MA0021.1	Dof3	5.203	0.854104763272442	43	48	-1	aaagtt
MA0984.1	DOF5.7	4.676	0.850943781638086	43	50	-1	ttaaagtt
MA0989.1	PHYPADRAFT_153324	7.667	0.95037766022307	43	51	-1	attaaagtt
MA0932.1	AHL12	3.028	0.801430508736184	44	51	-1	attaaagt
MA0932.1	AHL12	3.028	0.801430508736184	44	51	1	actttaat
MA0933.1	AHL20	5.368	0.8314284546708	44	51	1	actttaat
MA0934.1	AHL25	4.361	0.821845152407679	44	51	-1	attaaagt
MA0934.1	AHL25	4.361	0.821845152407679	44	51	1	actttaat
MA0982.1	DOF2.4	7.121	0.955693318406324	44	50	-1	ttaaagt
MA0983.1	DOF5.6	7.964	0.969486100129503	44	51	-1	attaaagt
MA0990.1	EDT1	7.963	0.867278345379576	44	53	-1	acattaaagt
MA0990.1	EDT1	10.260	0.92044196532272	44	53	1	actttaatgt
MA0053.1	MNB1A	6.786	0.932000291645603	44	48	-1	aaagt

MA0064.1	PBF	7.325	0.960521224715863	44	48	-1	aaagt
MA0933.1	AHL20	4.399	0.809836868324901	45	52	-1	cattaaag
MA1071.1	DOF5.3	6.578	0.964196174207793	45	51	-1	attaaag
MA0981.1	DOF1.8	4.095	0.822241304188411	46	55	1	ttaaatgctg
MA1071.1	DOF5.3	3.066	0.809063548103943	46	52	1	ttaaatg
MA0983.1	DOF5.6	3.530	0.806550715095894	46	53	1	ttaaatgt
MA0987.1	PHYPADRAFT_140773	3.477	0.804433110262846	46	55	1	ttaaatgctg
MA0989.1	PHYPADRAFT_153324	4.481	0.835829333400981	46	54	1	ttaaatgctg
MA0982.1	DOF2.4	4.116	0.829742898451998	47	53	1	ttaaatgt
MA0582.1	RAV1	7.668	0.836255647496205	47	58	-1	gtacgacattaa
MA0944.1	ARF8	7.408	0.885333168802262	49	57	1	aatgctgta
MA0577.1	SPL3	9.090	0.865733769535745	49	64	1	aatgctgtaccatt gc
MA0578.1	SPL8	8.271	0.846184071618351	49	64	1	aatgctgtaccatt gc
MA1068.1	TGA2	4.465	0.806988041298346	49	56	-1	acgacatt
MA1070.1	TGA7	5.083	0.809232601902833	49	58	1	aatgctgtac
MA0096.1	bZIP910	7.070	0.851897543410036	50	56	1	atgctgt
MA0935.1	NAC025	3.612	0.809870332944823	50	57	-1	tacgacat
MA1047.1	TGA5	5.788	0.850947118065893	50	57	1	atgctgta
MA1009.1	ARF3	5.731	0.820186719942107	51	58	1	gtcgtac
MA0938.1	NAC058	5.581	0.814328242782133	51	58	-1	gtacgaca
MA0553.1	SMZ	10.928	0.926211386887183	51	58	1	gtcgtac
MA1058.1	SPL4	7.724	0.940603985847353	51	59	-1	ggtacgaca
MA0129.1	TGA1A	7.617	0.889719063676902	51	57	-1	tacgaca
MA1057.1	SPL12	8.670	0.937343848243449	52	59	-1	ggtacgac
MA1059.1	SPL5	8.928	0.931256992495835	52	60	-1	tggtacgac
MA1060.1	SPL7	9.343	0.913726254100443	52	59	-1	ggtacgac
MA0955.1	POPTR_0002s00440g	8.771	0.942862636771237	53	59	-1	ggtacga
MA1059.1	SPL5	5.158	0.814074324845547	53	61	1	tcgtaccat
MA0955.1	POPTR_0002s00440g	5.188	0.831934523239991	54	60	1	cgtacca
MA1057.1	SPL12	5.572	0.838885912540377	54	61	1	cgtaccat

MA1058.1	SPL4	6.354	0.888894300996214	54	62	1	cgtaccatt
MA1060.1	SPL7	7.700	0.865305665585059	54	61	1	cgtaccat
MA0953.1	ATHB-6	4.451	0.800219749062958	56	64	-1	gcaatggta
MA0581.1	LEC2	10.259	0.90610690500851	59	69	-1	tacatgcaatg
MA1043.1	NAC083	4.913	0.806831289088847	59	68	-1	acatgcaatg
MA1044.1	NAC92	7.781	0.87203538784636	59	70	-1	ttacatgcaatg
MA0935.1	NAC025	3.542	0.808480424456586	60	67	-1	catgcaat
MA0564.1	ABI3	8.422	0.839002584774828	61	69	1	ttgcatgta
MA0937.1	NAC055	5.842	0.817136899000397	61	68	-1	acatgcaa
MA0938.1	NAC058	6.892	0.856179683126185	61	68	-1	acatgcaa
MA0939.1	NAC080	7.211	0.871053223680977	61	68	-1	acatgcaa
MA1044.1	NAC92	6.220	0.834164635961218	61	72	1	ttgcatgtaacc
MA0936.1	T11118.17	5.974	0.825436017195073	61	68	-1	acatgcaa
MA0564.1	ABI3	8.696	0.847096015577036	62	70	-1	ttacatgca
MA0956.1	BEE2	5.139	0.842184638648391	62	71	-1	gttacatgca
MA0956.1	BEE2	5.139	0.842184638648391	62	71	1	tgcgatgtaac
MA0965.1	BIM2	4.706	0.823222272537011	62	71	-1	gttacatgca
MA0965.1	BIM2	4.706	0.823222272537011	62	71	1	tgcgatgtaac
MA0966.1	BIM3	4.941	0.815865460247399	62	71	-1	gttacatgca
MA0966.1	BIM3	4.941	0.815865460247399	62	71	1	tgcgatgtaac
MA1011.1	PHYPADRAFT_72483	4.559	0.826500471728013	62	71	-1	gttacatgca
MA1011.1	PHYPADRAFT_72483	4.559	0.826500471728013	62	71	1	tgcgatgtaac
MA1027.1	KAN1	5.318	0.834649366899988	63	70	-1	ttacatgc
MA0562.1	PIF5	5.798	0.831894695546547	63	70	-1	ttacatgc
MA0935.1	NAC025	5.744	0.852202974329396	64	71	1	catgtaac
MA0034.1	Gam1	5.782	0.807784749622486	66	75	1	tgtaacctac
MA1038.1	MYB3	7.910	0.846722464836625	67	77	-1	aagtaggttac
MA0054.1	myb.Ph3	6.320	0.826380452381992	68	76	1	taacctact
MA1030.1	P0510F09.23	9.205	0.947553287102968	68	77	1	taacctactt
MA1073.1	TRB2	7.988	0.911544246083716	68	75	1	taacctac

MA1036.1	MYB111	8.499	0.898890459521282	69	76	-1	agtaggtt
MA1039.1	MYB4	8.519	0.906520398297336	69	76	-1	agtaggtt
MA1040.1	MYB46	5.922	0.843345356219282	69	76	-1	agtaggtt
MA1042.1	MYB59	8.080	0.881083733890651	69	76	-1	agtaggtt
MA1037.1	MYB24	8.595	0.933147716301917	70	78	-1	aaagtaggt
MA1041.1	MYB55	6.538	0.841570664440116	70	77	1	acctactt
MA0563.1	SEP3	6.352	0.808486619224078	71	81	1	cctacttctgt
MA0973.1	CDF2	4.891	0.803401251328646	72	81	-1	acgaaagtag
MA0974.1	CDF3	5.225	0.816791663414568	72	80	-1	cgaaagtag
MA0981.1	DOF1.8	5.995	0.900540190058967	72	81	-1	acgaaagtag
MA0987.1	PHYPADRAFT_140773	6.665	0.929389521978616	72	81	-1	acgaaagtag
MA1022.1	PHYPADRAFT_38837	5.690	0.870375741674813	72	81	-1	acgaaagtag
MA0020.1	Dof2	6.493	0.888500586707769	73	78	-1	aaagta
MA0021.1	Dof3	7.843	0.966349429824425	73	78	-1	aaagta
MA0989.1	PHYPADRAFT_153324	6.202	0.897705563928544	73	81	-1	acgaaagta
MA0982.1	DOF2.4	5.372	0.88238640176735	74	80	-1	cgaaagt
MA0983.1	DOF5.6	5.763	0.888606356679126	74	81	-1	acgaaagt
MA0053.1	MNB1A	6.786	0.932000291645603	74	78	-1	aaagt
MA0064.1	PBF	7.325	0.960521224715863	74	78	-1	aaagt
MA1071.1	DOF5.3	5.314	0.908362563901623	75	81	-1	acgaaag
MA0935.1	NAC025	3.408	0.805819742493391	75	82	-1	tacgaaag
MA0938.1	NAC058	5.496	0.811614762668293	76	83	-1	ctacgaaa
MA1058.1	SPL4	4.345	0.813066011313047	76	84	-1	gctacgaaa
MA0936.1	T11118.17	6.719	0.85054704917253	76	83	-1	ctacgaaa
MA1057.1	SPL12	4.997	0.820611763725249	77	84	-1	gctacgaa
MA0121.1	ARR10	4.729	0.802916694721925	78	85	-1	agctacga
MA0947.1	ARR14	4.234	0.811085432158548	78	85	-1	agctacga
MA0949.1	ARR2	5.497	0.821811209109349	78	87	1	tcgtagcttt
MA0946.1	ARR11	7.488	0.860237322269967	79	86	-1	aagctacg
MA0981.1	DOF1.8	5.511	0.880594579131941	81	90	-1	ggcaaagcta

MA0987.1	PHYPADRAFT_140773	6.041	0.904931303374275	81	90	-1	ggcaaagcta
MA1022.1	PHYPADRAFT_38837	5.442	0.860502736963571	81	90	-1	ggcaaagcta
MA0121.1	ARR10	5.442	0.829678986753436	82	89	1	agctttgc
MA0020.1	Dof2	8.354	0.980026328426709	82	87	-1	aaagct
MA0021.1	Dof3	5.488	0.866222085229758	82	87	-1	aaagct
MA0989.1	PHYPADRAFT_153324	5.448	0.870596512320303	82	90	-1	ggcaaagct
MA0982.1	DOF2.4	4.739	0.855855082023227	83	89	-1	gcaaagc
MA0983.1	DOF5.6	5.237	0.869277531120335	83	90	-1	ggcaaagc
MA0045.1	HMG-I/Y	8.393	0.819588960074432	83	98	-1	Aatgaaggggc aaagc
MA0053.1	MNB1A	8.115	1.00001932447411	83	87	-1	aaagc
MA0064.1	PBF	8.062	0.999992556389593	83	87	-1	aaagc
MA1071.1	DOF5.3	5.312	0.908274219581519	84	90	-1	ggcaaag
MA1080.1	WRKY23	4.169	0.807151736433861	84	91	-1	gggcaaag
MA1087.1	WRKY45	4.869	0.805936187541872	84	91	1	ctttgccc
MA1078.1	WRKY2	4.046	0.81137228055271	85	92	-1	ggggcaaa
MA1093.1	WRKY75	3.019	0.806854612728813	85	92	-1	ggggcaaa
MA0984.1	DOF5.7	4.290	0.839437788963698	88	95	-1	gaaggggc
MA0984.1	DOF5.7	5.347	0.870945131597969	89	96	-1	tgaagggg
MA0982.1	DOF2.4	4.137	0.830623084415073	94	100	-1	AAAatga
MA0021.1	Dof3	4.076	0.806188195392106	95	100	-1	AAAatg

Comment: This type of analysis has a high sensitivity but abysmal selectivity. In other words: while true functional will be detected in most cases, most predictions will correspond to sites bound in vitro but with no function in vivo. A number of additional constraints of the analysis can improve the prediction; phylogenetic footprinting is the most common. We recommend using the [ConSite](#) service, which uses the JASPAR datasets. The review [Nat Rev Genet. 2004 Apr;5\(4\):276-87](#) gives a comprehensive overview of transcription binding site prediction

Auf folgendem Datenträger befinden sich alle weiteren Ergebnisse der JASPAR-Datenbankanalyse. Das Dokument liegt im .pdf Format vor.

5.4 Bilateraler Vergleich der *DRNL*-Promotoren von *A. thaliana* und *A. arabicum*

a) *En1*

Sowohl *A. thaliana*, als auch *A. arabicum* besitzen die G-Box im *En1*. Das AuxRE ist nur bei *A. thaliana* vorhanden.

```

ACAGA GCATCAAATCAAAGTAAGAAAATGTCTGATGACTTCAGAAATTCA
AGAAA CCATCAAATCAAACFAACAAATAT--CTAATCCGCTCAGTTAGTGG

GATCAATCCCACGCTCATGAGTGGAGCCCATAAAGTCCATCAAACTCAGA--
GACCCATAA-ACGACTATATAATATATATATATAITGATATAATTCACAAAT

-----TGTGATA AuxRE GAC-AACCACGT CACGTGGA TCTTTTGT - TTCGTT-
TACAATGACTTTGATTGATTAAACGGCCACGTGAGCTTTTGTATTGGATA

----C TTTCCCATGTAGAAAATCGTAGCCGTT CGATTACGGTCAAACATAC
TCCCTTTTCCAAATGTAGTAAATCGCAGCCGTTGGTTTACGGTCAAACATAC

GATTTTAGATTTCACGGCGGGTCTATCAATTTCCA TCTTTGCTCGAGAGGA
GATA TTTGATACGGCGGGGTCATATCA GTTTCCTTCTTTGGT-GACCCAA

TTTGCTTTAGACGGAAAATTAAACATTGATATT-TGTGTTCCG A.thaliana
TCT-CT---GACCCGAGATTTCACTGGA CCGATACTATA TTTTA A.arabicum

```

Abbx.: Bilateraler Vergleich der *En1* Sequenzen von *A. thaliana* mit *A. arabicum* mit dem Programm VectorNTI.

b) *Q*

Beide Spezies besitzen AuxREs im Element *Q*.

```

AATGACGACAAAAAGAAATTCCAAATGTGTGTATATCATCTAGATAT
AATGACGACAAAAATTAAATTTCAAATGTGTGAGTGTG-TATAGAT--

AAAGCTATTAA TAAGGTAGCTTTATAAACATAGGGGACAAAGTTGTTTCAGA
-----TAGATGTAAGATAGCTTTATAAACATAGGGGACAAATTTGTTTCAGA

AGAGGTGTGAGGTAACTCTCAGTTCAACAGTT--ATT TTTTAAATGGCTT
AGAGACCTGATCAACTCTCAGTTCAACAGTTTTATTATTTTATTTTAT

GCAT----AGTTATTTGTAGTACAACCGGCAACGGTTATCTCCAAAATAA
TTATTTTCAGTTATTTAAAGTACAACAGACAACGGTCTTTATAACATTAA

-ATCAAATAATGGTAA T A.thaliana
TAACAAATAT AACAA G A.arabicum

```

Abbx.: Bilateraler Vergleich der *Q*-Sequenzen von *A. thaliana* mit *A. arabicum* mit dem Programm VectorNTI.

c) *En2*

Nur das proximale AuxRE ist innerhalb beider Spezies konserviert.

```

ACATGATGGCCGTTCGTGTGGAAA AAA GTCA AACATAA TATATTGTTT
AAGTAATTTACACACGTGTGTAA --- GTGT AACATAA CCGCC-GCTC

ATATTGCAATTGATAGAGAG-AGAGAGAGA-----GAG---ACGCATTG
GTGTGAGCAGAGAGAGAAAGTAGAGAGAGAATTCTTGAATTAATGAGTTA

TG CAGAGAAA AAACCACGCGTTTGA-AGAGAGG-OGACAAATTCTGTA
GACAGAGAAA GAAGGCACGCGTTGAGGGAGAGAGGAOGACAAAACTGAGA

TCAACTTTAATGT-CGTACCATTGCATGTAACTTAC-TTTCGTAGCTTTG
TTAACTTTAATGTTTCGTACCATTGCATGTATCTTACCCTATCCTCTCCAT

CCCTTCATTTTGCC A.thaliana
CTCCT--ATCTTTGCC A.arabicum

```

Abbx.: Bilateraler Vergleich der *En2* Sequenzen von *A. thaliana* und *A. arabicum* mit dem Programm VectorNTI.

d) *En3*

Beide AuxREs, die G-Box und die GCC-Box sind innerhalb der beiden Spezies konserviert.

Die GCC-Box aus *A. aethionema* weist jedoch Einschübe zusätzlicher Nukleotide auf.

```

AATTAGTGGTGGAGATTGATTTCCGTAAA--CGCAAAGGTCATTAGTGC
ATTAAGTGGTGGAGATAAATGTCATAAAGAAGAGAGTGTCACTAGTC

ACAATCGAGCTACAGTA-GG--A---AAGCCCT-----AAGA----
AGAGTCGAGAAACAGTGTCTAAA AAAAAGCTCTTTTAAGA GAGAGAAA

GGTACACCCATGAA-GAAAGAGCCCTAGTT--GAGACAAATCCACGTTGA
GTTTAGAGAGAGAAAGAAAGAGCCTAGGTGAGAGACAAATCCACGTTGA

-----CTTT--GGTTTACAGATTAAAAAGCAAAA--CCCTAAATAAGC
ACTAATCTTTAGGGTTTAGAAAAGGAAAGAAAAAACCCTAAA AAAGC

AAATCGACATAATCTCGTAAAAAGAACAGACAAAACACAACCTCATGTA
AAATCGACGATAATCTCGTAAAAAGAAAGACAAAACACAACCTTATGTA

G---AAGGAACAAATTTCTGCGCGCCGCCAGTGTTA-----TTAATTCA
GAACAAGGAACAAATTTCTGAGCGCGCCGCCAGTTTAATTAATT TTAATTCA

GAATCATAA-----TTTCACGATTTTCAA CCCTC TCCTTTTAA GCTTCA
GAATCATAATAATAATTTTCACGTTTCTCAA TATCA TCCTTTT TTA---TTA

ACTCAAACATCATAAATTTCCCTTCCACAAACTACTGTATAAATCACFTT
AGTCACAAATACAAA CA--CACAAA CACAAACACTGTGTAAATCATTTT

TAACTTATTGCTTATTATT A.thaliana
CAACTCACCATCTCATTCCC A.arabicum

```

Abbx.: Bilateraler Vergleich der *En3* Sequenzen von *A. thaliana* und *A. arabicum* mit dem Programm VectorNTI.

6. Quellen

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

Bell, E.M., Lin, W.C., Husbands, A.Y., YU, L., Janagatha, V., Jablonska, B., Mongeon, A., Neff, M.M., Girke, T., Springer, P.S. (2012) Arabidopsis lateral organ boundaries negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 18: 21146-21151

Berleth and Jürgens (1993) The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the Arabidopsis embryo. *Development* 118: 575-687

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

Besnard, F., Rozier, F., Vernoux, T. (2014) The AHP6 cytokinin signaling inhibitor mediates an auxin-cytokinin crosstalk that regulates the timing of organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant. Signal Behav.* 9: e28788

Besnard, F., Refahi, Y., Morin, V., Marteaux, B., Brunoud, G., Chambrier, P., Rozier, F., Mirabet, V., Legrand, J., Lainé, S., et al. (2014) Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature* 505:417–421

Beveridge, C.A., Mathesius, U., Rose, R.J., Gresshoff, P.M. (2007). Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. *Cur. Opin. in Plant Biol.* 10: 44–51

Boer, D.R., Freire-Rios, A., van den Berg, W.A.M., Saaki, T., Manfield, I.W., Franco-Zorilla, S.J.M., de Vries, S.C., Solano, R., Weijers, D., Coll, M. (2014) Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* 156: 577-589

Bossinger, G., and Smith, D.R. (1996) Initiation patterns of flower and floral organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122: 1093-1102

Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1991) Genetic control of pattern formation during flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1: 37-52

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

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

Capron, A., Chatfield, S., Provar, N., Berleth, T. (2009) Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book* 7: e0126

Chandler J.W., Cole, M., Flier, A., Grewe, B., Werr, W. (2007) The AP2-transcription factors DORNRÖSCHEN and DORNRÖSCHEN-LIKE redundantly control *Arabidopsis* embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* 134: 1653-1662

Chandler, J.W. (2008) Cotyledon organogenesis. *Jour. Exp. Bot.* 59: 2917-2931

Chandler, J.W., Cole, M., Jacobs, B., Comelli, P., (2011a) Genetic interaction of DORNRÖSCHEN and DORNRÖSCHEN-LIKE reveals hierarchical interactions in auxin signalling and patterning of the *Arabidopsis* apical embryo. *Plant Mol. Biol.* 75: 223-236

Chandler, J.W., Cole, M., Comelli, P., Werr, W. (2011b) DORNRÖSCHEN-LIKE expression marks *Arabidopsis* floral organ founder cells and precedes auxin response maxima. *Plant Mol. Biol.* 76: 171-185

Chandler, J.W., and Werr, W. (2014) *Arabidopsis* floral phytomer development: auxin response relative to biphasic modes of organ initiation. *J. Ex. Bot.* 65: 3097-3110

Cheng, Y., Dai, X., Zhao, Y., (2007) Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2430-2439

Cole, M., Chandler, J.W., Weijers, D., Jacobs, B., Comelli, P., Werr, W. (2009) DORNROSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 136: 1643-1651

Cole, M., Jacobs, B., Soubigou-Taconnat, L., Balzergue, S., Renou, J.P., Chandler, J.W., Werr, W. (2013) Live imaging of DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE promoter activity reveals dynamic changes in cell identity and the surface of microcalli of *Arabidopsis thaliana* embryonic suspensions. *Plant Cell Reports* 32: 45-59

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743

Deb, Y., Marti, D., Frenz, M., Kuhlemeier, C., Reinhardt, D. (2015) Phyllotaxis involves auxin damage through leaf primordia. *Development* 142: 1992-2001

De Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Fafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez, P., Bögre, L., Murray, G. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* 26: 1434-1443

Eklund, D.M., Cierlik, I., Ståldal, V., Claes, A.R., Vestman, D., Chandler, J.W., Sundberg, E. (2011) Expression of *Arabidopsis* SHORT INTERNODES/STYLISH family genes in auxin biosynthesis zones of aerial organs is dependent on a GCC box-like regulatory element. *Plant Physiol.* 157: 2069-2080

Frerichs, A., Thoma, R., Abdallah, A.T., Frommolt, P., Chandler, J.W. (2016) The founder-cell transcriptome in the *Arabidopsis* apetalal cauliflower inflorescence meristem. *BMC Genomics* 3: 855

Friml, J., Vieten, S., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jürgens, G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 13: 147-153

Gaillochet, C., Daum, G., Lohmann, J.U. (2015) Ocell, where art thou? The mechanism of shoot meristem patterning. *Curr. Opin. Plant Biol.* 23: 91-97

Goldschmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., Eshed, Y. (2008) Signals derived from YABBY gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of Arabidopsis shoot apical meristems. *The Plant Cell* 20: 1217-1230

Golic, K.G., and Lindquist, S. (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome. *Cell* 59: 499-509

Grandjean, O., Vernoux, T., Laufs, P., Belcram, K., Mizukami, Y., Traas, J., (2004) In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. *The Plant cell* 16, 74-87

Gordon, A.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C., Meyerowitz, E.M. (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signalling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

Guilfoyle, T.J., and Hagen, G. (2007) Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 453-460

Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M., Jürgens, G. (2002) The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.* 16: 1610-1615

Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., Meyerowitz, E.M. (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr. Biol.* 15: 1899-1911

-
- Heyl, A., and Schmülling, T.** (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 480-488
- Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q.W., Howell, S.H., Chua, N.H.** (2006) The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene in *Arabidopsis* regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiol.* 47: 1443-1456
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T.** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor in *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063
- Irish, V.F., Sussex, I.M.** (1992) A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* 115: 745-753
- Jenik, P.D., and Barton, M.K.** (2005) Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132: 3577-3585
- Jenik, P.D., Gilmor, C.S., Lukowitz, W.** (2007) Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 207-236
- Kagale, S., Robinson, S.J., Nixon, J., Xiao, R., Huebert, T., Condie, J., Kessler, D., Clarke, W.E., Edger, P.P., Links, M.G., Sharpe, A.G., Parkin, I.A.P.** (2014) Polyploid evolution of the Brassicaceae during the cenozoic era. *The Plant Cell* 26: 2777-2791
- Kim, H., Cho, J., Ryoo, N., Qu, S., Wang, G., Jeon, J.** (2012) Development of a simple and efficient system for excising selectable markers in *Arabidopsis* using a minimal promoter::Cre fusion construct. *Mol. Cell.* 33: 61-69
- Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P.R., Agard, D.A.** (2014) Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 157: 1685-1697

Konishi, M., Donner, T.J., Scarpella, E., Yanagisawa, S. (2015) MONOPTEROS directly activates the auxin-inducible promoter of the Dof5.8 transcription factor gene in *Arabidopsis thaliana* leaf provascular cells. *J. Exp. Bot.* 66: 283-291

Koncz, C. and Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396

Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., Zažímalová, E. (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10: 249

Krogan, N.T., Marcos, D., Weiner, A.I., Berleth, T. (2016) The auxin response factor MONOPTEROS controls meristem function and organogenesis in both the shoot and root through the direct regulation of PIN genes. *New Phytologist* 212: 42-50

Laux, T. and Jürgens, G. (1997) Embryogenesis: a new start in life. *Plant Cell*): 989-1000

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

Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A.W., et al. (2014) JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research* 42, D142–D147

Matsuo, N. and Banno, H. (2008) The *Arabidopsis* transcription factor ESR1 induces *in vitro* shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 1045-1050

Matsuo, N., Makimo, M., Banno, H. (2011) *Arabidopsis* ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)1 and ESR2 regulate *in vitro* shoot regeneration and their expressions are differentially regulated. *Plant Sci.* 181: 39-46

Medberry, S:L., Dale, E., Qin, M., Ow, D.W. (1995) Intra-chromosomal rearrangements generated by *Cre-lox* site-specific recombination. *Nucleic Acid Research* 23: 485-490

Mironova, V.V., Omelyanchuk, N.A., Wiebe, D.S., Levitsky, V.G. (2014) Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. *BMC Genomics* 15: S4

Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J., Palme, K. (1998) A transcription activation for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 376-381

Müller, B. and Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* cytokinin signaling pathway. *Sci. STKE* 2007: CM5

Murata, M., Shibata, F., Hironaka, A., Kashihara, K., Fujimoto, S., Yokota, E., Nagaki, K. (2013) Generation of an artificial ring chromosome in *Arabidopsis* by Cre/LoxP-mediated recombination. *The Plant Journal* 74: 363-371

Nag, A., Yang, Y., Jack, T. (2007) DORNRÖSCHEN-LIKE, an AP2 gene, is necessary for stamen emergence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 65: 219-232

Oh, E., Zhu, J.Y., Bai, M.Y., Arenhart, R.A., Sun, Y., Wang, Z.Y. (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *eLife*, e03031

Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Onishi, M., Matsubayashi, Y. (2009) A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 570-580

Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y. et al. (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* 19: 6373-6378

Panne, D. (2008) The enhanceosome. *Cur. Opin. in Struc.Biol.* 18: 236–242

-
- Petrášek, J. and Friml, J.** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-2688
- Poethig, R.S.** (1987) Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. *Amer. J. Bot.* 74: 581-594
- Póloniová, Z., Jopčík, M., Matušíková, I., Libantová, J., Moravčíková, J.** (2015) The pollen- and embryo-specific *Arabidopsis* DLL promoter bears good potential for application in marker-free Cre/loxP self-excision strategy. *Plant Cell Rep.* 34: 469-481
- Rademacher, E.H., Lokerse, A.S., Schlereth, A., Llavata-Peris, C.I., Bayer, M., Kientz, M., et al.** (2012) Different auxin response machineries control distinct cell fates in the early plant embryo. *Dev. Cell* 22, 211–222
- Reinhardt, D., Mandel, T., Kuhlemeier, C.** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12: 507-518
- Reinhardt, D., Pesce, E., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Benentt, M., Traas, J., Friml, J., Kuhlemeier, C.** (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255-260
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol. Chem.* 379: 633-646
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L. Pineda, O., Ratcliffe, O.J et al.** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110
- Rieu, I and Laux, T.** (2009) Signalling pathways maintaining stem cells at the plant shoot apex. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20: 1083-1088
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyer, O., Bechtold, O.** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472

Satina, S., Blakeslee, A.F., Avery, A. (1940) Demonstration of three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am. J. Bot.* 27: 895-905

Sauer, B. and Henderson, N. (1998) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acid Res.* 17: 147-161

Scheres, B., McKhann, H.I., Van Den Berg, C. (1996) Roots redefined: anatomical and genetic analysis of root development. 111: 959-964

Schoof, H., Lenhardt, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jürgens, G., Laux, T. (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100: 635-644

Schuster, C., Gailloch, C., Medzihradzky, A., Busch, W., Daum, G., Krebs, M., Kehle, A., Lohmann, J.U. (2014) A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional and phytohormone signals. *Dev. Cell* 28:438-449

Seeliger, I., Frerichs, A., Glowka, D., Velo, L., Comelli, P., Chandler, J.W., Werr, W. (2016) The AP2-type transcription factor *DORNROESCHEN* and *DORNROESCHEN-LIKE* promote G1/S transition. *Mol. Genet. Genomics* 291: 1835-1849

Smyth, D.R., Bowman, J.L., Meyerowitz E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767

Tiwari, S.B., Hagen, G., Guilfoyle, T. (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* 15: 533-543

To, J.P. and Kieber, J.J. (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci.* 13: 85-92

Überlacker, B. and Werr, W. (1996) Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Mol. Breeding* 2: 293-295

-
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971
- Varaud, E., Brioude, F., Szécsi, J., Leroux, J., Perrot-Rechenmann, C., Bendahmane, M.** (2011) AUXIN RESPONSE FACTOR 8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. *Plant Cell* 23: 973-983
- Wachsman, G., Heidtra, R., Scheres B.** (2011) Distinct cell-autonomous functions of RETINOBLASTOMA-RELATED in Arabidopsis stem cells revealed by the brother of brainbow clonal analysis system. *Plant Cell* 23: 2581-2591
- Wang, R. and Estelle, M.** (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 51-58
- Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J.S., Schwank, G., Kientz, M., Jürgens, G.** (2006) Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryos. *Dev. Cell* 10: 265-270
- Yadav, R.K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H., Reddy, G.V.** (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev.* 25: 2025-2030
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., Mizuno, T.** (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 42: 1017-1023
- Yamaguchi, N., Wu, M., Winter, C.M., Berns, M.C., Nole-Wilson, S., Yamaguchi, A., Coupland, G., Krizek, B.A., Wagner, D.** (2013) A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Dev. Cell* 24: 271-282
- Yun, J., Kim, Y., Jung, J., Seo, P.J., Park, C.** (2012) The AT-hook motif containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying FLOWERING LOCUS T chromatin in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 287: 15307-15316

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Werr dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit anzufertigen und auch dafür, dass er angeregten Diskussionen jederzeit zur Verfügung stand, Offenheit gegenüber meinen Ideen gezeigt hat und schließlich auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit Zeit hatte.

Der ganzen AG Werr danke ich dafür, dass ich mich seit Beginn meiner Arbeitszeit in diesem Arbeitsumfeld sehr wohl fühlen konnte und für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen und die stetige Diskussionsbereitschaft in Hinblick auf fachliche Dinge.

Insbesondere danke ich Petra Comelli für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit und ihre große Hilfe in technischen Fragen. PD Dr. John Chandler möchte ich fürs Korrekturlesen und die Begutachtung meiner Arbeit danken.

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

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente im *DORNRÖSCHEN-LIKE (DRNL)*-Promotor und Etablierung eines Systems zur Visualisierung des Schicksals *DRNL*-markierter Gründerzellen“ ist von Prof. Dr. Wolfgang Werr betreut worden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dorothea Barbara Glowa
Anschrift: Drosselweg 11
50126 Bergheim
Geburtsdatum: 08.11.1985
Geburtsort: Peiskretscham, Polen
Staatsbürgerschaft: deutsch und polnisch
Familienstand: ledig
Tel.: 01781485118
E-mail: Dglowa85@gmail.com

Studium

Okt 2005-Mär 2006 Studium der Biologie an der Universität Bonn

Apr 2006-Apr 2012 Studium der Biologie an der RWTH-Aachen
Abschluss: Diplom
Thema: „Expression Flavin-haltiger Monooxygenasen (FMOs) aus *Arabidopsis thaliana*“

Nov 2012 Beginn der Promotion an der Universität zu Köln

Schulischer Werdegang

Aug 96 – Jun 2005 Städtisches Rurtalgymnasium Düren
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Aug 93 – Jul 95 Grundschule Niederzier
Aug 92 – Jul 93 Katholische Grundschule Huchem-Stammeln
