



**Untersuchungen zur Stammzellregulation im  
Sprossapikalmeristem von *Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Bleckmann  
aus Mülheim an der Ruhr

Düsseldorf, August 2010

Aus dem Institut für Genetik  
Der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Professor Dr. R. Simon  
Koreferent: Professor Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Arbeit wurden bereits in den folgenden Artikeln publiziert:

- Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA, Simon R (2010)** Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol* 152: 166-176
- Müller R, Bleckmann A, Simon R (2008)** The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* 20: 934-946

Ferner war ich an der Erstellung folgender Artikeln beteiligt:

- Bleckmann, A., & Simon, R. (2009).** Interdomain signaling in stem cell maintenance of plant shoot meristems. *Molecules and cells*, 27(6), 615-20
- Bisson, M. M., Bleckmann, A., Allekotte, S., & Groth, G. (2009).** EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *The Biochemical journal*, 424(1)
- Replogle A., Wang J., Bleckmann A., Hussey R. S., Baum T. J., Sawa S., Davis E. L., Wang X., Simon R., Mitchum M. G.. (2010)** Nematode CLE Signaling in *Arabidopsis* Requires CLAVATA2 and CORYNE. Submitted
- Weidtkamp-Peters S, Felekyan S, Bleckmann A, Simon R, Becker W, Kuhnemuth R, Seidel CA (2009)** Multiparameter fluorescence image spectroscopy to study molecular interactions. *Photochem Photobiol Sci* 8: 470-480

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>- 2 -</b>
1.1	Regulation des Sprossapikalmeristems (SAMs)	- 2 -
1.1.1	Aufbau des SAMs	- 2 -
1.1.2	Das Gleichgewicht zwischen <i>WUSCHEL</i> -Repression und <i>CLAVATA3</i> -Expression im SAM	- 3 -
1.1.3	Der CLAVATA-Signalweg	- 5 -
1.1.4	Die CLE-Proteinfamilie	- 6 -
1.1.5	WUS-induzierter Stammzellerhalt	- 8 -
1.1.6	Faktoren, die die SAM-Größe unabhängig vom CLV-Signalweg regulieren	- 9 -
1.2	Aufbau und Regulation des Wurzelapikalmeristems (WAMs)	- 10 -
1.2.1	Aufbau des WAMs	- 11 -
1.2.2	Homologe des CLV-Signalweges zur Regulation des WAMs	- 12 -
1.3	Das Zusammenspiel von Auxin und Cytokinin zur SAM- und WAM-Etablierung	- 13 -
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	- 15 -
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>- 17 -</b>
2.1	Materialien	- 17 -
2.1.1	Chemikalien	- 17 -
2.1.2	Puffer und Medien	- 17 -
2.1.3	Membran und Papier	- 17 -
2.1.4	Enzyme	- 17 -
2.1.5	Antikörper	- 17 -
2.1.6	Molekulare Größenstandards	- 18 -
2.1.7	Oligonukleotide	- 18 -
2.1.8	Genotypisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 21 -
2.1.9	Vektoren	- 22 -
2.1.10	Bakterienstämme	- 22 -
2.1.11	Pflanzenlinien	- 23 -
2.1.12	Gen-Annotationen	- 24 -
2.1.13	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken sowie Verfahren zur elektronischen Datenverarbeitung	- 25 -
2.2	Methoden	- 25 -
2.2.1	Pflanzenarbeit	- 25 -
2.2.1.1	Pflanzenanzucht	- 25 -
2.2.1.2	Transformation von <i>A. thaliana</i>	- 25 -
2.2.1.3	Isolierung transgener <i>A. thaliana</i> Linien	- 25 -
2.2.1.4	Indirekte Bestimmung der SAM Größe durch zählen der Karpellanzahl pro Blüte	- 26 -
2.2.1.5	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> Blättern	- 26 -
2.2.1.6	Induktion der Transgenexpression	- 26 -
2.2.1.7	$\beta$ -Glukuronidase Färbereaktion zum Nachweis gewebespezifischer Expression	- 26 -
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	- 27 -

2.2.2.1	DNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i>	- 27 -
2.2.2.2	RNA-Isolierung <i>A. thaliana</i>	- 27 -
2.2.2.3	cDNA-Synthese	- 27 -
2.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA	- 27 -
2.2.2.5	Proteinisolation aus Pflanzen	- 27 -
2.2.2.6	Western Blot-Analyse	- 27 -
2.2.2.7	Klonierungsmethoden	- 27 -
2.2.3	Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren	- 28 -
2.2.3.1	Erstellung Gateway®-kompatibler Zielvektoren (ZV)	- 28 -
2.2.3.2	Eingangsvektoren (EV)	- 29 -
2.2.3.3	Expressionsvektoren	- 31 -
2.2.3.4	DNA-Sequenzierungen	- 33 -
2.2.4	Mikroskopie	- 33 -
2.2.4.1	Durchlichtmikroskopie	- 33 -
2.2.4.2	Konfokale Mikroskopie	- 33 -
<b>2.3</b>	<b>Interaktionsstudien mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)</b>	<b>- 33 -</b>
2.3.1	FRET-Messungen mittels Akzeptor-Fotozerstörung (APB)	- 36 -
2.3.2	FRET-Messungen mittels FLIM	- 37 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>- 41 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Die CLV1-Proteinfunktion ist unabhängig von CLV2 und CRN.</b>	<b>- 41 -</b>
3.1.1	Der Ökotyp Landsberg <i>erecta</i> modifiziert den <i>clv</i> -Phänotyp.	- 43 -
3.1.2	RPK2 ist involviert in die CLE-abhängige Regulation von Meristemen.	- 46 -
<b>3.2</b>	<b>Expressionsstudien</b>	<b>- 49 -</b>
3.2.1	<i>CRN</i> ist im gesamten SAM, dem proximalen WAM sowie der Vaskulatur exprimiert.	- 49 -
3.2.2	<i>CLV2</i> ist im gesamten SAM, WAM sowie in der Vaskulatur exprimiert.	- 50 -
3.2.3	BAM1 zeigt eine PZ- und L1-spezifische Expression im SAM.	- 52 -
<b>3.3</b>	<b><i>In-planta</i>-Lokalisations- und -Interaktionsstudie der Rezeptoren des CLV-Signalweges.</b>	<b>- 53 -</b>
3.3.1	Die C-terminale Fusion eines Fluoreszenzproteins beeinflusst nicht die Funktionalität der Rezeptorproteine.	- 53 -
3.3.2	CLV1, CLV2 sowie CRN zeigen eine PM-Lokalisation in <i>Arabidopsis</i> .	- 56 -
3.3.3	In den Blattepidermiszellen von <i>N. benthamiana</i> ist die PM-Lokalisation von CRN und CLV2 jeweils abhängig von dessen Koexpression.	- 58 -
3.3.4	Der Transport von CRN und CLV2 an die PM ist abhängig von der TMD sowie der EZD von CRN.	- 63 -
3.3.5	CLV1 und CRN bilden Homomere.	- 67 -
3.3.6	Direkte Interaktion von CRN und CLV2.	- 69 -
3.3.7	CRN vermittelt die Interaktion des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes mit CLV1.	- 70 -
3.3.8	Die ER-Zurückhaltung von CLV2-Homologe ist unabhängig von CRN.	- 73 -
3.3.9	Direkte Regulation der Rezeptorkinasen durch die Phosphatasen POL und KAPP.	- 74 -
3.3.10	Etablierung der Proteininteraktionsstudie mittels FLIM-Messungen.	- 77 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>- 83 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Funktionelle Unabhängigkeit der CLV1- und CLV2/CRN-Signalwege.</b>	<b>- 83 -</b>

4.2 Die Zusammensetzung des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes im ER ist essentiell für den Transport zur PM.	- 84 -
4.3 PM-Translokation von AtRLPs wird nicht durch Koexpression von CRN vermittelt.	- 87 -
4.4 Bildung eines multimeren Rezeptorkomplexes im CLV-Signalweg.	- 88 -
4.5 Stabilisierung der Stammzellpopulationsgröße durch ein Netzwerk vieler Signalwege.	- 91 -
4.6 Genetische Interaktionsstudie des CLV-Signalweges mit RPK2.	- 92 -
4.7 Querverbindungen des CLV-Signalweges.	- 93 -
4.8 Regulation der Rezeptorkinasen durch die Phosphatasen POL und KAPP.	- 94 -
4.9 Ausblick	- 95 -
<b>5 ZUSAMMENFASSUNGEN</b>	<b>- 98 -</b>
5.1 Zusammenfassung	- 98 -
5.2 Abstract	- 99 -
<b>6 LITERATUR</b>	<b>- 100 -</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>- 106 -</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis	- 106 -
7.2 Abbildungsverzeichnis	- 108 -
7.3 Tabellenverzeichnis	- 109 -
7.4 Plasmidkarten	- 110 -
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>- 113 -</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>- 114 -</b>

---

# **KAPITEL 1**

## **EINLEITUNG**

# 1 Einleitung

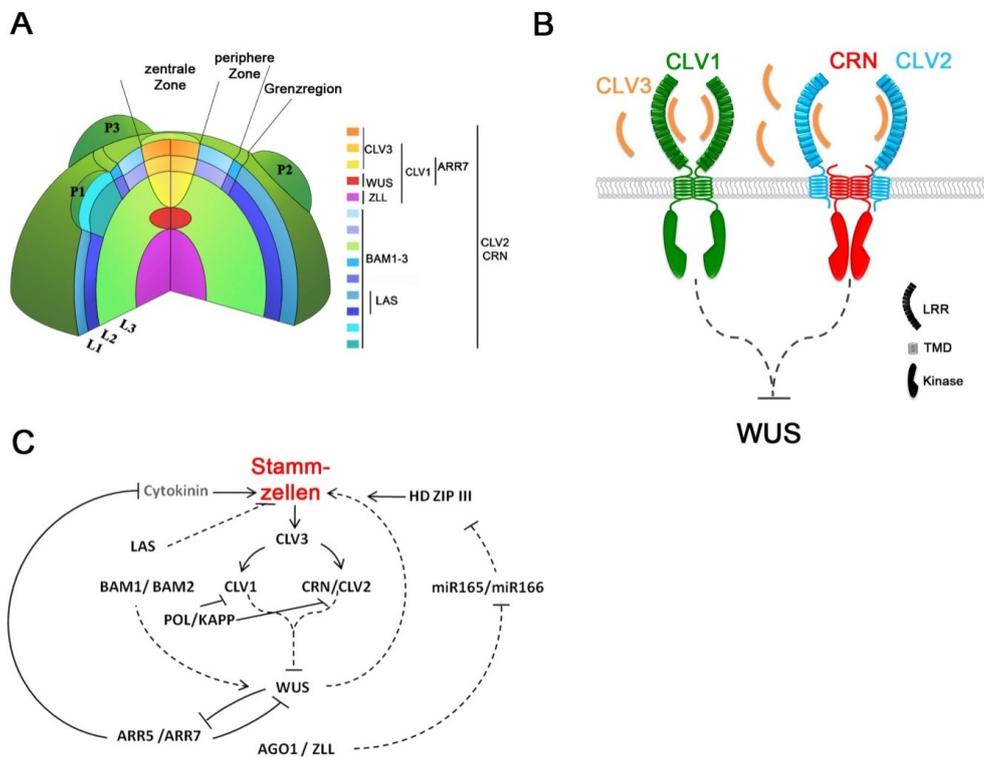
Als Modellorganismus für Studien zur Regulation der Stammzellpopulation in Pflanzen dient die *Brassicaceae Arabidopsis thaliana*. Die Grundlage für ein postembryonales Pflanzenwachstum ist die Zellteilungsaktivität von Stammzellen, die in den meristematischen Geweben an den apikalen und basalen Polen der Pflanzen lokalisiert sind. Oberirdisches Wachstum, wie die Bildung von Blättern, Stamm und Blüten, beruht auf der Zellteilung im Sprossapikalmeristem (SAM) und unterirdisches Wachstum, wie die Bildung von Wurzeln, auf der Zellteilung im Wurzelapikalmeristem (WAM). Die Unterteilung in Zellpopulationen unterschiedlicher Identitäten innerhalb dieser Gewebe basiert auf Zellursprung, Zellteilungsrate, Zellmorphologie und Genexpressionsmustern.

## 1.1 Regulation des Sprossapikalmeristems (SAMs)

### 1.1.1 Aufbau des SAMs

In der zentralen Zone (ZZ) des kuppelförmigen SAMs befinden sich Stammzellen, die eine sehr geringe Zellteilungsrate aufweisen. In die periphere Zone (PZ) verdrängte Tochterzellen zeigen eine erhöhte Zellteilungsrate und tragen zur Organbildung oder zur Bildung der Grenzregion zwischen den Organen bei (Abb. 1A). In einem Längsschnitt kann das SAM aufgrund von Zellursprung und Zellteilungsebene in drei Gewebeschichten unterteilt werden (von außen nach innen L1-L3). In *Arabidopsis* bestehen die L1- und L2-Schichten aus je einer Zelllage. Typisch für die Zellen der L1 und L2 ist eine vorzugsweise antikline Zellteilung. Die Zellen dieser Lagen basieren dabei auf je drei Ursprungszellen, die während der Embryogenese angelegt wurden. Aus ihnen gehen die Epidermis (L1), die Subepidermis sowie Keimzellerivate (beide L2) hervor. Die größeren, mehrschichtig angeordneten Zellen der L3 weisen sowohl antikline als auch perikline Zellteilungen auf und bilden das parenchymatische und vaskuläre Gewebe (Steeves *et al.*, 1989). Die Stammzellpopulation der ZZ enthält Zellen aus allen drei Gewebeschichten, die durch Plasmodesmata zu einem Symplasten verbunden sind (Rinne *et al.*, 1998). Die Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation basiert auf einer Zellpopulationsasymmetrie und wird nicht-zellautonom durch Zellen des organisierenden Zentrums (OZ) gesteuert. Das OZ wird durch eine kleine, mitotisch fast inaktive Zellpopulation unterhalb der Stammzellen gebildet. Unterhalb des OZs befindet sich die Rippenzone (RZ), aus der die Vaskulatur und der Korpus der Pflanze hervorgehen. Dieser domänenspezifische Aufbau des SAMs wird durch eine Balance zwischen den neu gebildeten Zellen und den sich differenzierenden Zellen

aufrechterhalten, die auf einem engen regulatorischen Netzwerk zwischen den einzelnen Zellpopulationen beruht.



**Abb. 1 Aufbau und Regulation des Sprossapikalmeristems.**

(A) Das SAM wird im Querschnitt in die zentrale Zone (ZZ) und periphere Zone (PZ) unterteilt. In der PZ werden Primordien (P1-P3) im goldenen Winkel ( $137.5^\circ$ ) radial angelegt und durch eine Grenzregion separiert. Im Längsschnitt kann das SAM in drei Schichten (L1-L3) unterteilt werden. Die *CLAVATA3* (*CLV3*) exprimierenden Stammzellen lokalisieren in der ZZ und werden nicht-zellautonom von den *WUSCHEL* (*WUS*) exprimierenden Zellen des organisierenden Zentrums (OZ) reguliert. Die Expressionsdomänen von Genen, die für die Regulation des SAMs verantwortlich sind, sind farblich gekennzeichnet. (B) Modell des CLV-Signalweges. Das CLV3-Signal wird durch zwei Rezeptorkomplexe bestehend aus CLV1 auf der einen Seite und aus CLV2 und CRN auf der anderen Seite wahrgenommen und führt zur transkriptionellen Repression von *WUS*. (C) Signalnetzwerk zur Regulation der Stammzellpopulation. Dargestellt sind bekannte Faktoren, die den Stammzellerhalt beeinflussen.

### 1.1.2 Das Gleichgewicht zwischen *WUSCHEL*-Repression und *CLAVATA3*-Expression im SAM

Die Stammzellanzahl im SAM ist zunächst ein direktes Resultat einer Rückkopplungsschleife zwischen Stamm- und OZ-Zellen. Die Stammzellen sekretieren hierbei *CLAVATA3* (*CLV3*), ein Mitglied der CLE-Proteinfamilie (siehe 1.1.4), das zur Aktivierung des CLV-Signalweges führt (Clark *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1999). Dieser resultiert in der Repression des Transkriptionsfaktors *WUSCHEL* (*WUS*) im OZ, der essentiell für die Stammzellbildung und damit für die vermehrte *CLV3*-Expression ist (Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). Der Funktionsverlust von *WUS* führt bereits im

Keimlingsstadium zur Ausdifferenzierung der meristematischen Zellen im SAM. Es erfolgt eine kontinuierliche Anlegung von Sekundärmeristemen, die jedoch nach der Bildung weniger Rosettenblätter ihre Aktivität wieder einstellen. Dadurch kommt es zur Anhäufung von Blättern, die der Pflanze ein „wuscheliges“ Aussehen verleihen. Ein Wandel in der Pflanzenentwicklungsphase vom vegetativem hin zum reproduktiven Wachstum findet verzögert statt. Die in der Reproduktionsphase angelegten Infloreszenzmeristeme führen zur Bildung von wenigen Blüten, deren Blütenorgan- und Wirtelanzahl aufgrund einer frühzeitigen Terminierung des Blütenmeristems reduziert sind (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000). *WUS* bewirkt eine nicht-zellautonome Aufrechterhaltung der Stammzellen, ist jedoch für die Stammzellinitiierung nicht essentiell. Der Verlust des Signalpeptides *CLV3* führt zur fortschreitenden Akkumulation von undifferenzierten Zellen im SAM. Dies basiert nicht auf einer erhöhten Zellteilungsrate, sondern auf einer verzögerten Differenzierung aufgrund einer vergrößerten Expressionsdomäne von *WUS* (Laufs *et al.*, 1998b). Diese Akkumulation von undifferenzierten Stammzellen resultiert in einer Verdickung der Sprossachse mit gestörter Phyllotaxis.

Die Blütenorgane sind in vier Wirteln (W1-W4) angelegt, wobei sie von außen nach innen vier Sepale (W1), vier Petale (W2), sechs Stamen (W3) und zwei fusionierte Karpelle (W4) beinhalten. Die vergrößerten Blütenmeristeme von *clv3*-Mutanten bilden zusätzliche Organe in den einzelnen Wirteln sowie zusätzliche innere Wirtel, was den Schoten eine keulenartige Form verleiht (Clark *et al.*, 1995). Das Gleichgewicht zwischen *WUS*-Repression und *CLV3*-Expression basiert auf einem gepufferten Expressionssystem, in dem eine zehnfache Expressionsschwankung von *CLV3* keinen Einfluss auf die Meristemgröße hat (Müller *et al.*, 2006). Auch vorübergehende Schwankungen der Expressionsstärke von *WUS* führen nicht zu einer Erhöhung der Stammzellanzahl (Geier *et al.*, 2008). Der Übergang vom vegetativen zum Infloreszenzmeristem korreliert mit einer kurzfristigen Vergrößerung des SAMs. Diese Vergrößerung basiert auf einer Verbreiterung der PZ durch eine gesteigerte Zellteilungsrate. Trotz der vorübergehend verdoppelten Expressionsdomäne von *WUS* ist keine signifikante Vermehrung von *CLV3*-exprimierenden Stammzellen zu beobachten. Kleine Schwankungen im Expressionslevel von *WUS* oder *CLV3* zeigen somit keine Auswirkungen auf die Größe der ZZ, was auf eine Regulation der *WUS*-Perzeption hindeutet.

### 1.1.3 Der CLAVATA-Signalweg

An der Signaltransduktion des CLV3-abhängigen Signals in die Zelle sind drei integrale Membranproteine beteiligt, CLAVATA1 (CLV1), CLV2 und CORYNE (CRN) (Abb. 1B). *CLV1* wird in Zellen der L2 und L3 der ZZ exprimiert. Es kodiert eine rezeptorähnliche Kinase (RLK), deren extrazelluläre Domäne zahlreiche leucinreiche Motive (LRR) und deren intrazelluläre Domäne eine Serin/Threonin-Kinase enthält (Clark *et al.*, 1997). Das ubiquitär exprimierte *CLV2* kodiert ein rezeptorähnliches Protein (RLP), das über zahlreiche extrazellulär gelegene LRRs verfügt, dem jedoch eine intrazelluläre Kinasedomäne fehlt (Jeong *et al.*, 1999). *CRN* kodiert eine integrale Membrankinase, der eine extrazelluläre Rezeptordomäne fehlt, und wird im gesamten SAM, in der Vaskulatur sowie dem WAM exprimiert (Müller *et al.*, 2008).

Im Vergleich zu *clv3*-Mutanten führt der Funktionsverlust der einzelnen Rezeptoren zur Ausbildung eines intermediären SAM-Phänotyps. *crn/clv1*-Doppelmutanten zeigen im Gegensatz zu *crn/clv2*-Doppelmutanten einen additiven Phänotyp, der auf eine weitere Reduktion des CLV-Signalweges zurückgeht. Die Analyse der Rezeptordoppelmutanten deutet eine funktionelle Abhängigkeit von CRN und CLV2 sowie eine Unabhängigkeit von CRN und CLV1 an (Müller *et al.*, 2008). Des Weiteren konnten in *crn-1*- und *clv2-1*-Pflanzen SAM-unabhängige Phänotypen beobachtet werden, die von *clv1-11*- und *clv3-2*-Mutanten nicht ausgebildet werden. Der Funktionsverlust von CRN oder CLV2 supprimiert partiell, im Gegensatz zum Funktionsverlust von CLV1, die durch *erecta* (*er*) verursachte Stauchung des Blütenstängels im Ökotyp *Ler*.

Eine Überexpression von *CLV3* verursacht neben der Ausbildung eines *wus*-ähnlichen Phänotyps im SAM auch die Terminierung des WAM (siehe Abschnitt 1.1.4 und 1.2.2). Der Funktionsverlust von CLV2 oder CRN in *CLV3*-überexprimierenden Pflanzen supprimiert neben dem *wus*-ähnlichen Phänotyp des SAMs auch die Terminierung des WAM (Torii *et al.*, 1996; Kayes *et al.*, 1998; Fiers *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen begründet das Modell, in dem das CLV3-Signal durch zwei unabhängige Rezeptorkomplexe in die Zelle weitergeleitet wird. Hier ist CLV1 funktionell von CLV2 und CRN separiert. Darüber hinaus ist der CLV2/CRN-Rezeptorkomplex an der Regulation anderer Entwicklungsprozesse beteiligt (Abb. 1B; Müller *et al.*, 2008). Diese Modellvorstellung wurde auch durch den strukturellen Aufbau der einzelnen Proteine unterstützt, da CLV1 eine Rezeptor- und Kinasedomäne besitzt und CRN und CLV2 sich diesbezüglich ergänzen. Eine direkte Bindung von CLV3 an CLV1 konnte in einem *In-vitro*-Bindungsexperiment gezeigt werden (Ogawa *et al.*, 2008). Dass die Funktion von CLV1 abhängig von CLV2 sein könnte,

kann anhand der derzeitigen Datenlage nicht ausgeschlossen werden. Auch die Bildung eines multimeren Rezeptorkomplexes aus drei Rezeptorproteinen ist vorstellbar.

Bisher sind nur wenige weitere Faktoren des CLV-Signalweges bekannt. POLTERGEIST (POL) und dessen Homolog POLTERGEIST-like1 (PLL1) sind in der Vaskulatur sowie dem gesamten SAM exprimiert. Beide kodieren Proteinphosphatasen der Klasse 2C, deren Funktionsverlust den Sprossphänotyp von *crn/clv*-Mutanten supprimiert (Yu *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008). Die in *pol/pll1*-Doppelmutanten beobachtete Keimlingsletalität basiert auf den starken Defekten in der Wurzel- und Vaskularentwicklung. In Transplantationsexperimenten von mutanten apikalen Keimlingsbereichen auf wildtypischen Hypokotylen konnte gezeigt werden, dass *pol/pll1*-Doppelmutanten die *WUS*-Expression im OZ nicht aufrechterhalten können. Dies führt im Spross zur Ausbildung eines *wus*-ähnlichen Phänotyps (Song *et al.*, 2006). Die POL- bzw. PLL1-Funktion ist somit für die Aufrechterhaltung der *WUS*-Expression essentiell und dem CLV3-Signal nachgeschaltet. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass POL und PLL1 mittels N-Myristoylierung und Palmitoylierung an der Plasmamembran (PM) lokalisieren (Gagne *et al.*, 2010). Die genaue Funktion dieser Phosphatasen innerhalb des CLV-Signalweges ist bisher unklar (Abb. 1C). Die PM-Lokalisation könnte jedoch eine direkte negative Regulation der Rezeptorkinase andeuten.

Die kinaseassoziierte Proteinphosphatase KAPP und das Rho-verwandte Protein ROP interagieren in Immunopräzipitationsexperimenten mit CLV1 (Stone *et al.*, 1998; Trotochaud *et al.*, 1999). Wie bei POL führt eine reduzierte KAPP-Expression zur Suppression des *clv1*-Phänotyps (Stone *et al.*, 1998) und die Überexpression resultiert in einem vergrößertem SAM (Williams *et al.*, 1997). Über welche Transkriptionsfaktoren der CLV-Signalweg zur Repression von *WUS* führt, ist bisher noch ungeklärt.

#### 1.1.4 Die CLE-Proteinfamilie

Die 32 Mitglieder der pflanzenspezifischen CLV3/ ENDOSPERM SURROUNDING REGION (ESR)-related (CLE)-Genfamilie kodieren kleine Proteine, die sich durch ein Signalpeptid sowie ein am C-Terminal gelegenes, 14 AS großes konserviertes CLE-Motiv auszeichnen (Cock *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer geringen Größe und der hohen funktionellen Redundanz ist die Identifizierung und Charakterisierung der verschiedenen CLE-abhängigen Entwicklungsprozesse problematisch. Eine Überexpression von unterschiedlichen CLEs (u.a. CLV3) führt zur Differenzierung des WAM. Dies deutet eine CLE-abhängige Regulation des WAM, ähnlich der im SAM stattfindenden Reaktion, an

(Casamitjana-Martinez *et al.*, 2003; Hobe *et al.*, 2003). Fiers *et al.*, 2005 konnten zeigen, dass dieser Effekt auf die Aktivität des CLE-Motives zurückzuführen ist. So führt das Wachstum auf CLE-peptidhaltigem Medium zur Ausdifferenzierung des WAM. Für diesen Wachstumseffekt reichen bereits 12 AS des CLE-Motives aus (Ito *et al.*, 2006). Im Fall von CLV3 konnte mittels *nano-LC-MS/MS* gezeigt werden, dass das 97 AS große Proprotein nach posttranslationaler Modifikation als 13 AS großes arabinosyliertes Glycopeptid sekretiert wird (Ohyama *et al.*, 2009). Die Behandlung von Pflanzen mit den Peptiden verschiedener CLE-Proteine ermöglicht eine funktionelle Gruppierung. Die meisten der CLE-Peptide (19 von 26 getesteten) können eine Differenzierung des WAM bewirken (Ito *et al.*, 2006; Kinoshita *et al.*, 2007). Nicht jedes dieser CLE-Peptide, die die Terminierung des WAM bewirken, führt auch zu einer Terminierung des SAM. Umgekehrt gibt es auch CLE-Peptide, die bei Überexpression einen *wus*-ähnlichen Phänotyp verursachen, jedoch nicht zur Terminierung des WAM führen. Dies deutet eine spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktion sowie die Existenz mehrerer CLE-abhängiger Rezeptorkomplexe an, die das SAM und das WAM aufrechterhalten. Für die Funktionsspezifität ist das CLE-Motiv verantwortlich, jedoch kann die Aktivität durch die nicht konservierten Bereiche modifiziert werden. So kommt es bei Überexpression von CLE14 nur selten zur Terminierung des SAM, meist jedoch zur Terminierung des WAM (Meng *et al.*, 2010). Der Austausch von CLE14-Sequenzen außerhalb des CLE-Motivs gegen Sequenzen von CLE1 führt neben der Terminierung des WAMs auch zu einer Terminierung des SAMs. Dieser Effekt ist wahrscheinlich durch die Prozessierung des Peptids zu erklären, die durch die Sequenzen außerhalb des CLE-Motivs beeinflusst werden kann (Meng *et al.*, 2010).

Drei CLE-Peptide, CLE41/TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR (TDIF), CLE42 und CLE44 führen nicht zur Terminierung des WAMs oder SAMs, jedoch zu einer verminderten Differenzierung von Xylemzellen (Ito *et al.*, 2006). CLE41/44 (identisches CLE-Motiv) werden von den Phloemzellen sekretiert und regulieren über die rezeptorähnliche Kinase PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (PXY)/TDIF RECEPTOR (TDR), einem CLV1-Homolog, die Aufrechterhaltung des Prokambiums (Hirakawa *et al.*, 2008). Der Funktionsverlust von PXY führt zu einem Verlust von Prokambiumzellen, wodurch Xylem- und Phloemzellen direkt aneinander grenzen. Das Vaskulärbündel zeigt eine radiale Verkleinerung mit einer tangentialen Verbreiterung. Dieser Phänotyp konnte auf eine fehlerhafte Orientierung der Zellteilungsplatte während der Bildung der Vaskulatur zurückgeführt werden (Fisher *et al.*, 2007). Der von den Phloemzellen sekretierte CLE41/44-Gradient reguliert die stereotype Zellteilung sowie den Erhalt von

Prokambiumzellen (Etchells *et al.*, 2010). CLE40 ist an der Regulation des distalen WAM beteiligt, auf die in Abschnitt 1.2.2 eingegangen wird. Somit werden primäre und sekundäre Meristeme über CLE-abhängige Signalwege gesteuert. Die Funktion der anderen CLE-Peptide konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

### 1.1.5 WUS-induzierter Stammzellerhalt

Der Signalweg, der über WUS zur Aufrechterhaltung der Stammzellen in der ZZ führt, ist bisher nur wenig verstanden. *WUS*-Expression ist jedoch ausreichend, um selbst in der Wurzel Sprossstammzellen zu bilden (Mayer *et al.*, 1998; Gallois *et al.*, 2004). *WUS* ist Gründungsmitglied der WUSCHEL-related homeobox (WOX)-Proteinfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zelldifferenzierung spielt. Neben *WUS*, welches für die Erhaltung der Stammzellen im SAM essentiell ist, reguliert *WOX5* den Erhalt des WAMs (Sarkar *et al.*, 2007). *WOX9* ist für eine verzögerte Zelldifferenzierung essentiell (Wu *et al.*, 2005). Ein Faktor der für die WUS-abhängige Stammzellinduktion wesentlich ist, ist der Cytokininhalt im SAM. Cytokininsignale beeinflussen die Positionierung und Expression von *WUS* im SAM, unter anderem durch Modifikation des CLV-Signalweges. Das Cytokininsignal reprimiert *CLV1* und beeinflusst in einer Rückkopplungsschleife die Expressionsdomäne von *WUS* (Abb. 1C; Lindsay *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2009). Cytokinin bewirkt, vermittelt durch Rezeptoren der Histidin-Klasse (AHK2, 3 und 4), die Aktivierung von ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) der Klassen A und B (Muller *et al.*, 2007). ARRs der Klasse B aktivieren cytokinin-induzierbare Zielgene, wohingegen die ARRs der Klasse A das Cytokininsignal reprimieren. Dadurch findet eine Autoregulation des Cytokininsignalweges statt. Diese ARR-abhängige Autoregulation des Cytokininsignalweges wird durch eine weitere Autoregulation zwischen *WUS* und den ARRs (Typ A) beeinflusst (Abb. 1C). *WUS* reprimiert die Expression der ARRs der Klasse A, die wiederum *WUS* reprimieren (Leibfried *et al.*, 2005). Eine gestörte Cytokininbiosynthese führt zur Verkleinerung des SAMs (Kurakawa *et al.*, 2007). Cytokininbehandlung kann *SHOOT MERISTELESS (STM)*-Mutanten retten (Long *et al.*, 1996), da *STM* normalerweise die Cytokininbiosynthese im SAM induziert (Jasinski *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005).

Das in der Vaskulatur und in der adaxialen Organseite exprimierte *ZWILLE (ZLL)*, ein Mitglied der ARGONAUT (AGO)-Proteinfamilie, ist essentiell für die Perzeption des WUS-Signals in der ZZ (Lynn *et al.*, 1999; Moussian *et al.*, 2003; Tucker *et al.*, 2008). Die in der L1 induzierte *CLV3*-Expression wird in *zll*-Mutanten nicht in die L2 und L3 ausgedehnt, trotz etablierter Expression von *WUS* im OZ. Dies führt zu einer Differenzierung der Zellen in der

ZZ. Auch die Bildung von Zellauswüchsen entlang des Hypokotyls bei ektopischer *WUS*-Expression ist abhängig von ZLL. *zll*-Embryos zeigen eine deutlich stärkere Expression der MikroRNA *miR165/166* im sich etablierenden SAM (Liu *et al.*, 2008). „Aktivierungstaggung“ führt zu einer meist gewebsspezifischen Expressionserhöhung von Genen, vor denen die T-DNA inseriert ist. Im Fall der „Aktivierungstaggung“-Linien der MikroRNA *miR166*, *jabba-1D* (*jba-1D*) und *meristem enlarged1* (*men1*) resultiert dies in der Bildung eines vergrößerten SAMs (Kim *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). Eine konstitutive Überexpression von *miR166* bewirkt die Bildung eines *zll*- oder *jba-1D*-ähnlichen Phänotyps. Eine moderate Erhöhung des *miR165/166* führt somit zur Vergrößerung des SAMs. Eine weitere *miR165/166*-Zunahme hat die Ausdifferenzierung des SAMs zur Folge. Dabei bewirkt die veränderte *miR165/166*-Expression eine Destabilisierung oder Entkopplung des CLV/*WUS*-Gleichgewichts. *miR165/166* initiieren eine AGO-vermittelte Repression der HOMEODOMÄNE LEUCIN ZIPPER DER KLASSE III (HD-ZIP III), wie *PHABULOSA* (*PHB*), *REVOLUTA* (*REV*) und *ATHB-15/CORONA* (*CNA*) (Mallory *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Byrne, 2006). In *zll*-Mutanten führt die Akkumulation von *miR165/166* zur transkriptionellen Repression von *REV*, *PHB* und *CNA*, wohingegen in *jba-1D* nur *CNA* und *PHB* reprimiert werden und *REV* eine geringe Expressionserhöhung zeigt (Williams *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). Somit könnte der variable Phänotyp von *miR166*-überexprimierenden Pflanzen auf einer minimalen *REV*-Expression basieren, deren Aktivität essentiell für den Erhalt des SAMs ist (Prigge *et al.*, 2005).

### 1.1.6 Faktoren, die die SAM-Größe unabhängig vom CLV-Signalweg regulieren

Eine gegenseitige Regulation der verschiedenen Zellpopulationen im SAM konnte durch Laserablationsexperimente einzelner Bereiche bewiesen werden. Die Ablation der zentralen Zone und des OZ führt zur Expression von *WUS* in Zellen der PZ. Diese ist für die Stammzellbildung in der L1, L2 und L3 innerhalb des PZ ausreichend (Reinhardt *et al.*, 2003). Die Ablation der L1-Zellen in der zentralen oder peripheren Zone verdeutlicht deren regulatorische Eigenschaften in Bezug auf die Zellteilungsebene der L2. Nach Verlust der L1 teilt sich die L2 hauptsächlich periklin, was zu Zellauswüchsen an der Ablationsstelle führt. Eine L1-Ablation im Primordium hingegen inhibiert die Zellteilungen in der L2 und L3, wodurch es zum Wachstumsarrest des Primordiums kommt (Reinhardt *et al.*, 2003). Nicht nur Stammzellen regulieren ihre Tochterzellen, sondern die Tochterzellen regulieren auch die Stammzellen. Ablationen in der Peripherie führen zu einer reduzierten *WUS*-Expression (Reinhardt *et al.*, 2003). Die CLV1-Homologe *BARELY ANY MERISTEMI* (*BAM1*), *BAM2*

und *BAM3* werden außerhalb der ZZ exprimiert und fördern redundant den Stammzellerhalt. Der Funktionsverlust von *bam1* und *bam2* führt zur Bildung eines kleineren Meristems, das bei zusätzlichem Verlust von *bam3* frühzeitig terminiert (DeYoung *et al.*, 2006). Außerdem sind *bam1/bam2*-Doppelmutanten aufgrund einer gestörten Antherenentwicklung steril und zeigen Defekte in der Vaskularentwicklung. CLV1 kann die BAM-Funktion ersetzen, wohingegen BAM1 oder BAM2 die CLV1-Funktion nur partiell ersetzen können. Da CLV1 Teil eines CLE-abhängigen Signalweges ist, ist es wahrscheinlich, dass auch die BAMs, mit einem gegensätzlichen Effekt, über CLE-Peptide gesteuert werden (DeYoung *et al.*, 2006). Das Zusammenspiel von BAM-abhängiger Aktivierung und CLV-abhängiger Repression des Stammzellerhalts ist bisher nicht verstanden. Der *clv*-Phänotyp von *clv3-2*-Mutanten wird durch den Funktionsverlust von *BAM1* oder *BAM2* supprimiert. Ein signifikanter Effekt auf *clv2-1*-Mutanten konnte jedoch nicht beobachtet werden. Konträr dazu wird der *clv*-Phänotyp in *clv1/bam1*-, *clv1/bam2*- oder *clv1/bam1/bam2*-Mutanten verstärkt, wobei die Dreifachmutante einen stärkeren *clv*-Phänotyp ausbildet als *clv3-2* Pflanzen (DeYoung *et al.*, 2008). Der Mechanismus dieser Interaktion zwischen dem BAM- und dem CLV-Signalweg ist bislang noch nicht verstanden.

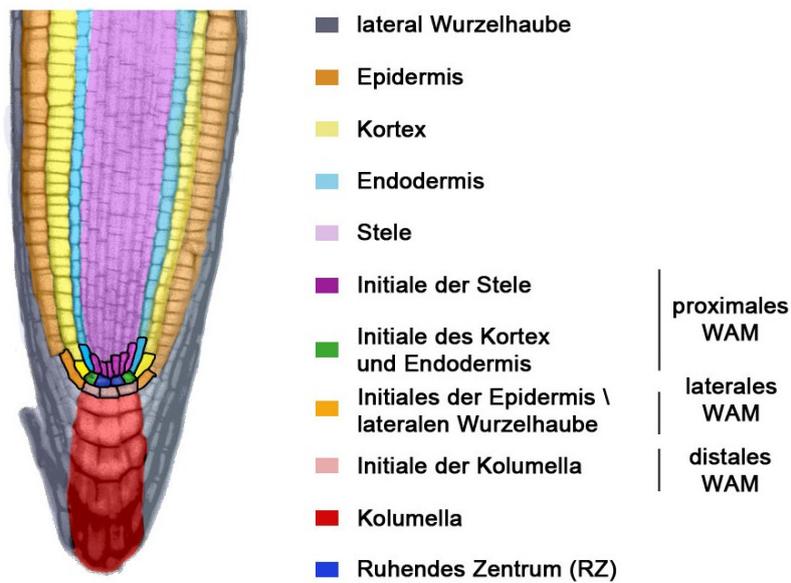
Auch von den Primordien gehen Signale aus, die die Stammzellpopulation beeinflussen. So führt der Verlust von Mitgliedern der *YABBY* (*YAB*)-Genfamilie wie *YAB1/FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*) und *YAB3*, die für die abaxiale Blattidentität essentiell sind, zu einem vergrößerten Meristem. Diese negative Regulation findet indirekt statt, da weder mRNA noch Protein in der ZZ detektiert werden können (Kumaran *et al.*, 2002; Goldshmidt *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen zeigen, dass ein Netzwerk aus Signalwegen in den verschiedenen Domänen des SAMs für das Gleichgewicht zwischen Stammzellerhalt und Differenzierung verantwortlich ist. Die Analyse der Signalwegsinteraktion auf molekularer Ebene ist essentiell für ein besseres Verständnis der Stammzellregulation.

## **1.2 Aufbau und Regulation des Wurzelapikalmeristems (WAMs)**

So wie das SAM verantwortlich ist für die Organbildung im oberirdischen Pflanzenbereiche, wird das Wurzelwerk von den Stammzellen im Wurzelapikalmeristem (WAM) gebildet.

### 1.2.1 Aufbau des WAMs

Das WAM wird während der Embryogenese aus der obersten Suspensorzelle, der Hypophyse, gebildet. Es ist damit das einzige embryonale Gewebe, das aus der basalen Zelle der ersten zygotischen Teilung hervorgeht. Die Wurzel besteht aus konzentrisch zueinander angeordneten Gewebetypen. Von außen nach innen setzt sie sich aus Epidermis, Kortex, Endodermis, Perizykel und der Vaskulatur zusammen. Jede einzelne Zellreihe kann auf einzelne Stammzellen, die so genannten Initialen, des proximalen und lateralen WAMs zurückgeführt werden. Die Kolumella wird durch die Initialen des distalen WAM gebildet. Ihre Zellen werden zum Schutz und erleichterten Eindringen in die Erde gebildet und regelmäßig abgestoßen. Die eingelagerten Stärkekörner dienen zur Wahrnehmung des Erdanziehung und regulieren die Wuchsrichtung. Im Längsschnitt kann das WAM in drei Abschnitte unterteilt werden. Die meristematische Zone an der Wurzelspitze beherbergt die Zellen des ruhenden Zentrums (RZs), die von den Initialen sowie von deren sich schnell teilenden Tochterzellen umgeben sind. Der Stammzellerhalt basiert auf einer asymmetrischen Zellteilung der Initialen, bei der jede Tochterzelle eine Stammzelle bleibt, die im Kontakt mit dem RZ steht. Diese Teilungsasymmetrie der Initialen steht im Kontrast zur Populationsasymmetrie im SAM. Die Tochterzellen beginnen nach mehreren Zellteilungen sich zu strecken und bilden die Elongationszone. In der Differenzierungszone nehmen die Zellen ihre endgültige Zellidentität an (Dolan *et al.*, 1993).



**Abb. 2 Aufbau des Wurzelapikalmeristems (WAMs)**

Das WAM ist konzentrisch aufgebaut, bestehend aus der Epidermis, dem Kortex, der Endodermis und den Zellen der Stele, die das Xylem und das Phloem beinhalten. An der Wurzelspitze sind die Stammzellen, auch Initialen genannt, um die Zellen des ruhenden Zentrums angeordnet. Dabei kann jede Zellreihe in einem Längsschnitt auf die Teilungsaktivität einer Initiale zurückgeführt werden. Eine Ausnahme stellen Kortex und Endodermis dar, die auf eine gemeinsame Initiale zurückzuführen sind. Das proximale WAM beinhaltet die Initialen der Stele sowie des Kortex und der Endodermis. Das laterale WAM enthält die Initiale der Epidermis und die laterale Wurzelhaube. Das distale WAM beinhaltet die Kolumellainitiale. Die Kolumella dient dem Schutz der Wurzel und ist mit Stärkekörnern für die Wahrnehmung des Gravitropismus ausgestattet.

### 1.2.2 Homologe des CLV-Signalweges zur Regulation des WAMs

Die Überexpression von einigen CLE-Genen oder die Behandlung mit deren CLE-Peptiden führt zur Terminierung des proximalen und distalen WAMs. Dies lässt auf eine dem CLV-Signalweg ähnliche Regulation des WAM schließen. Der Funktionsverlust von CRN oder CLV2 bewirkt eine reduzierte Sensitivität gegenüber dieser CLE-Peptid-Behandlung (Fiers *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass bei *clv2-1* die reduzierte Sensitivität nur im proximalen, nicht aber im distalen WAM auftritt (Stahl *et al.*, 2009). Diese Beobachtung lässt auf eine getrennte CLE-abhängige Regulation des proximalen und distalen WAMs schließen. CLE40 gehört zu einer Gruppe von CLE-Peptiden, die CLV3 im SAM ersetzen können. Ferner führt deren Überexpression neben dem *wus*-ähnlichen Sprossphänotyp auch zur Differenzierung des proximalen und distalen WAMs (Hobe *et al.*, 2003; Stahl *et al.*, 2009). *CLE40* wird schwach im gesamten Spross exprimiert, zeigt bei Funktionsverlust jedoch keinen offensichtlichen Phänotyp. In der Wurzel wird *CLE40* in wenigen differenzierten Kolumellazellen sowie in differenzierten Stelezellen exprimiert. Der Funktionsverlust von *CLE40* führt zur Bildung von verkürzten Wurzeln (Hobe *et al.*, 2003;

Stahl *et al.*, 2009). Eine Analyse des WAMs von *cle40-2* ergab eine verzögerte Differenzierung der Kolumellastammzellen, die mit einer lateral verbreiterten *WUSCHEL-related homeobox5* (*WOX5*)-Expression einherging. Die Behandlung von wildtypischen Wurzeln mit CLE40-Peptid führt zu einer distalen Verschiebung und Verbreiterung der *WOX5*-Expressionsdomäne im RZ (Stahl *et al.*, 2009). Diese *CLE40*-induzierte *WOX5*-Repression ist abhängig von der Rezeptorkinase *ARABIDOPSIS CRINKLY4* (*ACR4*), deren Funktionsverlust ebenfalls zu einer erhöhten Kolumellastammzellanzahl führt (De Smet *et al.*, 2008; Stahl *et al.*, 2009). Dieser Kolumellainitialen regulierende *CLE40*/*WOX5*-Signalweg im distalen WAM ist dem SAM-spezifischen *CLV3*/*WUS*-Signalweg ähnlich, jedoch geht das reprimierende Signal in diesem Fall von differenzierten Zellen aus. Das reduzierte Wurzelwachstum von *cle40-2*-Pflanzen kann nicht mit der gestörten Regulation der Kolumellainitialen erklärt werden. René Wink konnte in seiner Diplomarbeit zeigen, dass die kürzere Wurzel auf einer verringerten Zellteilung in der meristematischen Zone zurückzuführen ist. Es ist anzunehmen, dass das proximale WAM ebenfalls durch einen *CLE*-abhängigen Signalweg reguliert wird, an dem *CLV2* und *CRN* beteiligt sind.

Weitere Faktoren, die für die Etablierung des WAM und seine Aufrechterhaltung essentiell sind, sind die Transkriptionsfaktoren *SCARECROW* (*SCR*), *SHORTROOT* (*SHR*) sowie *PLETHORA1* (*PLT1*) und *PLT2* (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2009).

### **1.3 Das Zusammenspiel von Auxin und Cytokinin zur SAM- und WAM-Etablierung**

Für die Etablierung und den Erhalt von pflanzlichen Meristemen sind Auxin und Cytokinin wichtige Pflanzenhormone. Das Verhältnis dieser beiden Substanzen ist hierbei entscheidend für die SAM- oder WAM-Initiation und -Aufrechterhaltung. Sie regulieren sowohl Entwicklungs- als auch zelluläre Prozesse. Ein geringes Auxin/Cytokinin-Verhältnis führt in Kalluskulturen zur Initiierung von SAMs, wohingegen ein hohes Verhältnis zur Bildung von Wurzeln führt (Skoog *et al.*, 1957; Gordon *et al.*, 2007). Die Funktion von Cytokinin im SAM wurde bereits in Abschnitt 1.1.5 beschrieben.

Auxin wird vor allem im oberirdischen Gewebe der Pflanze produziert und anschließend gerichtet transportiert, um Auxinmaxima bzw. -minima zu erzeugen. Entscheidend ist der dadurch erzielte Auxingradient, da Schwellenwerte unterschiedliche Signale auslösen. Das als morphogen wirkende Auxin steuert so verschiedenste pflanzliche Entwicklungsprozesse, wie die Etablierung und Positionierung des RZ (Sabatini *et al.*, 1999; Friml *et al.*, 2002; Blilou *et al.*, 2005). Der gerichtete Auxintransport erfolgt dabei durch polar

lokalisierte Einstromtransporter der AUXIN RESISTENT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX)-Proteinfamilie und die polar lokalisierten Ausstromtransportern der P-Glycoproteine der ABCB (ABCB/PGP)-Proteinfamilie sowie der PIN-FORMED (PIN)-Proteinfamilie. Diffusion spielt hierbei eine untergeordnete Rolle, da durch den höheren pH-Wert in der Zelle das Molekül eine Ladung erhält und somit die Zellmembran nicht mehr durchdringen kann (zusammengefasst in Vanneste *et al.*, 2009). Die Expression der PINs im WAM ist hierbei von Cytokinin abhängig (Ruzicka *et al.*, 2009). Im WAM reguliert Auxin unter anderem die *WOX5*-Expression im RZ. Eine Erhöhung der Auxinkonzentration bewirkt eine Differenzierung der distalen Stammzellen im WAM aufgrund einer Repression von *WOX5*. Eine Auxinreduktion in den Kolumellainitialen hingegen hat eine Vermehrung der Stammzellen zur Folge (Sabatini *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2010). Eine mögliche Kommunikation zwischen der CLE40-abhängigen und der auxinabhängigen Regulation der Kolumellainitialen ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Im Spross kennzeichnen Auxinmaxima die Initiierungsstelle von Primordien. Auxin reguliert über ein Zusammenspiel von Aux/IAA und AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF)-Transkriptionsfaktoren die Expression von zahlreichen Zielgenen (zusammengefasst in Guilfoyle *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Analyse des Stammzellerhalts im SAM von *Arabidopsis thaliana* auf molekularer Ebene. Genetische Analysen, die in dieser Arbeit vervollständigt werden sollen, zeigen eine funktionale Separierung von CLV1 zu CLV2 und CRN. Eine potentielle Trennung auf Proteinebene soll daher analysiert werden.

Die Etablierung eines heterologen Expressionssystems von fluoreszenz-gekoppelten Proteinen wird eine *In-planta*-Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen ermöglichen. Mithilfe dieses Systems soll eine Proteininteraktionsstudie durch Quantifizierung des FRET-Effektes zwischen zwei Fluorophoren etabliert werden. Dies soll durch Messung der Donorfluoreszenzzunahme nach der Fotozerstörung des Akzeptors sowie durch Bestimmung der Donorlebenszeit in FLIM-Experimenten (*Fluorescence Lifetime Image Microscopy*) stattfinden.

Viele Proteine haben Einfluss auf den Stammzellerhalt im SAM und damit auch auf das Gleichgewicht zwischen *CLV3*-Expression und *WUS*-Repression. Durch Expressionsanalysen sowie Interaktionsstudien auf genetischer und molekularer Ebene soll die Interaktion weiterer Faktoren mit den einzelnen Komponenten des CLV-Signalweges analysiert werden.

---

# **KAPITEL 2**

## **MATERIAL UND METHODEN**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben wurden Chemikalien in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: Biozym (Oldendorf), Duschefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen™ (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH® (Deisenhofen).

#### 2.1.2 Puffer und Medien

Wenn nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Puffer, Lösungen und Medien nach den Protokollen aus Ausubel, 1996 angesetzt.

#### 2.1.3 Membran und Papier

Die in dieser Arbeit abgebildeten Western Blot-Analysen wurden mit Roti-PVDF-Membran von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und 3 mm Papier von Whatman (Maidstone, England) durchgeführt.

#### 2.1.4 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen New England BioLabs® (NEB) (Frankfurt) und Invitrogen™ (Karlsruhe) bezogen und gemäß den Herstellerangaben verwendet.

#### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Anmerkung	Firma	Einsatzbedingungen
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Konzentration: 1: 1250 Inkubationszeit: ½ h bei RT
Anti-Maus IgG	ALP	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Konzentration: 1: 1250 Inkubationszeit: ½ h bei RT
Anti-GFP IgG	Maus	Roche (Mannheim, Deutschland)	Konzentration: 1:2000 Inkubationszeit: ½ h bei RT

## 2.1.6 Molekulare Größenstandards

**Tab. 1 Auflistung der molekularen Größenstandards.**

Größenstandard	Bandengrößen	Firma
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10 000 [bp]	Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 [bp]	Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Precision Plus Protein Standards Dual Color	10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 [kDa]	Bio-Rad (München, Deutschland)

## 2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Eurogentec (Köln) bezogen und sind in den Tab. 2-8 gemäß ihrem Verwendungszweck aufgelistet.

**Tab. 2 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung von CRN und dessen Derivaten.**

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')	Klonierungen
AB_Crnattb1_F	AAAAAGCAGGCTCAATGAAGCAAAGAAGAA	pAB46; pAB51; pAB52; pAB85
AB_Crn_attb2_3	AAGAAAGCTGGGTAAAAGCTGTGCAGTTGTGTAAG	pAB37; pAB50; pAB51; pAB52; pAB85; pAB46; pAB48
AB_CRN-Pro.attb1_5	AAAAAGCAGGCTAAAGATGCATAGGCTTGC	pAB36; pAB37
AB_CrnPro.attb2_3	AAGAAAGCTGGGTGCTGCTTCTACGAATAA	pAB36
AB_CrnkinaseGW_5v2	AAAAAGCAGGCTATGAAACAGACGCCAATTCT	pAB48
AB_CLV2+CRN-Fv2	TTAGCTTCGATTTTGGAGTGTAGGTCGTAGCATTGTCAAATTCATGAAA	pAB50
AB_CLV2+CRN-Rv2	TTTCATGAATTTGACAATGCACGACCTAACACTCCAAAATCGAAGCTAA	pAB50
AB_CRN+BAK1TM_F	CCGGCCATTGCACTAGCTGTTCGTAGCATTGTCAAA	pAB51
AB_CRNEC+BAK1TM_R	TCCTCCCGCAATCGCTCCCTTGGAAAGTGATTCTTGA	pAB51
AB-BAK1_TM_F	TCAAGAATCACTTCCAAGGGAGCGATTGCGGGAGGA	pAB51
AB_BAK1_TM_R	TTTGACAATGCTACGAACAGCTAGTGAATGGCCGG	pAB51
AB_CRN_TGW_R	AAAGCTGTGCAGTTGTGT	pAB215; pAB216
AB_CRN_TGW_F	CACCATGAAGCAAAGAAGAAGA	pAB215; pAB216
AB_CRNdelK_GW_R	AAGAAAGCTGGGTGCTACGAACCAAGAAAGC	pAB69
AB_CRNSIG+TM_F	ACAAGCACAAGTACAAGTGTATTGTGATTAGTATC	pAB52
AB_CRN_SIG_R	GATACTAATCACAATAACACTTGTACTTGTGCTTGT	pAB52
AB_Crntransmem_R	AAACTCGAGTTCAGCGTGGAGAGATTTAGGAG	pAB52
AB_CRN_EC1_Rv2	GGATAAGTGTGCAACAGTTGCTGCTGCACAACCTTGTACTT	pAB215
AB_CRN_EC1_Fv2	AAGTACAAGTGTGCAACAGTGTGCTGCTGCACAACCTTATCC	pAB215
AB_CRN_EC2_F	ACACCACTTGAATCAGCAATCACTTCCAAGGTTATTGTGA	pAB216
AB_CRN_EC2_R	TCACAATAACCTTGGAAAGTGTGCTGATTCAAGTGGTGT	pAB216

**Tab. 3 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung von CLV2 und dessen Derivaten.**

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')	Klonierungen
AB-CLV2-GW-R	AAGAAAGCTGGGTAAGCTTTGGTCTGAAGAA	pAB49
AB_CLV2-GW_F	AAAAAGCAGGCTATGATAAAGATTGCAG	pAB49; pAB50
AB_CLV2_Pro_F	CACCAGACACAAGCCCTTTCCATTGTC	pAB160; pAB161
AB_CLV2_Pro_R	CTTTATCATAGCTCAGAGGA	pAB160
AB_CLV2_TGW_R	AGCTTTGGTCTGAAGAATATA	pAB161; pAB203; pAB205
AB_CLV2_TGW_F	CACCATGATAAAGATTGCAGAT	pAB203; pAB204; pAB205
AB_CLV2_del708_R	TGAGCAAAAGATACCTAACA	pAB203
AB_CLV2_RA_R	AGCTTTGGTCTGAAGAATATAACTAGCAGCACGAG	pAB204
AB_CLV2EX_F	GCTGCATCACAAAGCGCAATATATCAAACGCATTGGTG	pAB205
AB_CLV2EX_R	TTGCCGCTTGTGATGCAGCAATGTTTCCGGGGCACACTT	pAB205
AB_CLV2+CRN-Fv2	TTAGCTTCGATTTTGGAGTGTAGGTCGTAGCATTGTCAAATTCATGAAA	pAB50
AB_CLV2+CRN-Rv2	TTTCATGAATTTGACAATGCTACGACCTAACACTCCAAAATCGAAGCTAA	pAB50

**Tab. 4 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung von CLV1 und dessen Derivaten.**

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')	Klonierungen
AB_CLV1_GW_F	AAAAAGCAGGCTAAATGGCGATGAGACTTT	pAB68; pAB120
AB_CLV1_GW_R	AAGAAAGCTGGGTAGAACCGCATCAAGTTCCG	pAB68
AB_CLV1_Pro_F	CACCTTTCCAAGACGGATTTGT	pAB159
AB_CLV1_TGW_R	GAACGCGATCAAGTTCCGCCAC	pAB159
AB_CLV1DelK_GW_R	AAGAAAGCTGGGTGCGAGAACGCTTTCAGATT	pAB120

**Tab. 5 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung potentieller Interaktionspartner und deren Derivaten.**

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')	Klonierungen
AB_BAK1_GW_3'	AGAAAGCTGGGTATCTTGACCCCGAGGGTATT	pAB150
AB_BAK1_GW_5'	AAAAAGCAGGCTTACAATGGAACGAAGATTAATG	pAB150
AB_BAM1_CDS_F	CACCATGAACTTTTTCTTCTCCTTC	pAB162
AB_BAM1_CDS_R	TAGATTGAGTAGATCCGGC	pAB162
AB_BAM1_Pro_F	CACCAATCTGACACCATTAGGT	pAB163
AB_BAM1_Pro_R	CATTGTTTCTCTCTATCTCTCT	pAB163
AB_BAM2_CDS_F	CACCATGAAGCTTCTTCTTCTC	pAB165
AB_BAM2_CDS_R	ATTACTTAAAAGATCCGGTG	pAB165
AttB1v2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Diverse
ATTB2v2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Diverse
AB_POLTGW_F	CACCTGATGGGAAACGGGACTT	pAB173
AB_POLTGW_R	GATTGCCTTAAACGTAGTT	pAB173
AB_KAPP_CDS_F	CACCATGGCGATGATAGGGATGAACATT	pAB174
AB_KAPP_CDS_R	CAGGGAAGTATCGAAATC	pAB174

**Tab. 6 Oligonukleotide zur Klonierung neuer Destination Vektoren.**

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')	Klonierungen
AB_GFP+mCherry_F	GCATGGATGAACTATACAAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	pAB119
AB_GFP+mCherry_R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTTTGTATAGTTCATCCATGC	pAB119
AB_GFP_PvuI_F	AAACGATCGGGATGAGTAAAGGAG	pAB117; pAB119
AB_GFP_PacI_Rv2	AAATTAATTAATTATTTGTATAGTTCATCCA	pAB117
mCherry_PacI_R	AAATTAATTAACTTGTACAGCTCGTCCA	pAB118; pAB119
mCherry_PvuI_F	AAACGATCGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT	pAB118
AB-H2B_PvuI_F	AAACGATCGCAATGGCGAAGGCAGATA	pAB146; pAB147; pAB149
AB_H2B_PacI_R	AAATTAATTAAGAAGCTCGTAAACTTCGTAAACCG	pAB146; pAB147; pAB149
AB_mod.pMDC7_F	CCTTAATTAAGTAGTCGATCCAGGCC	pAB111
AB_modpMDC7_R	AATTATCAACCACTTTGTACAAGAAAGC	pAB111
YFP_PacI_R	AAATTAATTAACTTGTACAGCTCGTCCA	pAB114; pAB116
YFP_PvuI_F	AAACGATCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	pAB114; pAB116

**Tab. 7 Liste der Oligonukleotide, die für Sequenzierungen verwendet wurden.**

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')
AB_BAK1_seq1_F	TGCCAACACCAAGTTGACTC
AB_BAK1_seq2_F	GTATTGCGTTGGGATCTGCA
AB_BAM1Proseq1_F	GTTATCTTTTTGGTGAGTAAA
AB_BAM1Proseq2_F	GGGTGTTTTCGTCTTTTCGA
AB_BAM1seq1_F	GATCGGAAATCTATCGGAGC
AB_BAM1seq2_F	GCTTCAGCAGCTCTCGAAGA
AB_BAM2Proseq1_F	AAGTTCGAGATATGCTAA
AB_BAM2Proseq2_F	CTGACTTACTTCCACTAATCAAAAG
AB_BAM2seq1_F	TGAAAATGGTCTTCCACCGG
AB_BAM2seq2_F	CTCTGGTTCGATTCCTCCCG
AB_CLV1_seqP1_F	AGAAACGGGAACGTCGTCGT
AB_CLV1_seqP2_F	CGTAGTGTTGATATTAGGACAAATC
AB_CLV1seq1	AATGGTAACCTTACTGGAAC
AB_CLV1seq2	CGAGTTAAGTAACCTGAAAC
AB_CLV1seq3	ACTTCTTCTTTGGTCCAATT
AB_CLV1seq4	ACTTTAATCTCCGTCGATCT
AB_CLV1seq5	GAATAAGAAGAAGAACCAGA
AB_KAPPseq1_F	GGGTATGGGACGTGGTAAG
AB_Polseq1_F	CTAGGGTTTCTGGGCTGTT
AB_Polseq2_F	AGAAGATAGTGGAGTCATCG
AB_RPK2PROseq1_F	TTATGTATAGTGGCAGGCCA
AB_RPK2seq1_F	AAATCACTAGGCTTCCGAAA
AB_RPK2seq2_F	TCAGATACCGGGTAGCCTCG
AB_T3A_R	AACTGATGCATTGAACTTGA
ccdB Gen F	GCCGTTATCGTCTGTTT
AB_mCherry_R	AAAGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCA
CLV2.1	GAAACATTCCTTCTTGCTTC
CLV2.2	TTTCCGGTACGCTACCTTGT
CLV2.3	CGTCTCTCTCACAATCTTTT
CLV2.4	AGTATCTTTCTCTTGCCCGG
SeqL1	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
SeqL2	GTAACATCAGAGATTTTGTAGACAC

**Tab. 8** Liste der Oligonukleotide, die zur Genotypisierung von Pflanzenlinien verwendet wurden

Oligonukleotide	Sequenzen (5'→3')
AB_CLV1_R	AGATTGATGAAGCTTTGAGG
Ds59-1a	ACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC
RM_C_4	TAGGAGAAAACACCACTGGACC
RM_C_5	TATGTAAGCTTTGAACAGCTTCA
RM_C_7	TGATGAATAAAGTTAGAACGAAAGAGGT
CRN_TillingP1b_R	ATGCTTCTCGTGCTTCCC
RM_CAPS_clv2-1_3	CTCTGAATATCAATAAAGAAGCTTTGTCAT
RM_CAPS_clv2-1_5	GATTGCAGATTTCACTCTCTT
rpk2-1 T-DNA LP	CAACGAAGAGCAATTTCCAAG
rpk2-1 T-DNA RP	GATCTTTTGCTCGTCAATTGC
rpk2-4+rpk2-5 F	TGGCCACTACAAAACGAGAA
rpk2-4+rpk2-5 R	GACGGATCAAGTGCTTTCTT
LBB1V2	AAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCT

### 2.1.8 Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana*

In der Tab. 9 sind die Primer und die verwendete Methode zum Nachweis von Pflanzenlinien aufgelistet.

**Tab. 9** Methode zur Genotypisierung von Pflanzenlinien.

Pflanzenlinie	Primer	Genotypisierung	Fragment [bp]
<i>crn-1</i>	RM_C_4 + RM_C_5	CAPS (Hyp188I)	WT: 363 + 41; Mut.: 251 + 112 + 41
<i>crn-3</i>	RM_C_7 + CRN TillingP1b_R	CAPS (MseI)	WT 295 + 108 + 106 Mut: 251 + 108 + 106 + 43
<i>clv1-11</i>	clv1seq1+AB_CLV1_R+DS591a	PCR	WT: 550 Mut.: 480
<i>clv2-1</i>	RM_CAPS_clv2-1_3+ RM_CAPS_clv2-1_5	CAPS (NdeI)	WT 119; Mut.: 88 +31
<i>rpk2-1</i>	rpk2-1 T-DNA LP+ rpk2-1 T-DNA RP* LBB1V2	PCR	WT: 1000 Mut.: 600
<i>rpk2-4</i>	rpk2-4+rpk2-5 F+ rpk2-4+rpk2-5 R	Sequenzierung	Punktmutation G2656A

### 2.1.9 Vektoren

Die in der Tab. 10 aufgeführten Ausgangsvektoren wurden für Gateway®-Klonierungen sowie zur Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen und *N. benthamiana* Blättern verwendet. Vektorkarten für die verwendeten Ausgangsvektoren befinden sich im Anhang.

**Tab. 10** Liste von Ausgangsvektoren.

Vektor	Verwendungszweck	Herkunft
pDONR™201	Eingangsvektor	Invitrogen™
pENTR™/D-TOPO®	Eingangsvektor	Invitrogen™
pMDC7	Zielvektor	Curtis <i>et al.</i> , 2003
pMDC83	Zielvektor	Curtis <i>et al.</i> , 2003
pMDC99	Zielvektor	Curtis <i>et al.</i> , 2003
pMDC162	Zielvektor	Curtis <i>et al.</i> , 2003
pEXCSHis-H	Zielvektor	Ralph Panstruga; MPI Köln
pMS01	Eingangsvektor	Marianna Sarri; Diplomarbeit
pMS02	Eingangsvektor	Marianna Sarri; Diplomarbeit

### 2.1.10 Bakterienstämme

Die in Tab. 11 aufgelisteten *E. coli* Stämme wurden für die Klonierung und Amplifikation von Plasmiden verwendet. Die aufgelisteten *Agrobacterium tumefaciens* Stämme dienten zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* und zur transienten Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern.

**Tab. 11** Genotyp der verwendeten Bakterienstämme.

#### *E. coli* Stämme

DB3.1	F– <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB–, mB–) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ– leu mtl1</i>
DH5α	F– Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>

#### *Agrobacterium tumefaciens* Stämme

GV3101 (pMP90)	<i>C58C1, pMK90, Rif<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup></i> , (Koncz, 1986)
GV3101 (pMP90RK)	<i>C58C1, pMK90RK, Rif<sup>r</sup>, Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup></i> (Koncz, 1986)

### 2.1.11 Pflanzenlinien

In der Tab. 12 und 13 sind die Informationen von verwendeten Pflanzenlinien zusammengefasst.

**Tab. 12** Liste der in dieser Arbeit verwendeten mutanten Pflanzenlinien.

<b>Genotyp</b>	<b>Ökotyp</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Kommentar</b>
Col-0		Renate Schmidt	Wildtyp
Ler-0		NASC: N24238	Wildtyp
<i>clv2-1</i>	Ler-0	Koornneef <i>et al.</i> , 1983	EMS; AS Q33Stop
<i>clv2-gabi</i>	Col-0	NASC: GK-686A09	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>crn-1</i>	Ler	Müller <i>et al.</i> , 2008	EMS; AS G70A
<i>crn-3</i>	Col-0	Till <i>et al.</i> , 2003	EMS; AS Q296Stop
<i>clv1-11</i>	Ler	Dievart <i>et al.</i> , 2003a	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>clv1-sail</i>	Col-0	NASC: SAIL_802_C08	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>clv1-salk</i>	Col-0	NASC: SALK_008670	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>clv1-wis</i>	Col-2	NASC: WiscDsLox489-492B1	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>clv3-9</i>	Col <i>er -/-</i>	Tillingallel	EMS; AS W62Stop
<i>rpk2-1</i>	Col	H. Fukuda SALK_062412.51.15	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>rpk2-2</i>	Col	H. Fukuda SALK_039514.41.15	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>rpk2-3</i>	Wis	H. Fukuda	T-DNA Insertion, putatives Nullallel
<i>rpk2-4</i>	Col	H. Fukuda	EMS

**Tab. 13** Liste der in dieser Arbeit hergestellten transgenen *Arabidopsis*-Linien.

<b>Genotyp</b>	<b>Ökotyp</b>	<b>Nr.</b>	<b>Linie</b>
<i>CRN::CRN-GFP</i>	<i>crn-1</i>	145	L1
<i>CRN::mCherry-H2B</i>	Col	191	L4
<i>CRN::GUS</i>	<i>Ler</i>	59	L2
<i>iCRN-GFP</i>	<i>crn-1</i>	123	
<i>iCRN-mCherry</i>	<i>crn-1</i>	106	
<i>CLV1::CLV1-GFP</i>	<i>clv1-11</i>	211	
<i>CLV1::CLV1-mCherry</i>	<i>clv1-11</i>	212	
<i>iCLV1-GFP</i>	<i>clv1-11</i>	124	
<i>iCLV1-mCherry</i>	<i>clv1-11</i>	107	
<i>CLV2::CLV2-GFP</i>	<i>clv2-1</i>	213	
<i>CLV2::CLV2-mCherry</i>	<i>clv2-1</i>	214	
<i>CLV2::mCherry-H2B</i>	Col	183	L9
<i>iCLV2-GFP</i>	<i>clv2-1</i>	125	
<i>iCLV2-mCherry</i>	<i>clv2-1</i>	97	
<i>BAM1::Cerulean-H2B</i>	Col	194	L4

### 2.1.12 Gen-Annotationen

Die NCBI und *Arabidopsis* spezifische Gen-Annotationsnummern sind in der Tab. 14 aufgelistet.

**Tab. 14** Gen-Annotationsliste

<b>Gen</b>	<b>TAIR Nr.</b>	<b>NCBI Nr</b>
CORYNE (CRN)	AT5G13290	NM_180481
CLAVATA2 (CLV2)	AT1G65380	NM_105212
CLAVATA1 (CLV1)	AT1G75820	NM_106232
BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE (BAK1)	AT4G33430	NM_119497
BARELY ANY MERISTEM1 (BAM1)	AT5G65700	NM_125967
BARELY ANY MERISTEM2 (BAM2)	AT3G49670	NM114827
POLTERGEIST (POL)	AT2G46920	NM_180133
KINASE ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE (KAPP)	AT5G19280	NM_121933

### 2.1.13 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken sowie Verfahren zur elektronischen Datenverarbeitung

Konfokale Bilder und FRET-Messungen durch Fotozerstörung des Akzeptors (APB) wurden mit einem LSM 510 META<sup>MK</sup> aufgenommen und mit beigefügten Programmen bearbeitet. FLIM Daten wurden mit dem Programm *Marcelle* ausgewertet, das mir von dem Institut für Physikalische Chemie II zur Verfügung gestellt wurde. Die Bildbearbeitung und Erstellung von Kollagen erfolgte mit Adobe Photoshop CS4. Daten- und Textverarbeitung erfolgte mit den Microsoft Programmen Word und Excel sowie OriginLab. Für die Varianzanalyse der statistischen Daten wurde der Student T-Test angewendet. Das Literaturverzeichnis wurde mithilfe von EndNoteX2 erstellt. DNA und Proteinsequenzen wurden mittels des Programms Vektor NTI von Invitrogen<sup>TM</sup> sowie den folgenden Onlineprogrammen analysiert und verarbeitet.

SignalP 3.0: <http://www.cbs.dtu.dk> (Signalpeptidanalyse)

Blast: <http://www.ncbi.nlm.gov/>

PortParam. <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html> (pI Berechnung)

SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/> (Identifikation von Proteindomänen)

TMHMM: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0> (Identifikation von Transmembran-domänen)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Pflanzenarbeit

#### 2.2.1.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf Erde oder sterilen GM-Platten in einer Phytokammer bei Dauerlicht und 21°C. *Nicotiana benthamiana* wurde im Gewächshaus unter kontrollierten Wachstumsbedingungen angezogen.

#### 2.2.1.2 Transformation von *A. thaliana*

Die Erzeugung von stabilen transgenen *Arabidopsis*-Linien erfolgte mittels der ‚Floral Dip‘ Methode, beschrieben in Clough *et al.*, 1998.

#### 2.2.1.3 Isolierung transgener *A. thaliana* Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten T-DNAs vermitteln eine Resistenz gegenüber Hygromycin B, welches für die Isolation transgener *Arabidopsis*-Linien verwendet wurde.

#### **2.2.1.4 Indirekte Bestimmung der SAM Größe durch zählen der Karpellanzahl pro Blüte**

Für dieses Experiment wurden homozygote Pflanzen unter den in Abschnitt 2.2.1.1 erläuterten Wachstumsbedingungen für ca. 6 Wochen angezogen. Zur Bestimmung der Karpellanzahl wurden die ersten 10 Schoten pro Pflanze analysiert. Beim Auftreten des als „valveless“ bezeichneten Phänotyps wurden nur die Blüten ausgezählt dessen Valves mindestens 1/3 der Pistille bedecken.

#### **2.2.1.5 Transiente Transformation von *N. benthamiana* Blättern**

Junges Blattgewebe von 4 - 5 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen konnte durch Infiltration einer Agrobakteriumsuspension transformiert werden. Entsprechende, sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindende Kulturen, wurden in Infiltrationsmedium (5 % (w/v) Saccharose; 0,01 % (w/v) Glucose; 0,01 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>; 450 µM Acetosyringon; 0,01 % (v/v) Silwet L77) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,3 für jedes zu exprimierende Transgen für 1 h auf Eis inkubiert und in das Blattgewebe mit Hilfe einer Spritze infiltriert. Für eine verbesserte Genexpression wurde das „Gene silencing“ durch die Koinfiltration des Viralen Repressors p19 inhibiert (Voinnet et al., 2003). Die Analyse der Transgenexpression erfolgte 2-4 Tage nach Infiltration.

#### **2.2.1.6 Induktion der Transgenexpression**

Bei Verwendung des β-Estradiol-induzierbaren CaMV35S-Promoters (-46 35S) wurden die Pflanzen, seien es *N. benthamiana*-Blätter oder *Arabidopsis thaliana*, mit 20 µM β-Estradiol /0.1% Tween 20 eingesprüht oder bestrichen. Das chimäre XVE Protein besteht aus der DNA Bindedomäne des bakteriellen LexA Repressors, der Transaktivierungsdomäne des viralen VP16 sowie der regulatorischen Domäne des menschlichen Estrogenrezeptors. XVE wird in Anwesenheit von β-Estradiol in den Kern transportiert, wo es an den -46 35S Promoter bindet und die Expression des Zielgens bewirkt (Zuo et al., 2000)

#### **2.2.1.7 β-Glukuronidase Färbereaktion zum Nachweis gewebespezifischer Expression**

Als Expressionsreporter wird hier die enzymatische Aktivität der β-Glukuronidase nachgewiesen. Als Substrat wird das Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Glucuronsäure (X-Gluc) verwendet, das in Anwesenheit von Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff umgesetzt wird, der sich in der Zelle niederschlägt. Die *In-situ*-Färbereaktion fand nach einem modifizierten Protokoll statt (Sieburth et al., 1997).

Färbelösung: 10 mM X-Gluc; 50 mM NaPO<sub>4</sub>; 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 DNA-Isolierung aus *A. thaliana***

Genomische DNA wurde gemäß einem modifizierten Protokoll von Dellaporta aus *Arabidopsis*-Blättern gewonnen (Dellaporta, 1983).

### **2.2.2.2 RNA-Isolierung *A. thaliana***

Aus Pflanzengewebe wurde die Gesamt-RNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Hilden) isoliert.

### **2.2.2.3 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese aus isolierter RNA wurde SuperScriptII von Invitrogen™ gemäß den Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden das QIAprep Spin Miniprep oder das QIAGEN Plasmid Midi Kit von Qiagen (Hilden) verwendet.

### **2.2.2.5 Proteinisolation aus Pflanzen**

50 mg Blattgewebe wurden mittels Precellys-Homogenisators (Peqlab, Erlangen) in 750 µl Extraktionspuffer (0,1 M Tris-HCl pH 8,3; 0,5 M NaCl; 5 mM DTT; 5 mM EDTA, Proteaseinhibitor Cocktail für Pflanzen (SIGMA-ALDRICH®)) zerkleinert und für 1 h bei 4°C solubilisiert. Nach dem Versetzen des Proteinextraktes mit entsprechenden Mengen 6X SDS-Ladepuffers (0,3 M Tris-HCl pH6,8; 10 % (w/v) SDS; 30 % (v/v) Glycerin; 0,6 M DTT; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) erfolgte eine zehn minütige Denaturierung bei 94°C und die Auftrennung in einer SDS-PAGE.

### **2.2.2.6 Western Blot-Analyse**

Alle Western Blot-Analysen wurde gemäß Ausubel, 1996 in einem Semi-Dry Blotter durchgeführt.

### **2.2.2.7 Klonierungsmethoden**

Alle angewandten Klonierungsmethoden wie Restriktion, Dephosphorylierung, Ligation oder Gateway® Rekombinationen wurden gemäß den Herstellerangaben der verwendeten Enzyme durchgeführt.

### 2.2.3 Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

Im Folgenden sind die Klonierungsschritte für die in dieser Arbeit erstellten Vektoren aufgelistet. Entsprechende Vektorkarten befinden sich im Anhang.

#### 2.2.3.1 Erstellung Gateway®-kompatibler Zielvektoren (ZV)

##### **piGW-ORF (pAB111)**

Jianru Zuo etablierte ein Estradiol induzierbares Expressionssystem, das durch Marc Curtis Gateway® kompatibel gemacht wurde (Zuo *et al.*, 2000; Curtis *et al.*, 2003). Dieser Zielvektor (pMDC7) hat kein offenes Leseraster hinter der attR2 Rekombinationsstelle. Mittels PCR wurde die Base C vor der unikalen *PacI* Schnittstelle eingefügt, wodurch kodierende Sequenzen für die Erzeugung von Fusionsproteinen eingefügt werden können.

##### ***piGW-Venus (pAB114), piGW-Cerulean (pAB116), piGW-GFP (pAB117), piGW-mCherry (pAB118) und piGW-GFP-mCherry (pAB119)***

Über die unikale *PacI* Schnittstelle des pAB111 wurden die kodierenden Sequenzen von Cerulean (Rizzo *et al.*, 2004), Venus (Nagai *et al.*, 2002), GFP(S65T) (Heim *et al.*, 1995), mCherry (Shaner *et al.*, 2004) oder eines GFP(S65T)-mCherry Fusionsproteins im Leseraster der Gatewaykassette (Kassette B) eingefügt. Hierzu wurden die Fragmente mittels PCR amplifiziert, wobei am 5' Ende eine *PvuI* Schnittstelle und am 3' Ende eine *PacI* Schnittstelle angefügt wurde. Durch die Restriktion von *PacI* und *PvuI* werden identische Überhänge erzeugt, wodurch nach Ligation mit dem pAB111, die 5' vom Fluorophor gelegene *PacI* Schnittstelle zerstört wird. Diese Zielvektoren dienen zur kontrollierten Expression von Fluoreszenzproteinen in heterologen und homologen Expressionssystemen.

##### ***pGW-Venus (pAB130), pGW-Cerulean (pAB131), pGW-GFP (pAB132) und pGW-mCherry (pAB133)***

Die Gatewaykassette, der kodierende Bereich der Fluoreszenzproteine und der T3A Terminator wurden mittels der Restriktionsschnittstellen *AscI* und *SacI* aus *pAB114*, *pAB116*, *pAB117* und *pAB118* in den *pMDC99* umgesetzt. Diese Zielvektoren wurden für Expressions- und Lokalisationsstudien in *Arabidopsis* eingesetzt.

**pGW-Venus-H2B (pAB146), pGW-Cerulean-H2B (pAB147) und pGW-mCherryH2B(pAB149)**

Über die unikale *PacI* Schnittstell des pAB130, pAB131 und pAB133 wurde die kodierende Sequenz des Histons H2B eingefügt. Diese Zielvektoren dienten zur Analyse von gewebsspezifischen Promotoraktivitäten in *Arabidopsis*.

### 2.2.3.2 Eingangsvektoren (EV)

Im Folgenden werden alle in dieser Arbeit hergestellten Eingangsvektoren (EV) aufgelistet (Tab. 15-17). Als Referenzpunkt in einem Gen wurde der Translationsstart gewählt. Die in pDONR<sup>TM</sup>201 inserierte DNA wurde mittels PCR mit attB Rekombinationsschnittstellen versehen und durch eine BP-Reaktion (Invitrogen<sup>TM</sup>) in den Vektor rekombiniert. pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> Klonierungen erfolgten nach Herstellerangaben. Alle proteinkodierenden Bereiche wurden im Leseraster der Kassette B und ohne Stopcodon kloniert. Deletionen, Fusionen oder Mutationen wurden mittels PCR eingefügt. Die Sequenzen und Namen der verwendeten Oligonukleotide sind dem Abschnitt 2.1.7 zu entnehmen.

**Tab. 15 Liste von CRN Eingangsvektoren.**

	Nr.	Vektorrückgrad	Fragment [bp]	Kommentar
CRN Derivate				
<i>CRN (CDS)</i>	pAB85	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 1204 (cDNA)	
<i>CRN Promotor</i>	pAB36	pDONR <sup>TM</sup> 201	-1707 - -1	
<i>CRN::<i>CRN</i></i>	pAB37	pDONR <sup>TM</sup> 201	-1707 - 1289	Promotor und CDS von CRN
<i>crn-1 (CDS)</i>	pAB46	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 – 1289	
<i>CR(ASP-TM)</i>	pAB48	pDONR <sup>TM</sup> 201	273 - 1289	Amplifikation der Kinasedomäne
<i>CRAEZD</i>	pAB52	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 60 + 183 - 1289	Deletion der EZD von CRN
<i>CRAEZD1</i>	pAB215	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 108 + 136 - 1204 (cDNA)	Deletion eines Teils der EZD
<i>CRAEZD2</i>	pAB216	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 132 + 175 - 1204 (cDNA)	Deletion eines Teils der EZD
<i>CR(&lt;&gt;BITM)</i>	pAB51	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 213 CRN + 673 - 771 BAK1 + 255 - 1289 CRN	Austausch der TMD gegen die TMD von BAK1
<i>CRAKi</i>	pAB69	pDONR <sup>TM</sup> 201		Deletion der Kinasedomäne

**Tab. 16** Liste Eingangsvektoren die CLV1 und dessen Derivate oder CLV2 und des Derivate enthalten.

	<b>Nr.</b>	<b>Vektorrückgrad</b>	<b>Fragment [bp]</b>	<b>Kommentar</b>
CLV1 Derivate				
<i>CLV1 (CDS)</i>	pAB68	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 2938	
<i>CLV1::CLV1</i>	pAB159	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	-3087 - 2938	
<i>CLV1Ki</i>	pAB120	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 2067	Deletion der Kinasedomäne
CLV2 Derivate				
<i>CLV2 (CDS)</i>	pAB49	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 2160	
<i>CLV2 Promotor</i>	pAB160	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	-1252 - 9	
<i>CLV2::CLV2</i>	pAB161	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	-1252 - 2160	
<i>C2A708</i>	pAB203	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 2124	Deletion der AS 708-720
<i>C2(R710A)</i>	pAB204	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	C2134G	AS-Austausch
<i>C2n</i>	pAB205	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	A1991C A2006C A2018C A2021C A2036C	Austausch der AS D(664), D(670), E(673), E(674), E(679) gegen ein A
<i>C2-CR</i>	pAB50	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 2111 CLV2 + 255 - 1289 CRN	Fusion der Kinasedomäne von CRN an CLV2

**Tab. 17** Liste zusätzlicher Eingangvektoren.

	<b>Nr.</b>	<b>Vektorrückgrad</b>	<b>Fragment [bp]</b>
CLV1 Homologe			
<i>BAM1 (CDS)</i>	pAB162	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 3117
<i>BAM1 Promotor</i>	pAB163	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	-3042 - 3
<i>BAM2 (CDS)</i>	pAB165	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 3006
CLV2 Homologe			
<i>AtRLP2 (CDS)</i>	pAB219	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 2202
<i>AtRLP30 (CDS)</i>	pAB221	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 2358
<i>AtRLP38 (CDS)</i>	pAB222	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 2352
Sonstiges			
<i>BAK1 (CDS)</i>	pAB150	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 1845
<i>KAPP (CDS)</i>	pAB174	pDONR <sup>TM</sup> 201	1 - 1743 cDNA
<i>POL (CDS)</i>	pAB173	pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	1 - 2568

### 2.2.3.3 Expressionsvektoren

Im Folgenden sind alle erzeugten Expressionsvektoren aufgelistet und die Gateway®-Reaktion die zu diesem Plasmid geführt hat (Tab. 18-21).

**Tab. 18** Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung der induzierbaren Expressionsvektoren von CRN, CLV2 und CLV1 Derivaten.

Name	Nr.	LR (ZV/EV)
<i>piCRN</i>	pAB196	pMDC7/pAB85
<i>piCRN-GFP</i>	pAB123	pAB117/pAB85
<i>piCRN-mCherry</i>	pAB106	pAB118/pAB85
<i>piCRN-G-C</i>	pAB122	pAB119/pAB85
<i>picrn-1-GFP</i>	pAB135	pAB117/pAB46
<i>piCR(<math>\Delta</math>SP-TM)-GFP</i>	pAB136	pAB117/pAB48
<i>piCR<math>\Delta</math>EZ-GFP</i>	pAB138	pAB117/pAB52
<i>piCR<math>\Delta</math>EZ1-GFP</i>	pAB223	pAB117/pAB215
<i>piCR<math>\Delta</math>EZ2-GFP</i>	pAB224	pAB117/pAB216
<i>piCR(TM&gt;B1)-GFP</i>	pAB137	pAB117/pAB51
<i>piCR<math>\Delta</math>Ki-GFP</i>	pAB172	pAB117/pAB69
<i>piCR<math>\Delta</math>Ki-mCherry</i>	pAB128	pAB118/pAB69
<i>piCLV1-GFP</i>	pAB124	pAB117/pAB68
<i>piCLV1-mCherry</i>	pAB107	pAB118/pAB68
<i>piCLV1-GFP-mCherry</i>	pAB126	pAB119/pAB68
<i>piC1<math>\Delta</math>Ki-GFP</i>	pAB129	pAB117/pAB120
<i>piCLV2</i>	pAB198	pMDC7/pAB49
<i>piCLV2-GFP</i>	pAB125	pAB117/pAB49
<i>piCLV2-mCherry</i>	pAB97	pAB118/pAB49
<i>piCLV2-GFP-mCherry</i>	pAB127	pAB119/pAB49
<i>piC2<math>\Delta</math>708-GFP</i>	pAB207	pAB117/pAB203
<i>piC2-CR-GFP</i>	pAB192	pAB117/pAB50
<i>piC2(R&gt;A)-GFP</i>	pAB208	pAB117/pAB204
<i>piC2n-GFP</i>	pAB209	pAB117/pAB205

**Tab. 19** Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung von weiteren induzierbaren Expressionsvektoren.

Name	Nr.	LR (ZV/EV)
<i>piBAM1-GFP</i>	pAB176	pAB117/pAB162
<i>piBAM1-mCherry</i>	pAB193	pAB118/pAB162
<i>piBAM2-GFP</i>	pAB177	pAb117/pAB165
<i>piBAM2-mCherry</i>	pAB195	pAB118/pAB165
<i>piKAPP-GFP</i>	pAB180	pAB117/pAB174
<i>piPOL-GFP</i>	pAB179	pAB117/pAB173
<i>piRLP2-GFP</i>	pAB227	pAB117/pAB219
<i>piRLP30-GFP</i>	pAB229	pAB117/pAB221
<i>piRLP38-GFP</i>	pAB230	pAB117/pAB222
<i>piBAK1-GFP</i>	pAB152	pAB117/pAB150
<i>piBAK1-mCherry</i>	pAB153	pAB118/pAB150
<i>piRPK2-GFP</i>	pAB175	pAB117/pAB156

**Tab. 20** Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung konstitutiver Expressionsvektoren.

Name	Nr.	LR (ZV/EV)
<i>p35S::CRN-GFP</i>	pAB86	pMDC83/pAB85
<i>p35S::CRN-mCherry</i>	pAB99	pEXCSHis-H/pAB85
<i>p35S::CLV1-GFP</i>	pAB74	pMDC83/pAB68
<i>p35S::CLV1-mCherry</i>	pAB101	pEXCSHis-H/pAB68
<i>p35S::CLV2-GFP</i>	pAB55	pMDC83/pAB49
<i>p35S::CLV2-mCherry</i>	pAB100	pEXCSHis-H/pAB49

**Tab. 21** Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung der Vektoren für die Proteinexpressions- und Proteinlokalisationsanalyse.

Name	Nr.	LR (ZV/EV.)
<i>pCRN::CRN-GFP</i>	pAB145	pAB132/pAB37
<i>pCRN::GUS</i>	pAB59	pMDC162/pAB36
<i>pCRN::mCherry-H2B</i>	pAB191	pAB149/pAB36
<i>pCLV1::CLV1-GFP</i>	pAB211	pAB132/pAB159
<i>pCLV1::CLV1-mCherry</i>	pAB212	pAB133/pAB159
<i>pCLV2::CLV2-GFP</i>	pAB213	pAB132/pAB161
<i>pCLV2::CLV2-mCherry</i>	pAB214	pAB133/pAB161
<i>pCLV2::mCherry-H2B</i>	pAB183	pAB149/pAB160
<i>pBAM1::Cerulean-H2B</i>	pAB194	pAB147/pAB163
<i>pRPK2::VENUS-H2B</i>	pAB231	pAB146/pAB155

### 2.2.3.4 DNA-Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von GATC Biotech (Konstanz) nach der Sanger Methode durchgeführt.

## 2.2.4 Mikroskopie

### 2.2.4.1 Durchlichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einer *Axiocam* montiert auf einem *Axioskop* von Zeiss aufgenommen und mit dem Programm *Axio Vision* (Zeiss) bearbeitet. Zur Aufnahme der mCherry-Fluoreszenz wurde eine HBO 100 und der Filterwürfel Cy3HC (BP 605/70) von AHF (Tübingen) verwendet.

### 2.2.4.2 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Fluoreszenzbilder wurden mit dem LSM 510 META<sup>MK4</sup> (Zeiss) oder dem FluoView<sup>TM</sup>FV1000 (Olympus) sequenziell aufgenommen. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Anregungswellenlängen und Absorptionsspektren aufgelistet.

**Tab. 22 Exzitations- und Emissionseinstellungen für die konfokale Mikroskopie**

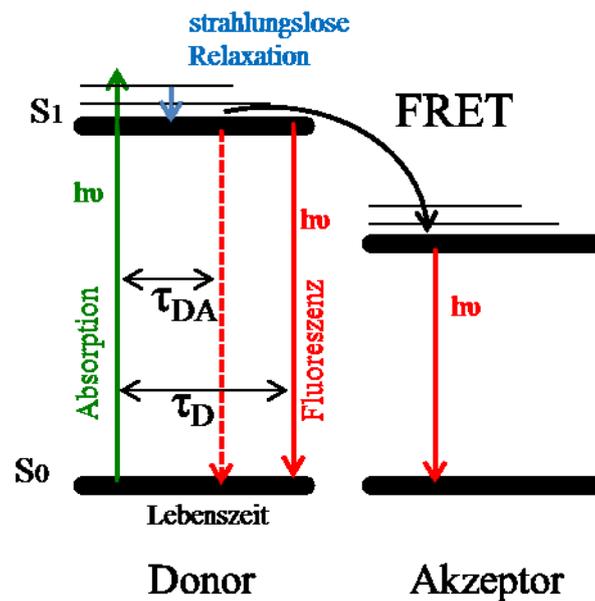
FP	Exzitation	Emission
<b>Cerulean</b>	405 nm Diode	BP 480 nm – 520 nm
<b>GFP</b>	488 nm Argonlaser	Metakanal 496 nm – 550 nm
<b>mCherry</b>	561 nm Diode	Metakanal 571 nm – 636 nm in Blättern LP 575 nm in der Wurzel

## 2.3 Interaktionsstudien mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Fluoreszierende Moleküle, Farbstoffe oder Proteine haben häufig delokalisierte Elektronen in aromatischen Ringstrukturen, die in der Lage sind, Photonenenergie aufzunehmen und diese als Fluoreszenz wieder abzugeben. Dieser Übergang der Elektronen in die unterschiedlichen Energiezustände wird durch das Jablonski-Diagramm beschrieben (Abb. 3).

Durch Absorption von Photonen der (Anregungs-)Wellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$  werden Elektronen aus dem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) gebracht. Beim Übergang zurück in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Fluoreszenz mit der Wellenlänge  $\lambda_{\text{em}}$  emittiert. Hierbei ist aufgrund interner strahlungsloser Relaxierung die

Wellenlänge des emittierten Photons gegenüber dem absorbierten rotverschoben (Stokes-Verschiebung). Die Stokes-Verschiebung rührt hauptsächlich von Übergängen zwischen Schwingungsniveaus innerhalb eines „Hauptzustands“ her. Prozesse, die zu einer Quantenausbeute kleiner eins führen, beeinflussen dagegen die Übergänge zwischen den Hauptniveaus. Nicht jedes absorbierte Photon wird wieder als Fluoreszenz emittiert. Übergänge in den Triplettzustand und chemische Reaktionen bis hin zur irreversiblen Fotozerstörung sind Beispiele für Konkurrenzprozesse. Das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen eines Fluorophors wird als Fluoreszenzquantenausbeute bezeichnet und gibt Aufschluss über dessen Helligkeit und Stabilität.



**Abb. 3 Vereinfachtes Jablonski-Diagramm**

$S_0$ : Singulettgrundzustand,  $S_1$  erster angeregter Singulettzustand,  $\tau_{DA}$ : Donorlebenszeit, wenn FRET stattfindet,  $\tau_D$ : Donorlebenszeit, wenn kein FRET stattfindet

Die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  ist ein Maß für die durchschnittliche Verweildauer des Moleküls im angeregten Zustand und beträgt wenige Nanosekunden. Im Falle von GFP lässt sich der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzemission nach Anregung in guter Näherung mit einer monoexponentiellen Zerfallskurve, beschreiben.

$$F(t) = F(0) * e^{-\frac{t}{\tau_0}}$$

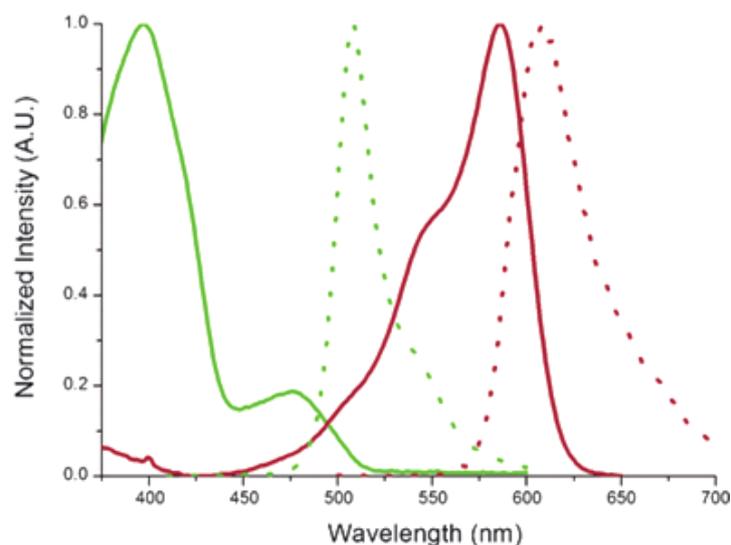
$F(0)$  stellt hierbei die Amplitude zum Zeitpunkt  $t=0$  dar (Swedlow *et al.*, 2009).

Prozesse wie die strahlungslose Energieübertragung auf andere Moleküle führen zu einer verkürzten Lebenszeit im angeregten Zustand. In diesem Fall und insbesondere bei Gemischen aus unterschiedlichen Lebenszeitpopulationen kann die Fluoreszenzabklingkurve durch einen multiexponentiellen Zerfall beschrieben werden.

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet eine strahlungslose Energieübertragung (Dipol-Dipol-Wechselwirkung) zwischen zwei Fluorophoren (unterschiedlicher Sorte). Hierbei emittiert der angeregte Fluorophor, Donor genannt, keine Fluoreszenz, sondern überträgt beim Übergang in den Grundzustand seine Energie auf ein anderes Farbstoffmolekül, den Akzeptor, der dann seine charakteristische Fluoreszenz emittiert. Dieser Prozess wurde als erstes von Theodor Förster beschrieben und wird daher auch häufig als Förster-Resonanz-Energie-Transfer bezeichnet (Förster, 1948). Voraussetzungen für diesen Energietransfer sind die hohe Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, die Überlappung von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum des Donors und Akzeptors, die räumliche Nähe der beiden Fluorophore ( $< 10$  nm) und die Orientierung der Fluorophordipolmomente zueinander.

Den Abstand, bei dem 50 % der Donorenergie auf den Akzeptor übertragen wird, bezeichnet man als Försterradius ( $R_0$ ) und er beträgt bei dem hier verwendeten FRET-Paar (GFP als Donor und mCherry als Akzeptor) 5.1 nm (Albertazzi *et al.*, 2009). Die FRET-Transferrate ( $k_{\text{FRET}}$ ) lässt sich daher als Funktion des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor beschreiben ( $R_{\text{DA}}$ ) und ist mit der 6. Potenz abhängig vom Abstand der interagierenden Fluorophore. Durch diese starke Abhängigkeit der Energietransfereffizienz vom Abstand der Fluorophore führen schon geringe Abstandsänderungen zu einer messbaren Veränderung im FRET.

Die überlappenden Absorptions- und Emissionsspektren von GFP und mCherry sind in Abb. 4 dargestellt.



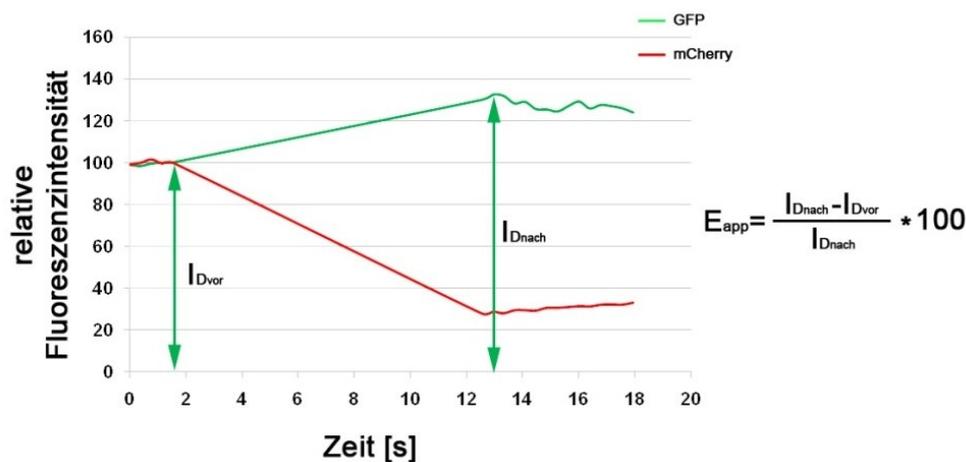
**Abb. 4 Absorption und Emissionsspektren des FRET-Paars GFP/mCherry**

Modifizierte Abbildung aus Albertazzi *et al.*, 2009: Die durchgezogenen Linien stellen die Absorptionsspektren von GFP (grün) und mCherry (rot) dar. Die Emissionsspektren sind mittels einer gestrichelten Linie eingezeichnet.

Zur Messung von Proteininteraktion mittels FRET werden hauptsächlich drei bildgebende Methoden verwendet: 1. Sensitive Emission Fingerprint, 2. Fotozerstörung des Akzeptors (APB) und 3. Messung der Donorlebenszeit (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (FLIM)). In dieser Arbeit wurden die zweite und dritte Methode angewendet. Im Folgenden werden sie näher erläutert.

### 2.3.1 FRET-Messungen mittels Akzeptor-Fotozerstörung (APB)

Durch den Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor sinkt die Fluoreszenzintensität des Donors ( $I_D$ ). Dieser Energietransfer wird durch Zerstörung des Akzeptorchromophors mittels Fotozerstörung blockiert, wodurch ein Anstieg der Donorfluoreszenz gemessen werden kann. Im Gegensatz zu allen anderen FRET-Messungsmethoden kann dieser offensichtliche Intensivitätsanstieg der Donorfluoreszenz sofort quantifiziert werden und muss nicht erst durch Korrekturverfahren ermittelt werden. Die Quantifizierung des FRET ( $E_{app}$ ) [%] erfolgt nach der folgenden Formel (Abb. 5).



**Abb. 5 FRET-Quantifizierung in einem APB-Experiment**

( $I_{Dvor}$ : GFP Intensität vor dem Bleichen des Akzeptors (5. Bild);  $I_{Dnach}$ : GFP Intensität nach der Fotozerstörung des Akzeptors (6. Bild)).

$E_{app}$  ist dabei jedoch nicht um Hintergrundschwankungen oder anderen möglichen Effekten, die einen Fluoreszenzanstieg bewirken können, bereinigt. Daher sind Kontrollexperimente zur Ermittlung der GFP-Intensitätsfluktuation in einem APB-Experiment essentiell. Der Ablauf eines APB-Experimentes erfolgt nach den Angaben von Karpova und Albertazzi (Karpova *et al.*, 2003; Albertazzi *et al.*, 2009). Innerhalb einer Zeitserie von zehn bis 20 Bildern wird zwischen dem fünften und sechsten Bild das mCherry in einem Bereich entlang der Plasmamembran (PM) gebleicht. Eine  $E_{app}$ -Berechnung erfolgte in dem hier

dargestellten Experiment nur dann, wenn die GFP-Intensitätsschwankung innerhalb des Bleichfensters über die ersten fünf Bilder kleiner als 10 % bezogen auf das fünfte Bild war.

### **Einstellungen des konfokalen Mikroskops LSM 510 META<sup>MK4</sup>:**

Für APB-Experimente wurde ein 40x (1.3 NA) Öl-Immersionsobjektiv verwendet. Die GFP-Anregung erfolgte mit einem Argonlaser bei 488 nm mit 40 mW Ausgangsleistung, wobei die Energie auf 1-3 % der Endleistung reduziert wurde, um ein Bleichen des GFPs zu minimieren. Die Fluoreszenz wurde im META-Kanal von 496-550 nm detektiert. mCherry wurde während der Bildaufnahme mit einer 561 nm Diode mit 3–9 % der Endleistung angeregt und die Emission zwischen 571 und 636 nm im META-Kanal aufgenommen. Je APB-Experiment wurde eine Zeitserie von zehn bis 20 Bildern aufgenommen (Bildauflösung 256 X 256 mit einer Scangeschwindigkeit von 2.55  $\mu\text{s}/\text{px}$ ). Das Bleichen des mCherrys zwischen dem fünften und sechsten Bild erfolgte innerhalb eines Bildes entlang der Plasmamembran (PM) mit 100 % Endleistung der 561 nm Diode für 80–100 Wiederholungen. Bei der Bildaufnahme wurde darauf geachtet, dass der Detektor im mittleren Auslastungsbereich arbeitete und damit sensitiv gegenüber GFP-Intensitätsänderungen war.

### **2.3.2 FRET-Messungen mittels FLIM**

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie macht acht Eigenschaften von Fluorophoren gleichzeitig zugänglich und wird daher gerne als achtdimensionales Experiment bezeichnet. Zunächst seien die fünf fluorophor-spezifischen Dimensionen genannt: (I+II) Absorptions- und Emissionsspektren ( $F(\lambda_A, \lambda_E)$ ), (III) die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$ , (IV) die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  sowie (V) die Anisotropie  $r$ . In einer lebenden Zelle müssen drei weitere Dimensionen mit eingerechnet werden: die Konzentration des Fluorophors (VI), dessen Interaktion mit anderen Fluorophoren via FRET (VII) und zwar über die Zeit (VIII) (Kudryavtsev *et al.*, 2007; Weidtkamp-Peters *et al.*, 2009). Die achtdimensionale Aufnahme und Analyse der Fluoreszenzeigenschaften in jedem Pixel eines Fluoreszenzbildes bezeichnet man als ‚Multiparameter Fluorescence Image Spectroscopy‘ (MFIS). Auf MFIS basierende Interaktionsstudien erlauben die Unterscheidung von verschiedenen Proteinpopulationen, deren Charakteristika Aufschluss über Funktion und Verhalten der Proteine in der Zelle geben. Über die Zeit kann so ein dynamisches Bild erzeugt werden. In dieser Arbeit sollte diese Technik in Zusammenarbeit mit Stefanie Weidtkamp-Peters aus der Arbeitsgruppe von Prof. Claus A. M. Seidel (Institut für Molekulare Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf) für Pflanzenzellen etabliert werden, wobei zunächst auf lebenszeitbasierende Interaktionsstudien (FLIM) fokussiert wurde.

Die Lebenszeitmessungen erfolgten durch das DCS-120 konfokale Scanning-FLIM-System (Becker & Hickel GmbH, Berlin), montiert an einem inversen Nikon® ECLIPSE Ti (Nikon, Düsseldorf) mit einem 60x (NA 1.2) Wasser-Immersionsobjektiv. Die Anregung des FRET-Donors (GFP) erfolgte mit einer 473 nm-Diode, die mit einer Frequenz von 50 MHz pulsierte. Donor- und Akzeptorfluoreszenz (GFP: BP 500-540; mCherry: BP 572-642) wurden dabei von ‚Photomultipliern‘ (PMTs) (H7422P-40 von Hamatsu, Herrsching Deutschland) detektiert und mittels des TCSPC-150 (Becker & Hickel GmbH, Berlin) im FIFO Imaging Mode digitalisiert. Alle detektierten Photonen enthalten damit die zeitliche und räumliche Information in Abhängigkeit vom Anregungsimpuls innerhalb einer Zeitserie von Bildern. Die so erzeugten Daten konnten danach anhand der aufgenommenen Parameter analysiert werden. Bildgröße und Aufnahmegeschwindigkeit wurden dabei konstant auf 128 x 128 px mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{s}/\text{px}$  gehalten. Die Daten einer Serie aus 20 Bildern konnten dann einzeln oder in der Summe analysiert werden.

Jedes FLIM-System mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC von Englisch: „time correlated single photon counting“) hat eine spezifische Impulsantwort (‚Instrument Response Funktion‘ (IRF)), um die das gemessene Signal korrigiert werden muss. Hierzu werden die aus einer Erythrosin- oder Wassermessung erhaltenen IRF und das gemessene Signal entfaltet, um die reine Fluoreszenzabklingkurve zu erhalten. Zusätzlich wird um den nicht zu vermeidenden Hintergrund korrigiert.

Für die Datenauswertung wurde das Programm „*Marcelle*“ verwendet, das von der Molekularen Physikalischen Chemie zur Verfügung gestellt wurde. Mit *Marcelle* lässt sich für jeden Pixel über einer gesetzten Intensitätsschwelle die Lebenszeit nach einer Reihe wählbarer Modelle berechnen.

Zur Vereinfachung wurde zunächst die Lebenszeit unter der Annahme eines monoexponentiellen Zerfalls für den Donor alleine und anschließend für die FRET-Probe, unter Verwendung der ‚Maximum likelyhood‘-Methode (Schaffer *et al.*, 1998), ermittelt. Da sich in einer FRET-Probe theoretisch mindestens zwei Proteipopulationen befinden, interagierende und nicht interagierende, ergibt sich eine Lebenszeit, die den Mittelwert aller Populationslebenszeiten widerspiegelt. Ist der Anteil an interagierenden Proteinen im analysierten Pixel hoch ergibt sich eine starke Lebenszeitverkürzung im Vergleich zur Donor-Probe, wohingegen eine kleine Population von interagierenden Proteinen nur einen geringen Effekt auf die Gesamtlebenszeit ausübt. Im weiteren Verlauf sollte auch eine Datenanalyse

unter der Annahme eines Zweikomponentensystems durchgeführt werden. Für die Lebenszeitbestimmung eines Zweikomponentensystems mit jeweils einer monoexponentiellen Zerfallskurve ist das Signal zum Rauschverhältnis in einem Pixel zu klein, weshalb die Lebenszeit einzelner Proteinpopulationen anhand aller Photonen ermittelt werden sollte (Kudryavtsev *et al.*, 2007).

---

# **KAPITEL 3**

## **ERGEBNISSE**

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis für die Regulation des Stammzellerhalts im SAM zu vertiefen. Hierzu sollte zunächst eine genetische Untersuchung der funktionellen Abhängigkeit von CLAVATA1 (CLV1) und CLV2 stattfinden, um das von Ralf Müller erstellte Modell des CLV3-Signalweges zu überprüfen. Aus den publizierten Daten konnte das bisher angenommene Modell eines CLV1/CLV2-Rezeptorkomplexes nicht widerlegt werden (Jeong *et al.*, 1999). Die bisherige Datenlage könnte auch auf einen multimeren Rezeptorkomplex hinweisen, in dem die Funktion von CORYNE (CRN) und CLV1 abhängig von CLV2 ist.

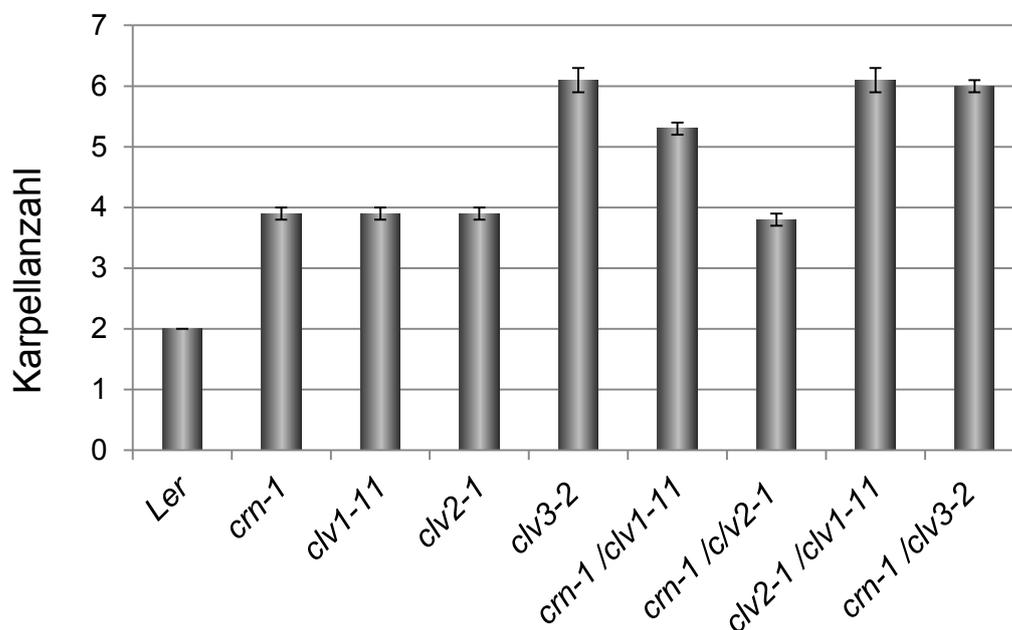
#### 3.1 Die CLV1-Proteinfunktion ist unabhängig von CLV2 und CRN.

Der Verlust des *WUSCHEL* (*WUS*)-reprimierenden CLV-Signalweges führt zu einer Vergrößerung der Stammzellpopulation im Sprossapikalmeristem (SAM). Bisher konnten drei membrangebundene Rezeptorproteine, CLV1, CLV2 und CRN, identifiziert werden, die für die Weiterleitung des CLV3-Signals verantwortlich sind (Clark *et al.*, 1997; Kayes *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2008). Ein reduziertes CLV3-Signal, d.h. eine verstärkte *WUS*-Expression führt hierbei zu einer Erhöhung der Stammzellanzahl. Diese vergrößerte Stammzellpopulation resultiert zum einen in der Bildung zusätzlicher Blütenorgane. Hierbei sind vor allem die inneren Wirtel, die die Stamen und Karpelle beherbergen, betroffen. Zum anderen werden aufgrund der verzögerten Repression von *WUS* im Blütenmeristem überzählige innere Wirtel gebildet, die der Schote eine keulenartige Form verleihen. Für eine indirekte Messung der SAM-Größe hat sich die Zählung der Karpellanzahl etabliert (Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Kayes *et al.*, 1998).

Der Verlust eines Rezeptors des CLV-Signalweges führt mit der Bildung von ~ 3.9 Karpellen pro Blüte zur Entwicklung eines intermediären *clv*-Phänotyps im Vergleich zu *clv3*-Mutanten. Diese bilden durchschnittlich sechs Karpelle pro Blüte (Abb. 6). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass in den Rezeptormutanten nur eine Reduktion des CLV-Signalweges stattfindet und dass damit das CLV3-Signal über mehrere funktionell-unabhängige Rezeptorkomplexe weitergeleitet wird. *clv1-1/crn-1*-Doppelmutanten bilden durchschnittlich 5.3 Karpelle pro Blüte, was einer weiteren Reduktion des CLV-Signalweges entspricht. *crn-1/clv2-1*-Doppelmutanten zeigen mit durchschnittlich 3.8 Karpellen keine Veränderung in der Aktivität des CLV-Signalweges im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten. Auf Basis dieser Beobachtungen wurde ein Modell des CLV-Signalweges postuliert, in dem zwei funktionell unabhängige Rezeptorkomplexe existieren. In diesem

Modell wird das CLV3-Signal von einem CLV1-abhängigen und einem CLV2/CRN-abhängigen Rezeptorkomplex in die Zelle weitergeleitet (Müller *et al.*, 2008). Um die Unabhängigkeit von CLV2 und CLV1 zu bestätigen und damit dieses Modell weiter abzusichern, fehlte die Analyse von *clv1-11/clv2-1*-Doppelmutanten. Die Herstellung und Analyse dieser Doppelmutanten ist daher Teil dieser Arbeit.

Die Bildung von 6.0 Karpellen pro Blüte in *clv1-11/clv2-1*-Pflanzen bestätigte die Separierung von CRN und CLV2 von CLV1 und damit die Weiterleitung des CLV3-Signals über zwei funktionell unabhängige Rezeptorkomplexe. Zum Vergleich ist die ermittelte *clv1-11/clv2-1*-Karpellanzahl mit der von Ralf Müller gemessenen Karpellanzahl der Einzel- und Doppelmutanten in Abb. 6 dargestellt. Die verwendeten *clv1-11*- (*Ds*-Insertion), *clv2-1*- (Stopcodon) und *clv3-2*- (chromosomale Inversion) Mutanten stellen putative Nullallele dar. Der mutante Phänotyp von *crn-1* Pflanzen hingegen beruht auf einer Punktmutation innerhalb der für die Transmembrandomäne (TMD) kodierenden Sequenz, die zum Austausch der Aminosäure (AS) Glyzin gegen Glutaminsäure führt. Der etwas schwächere Phänotyp von *clv1-11/crn-1*-Pflanzen könnte daher auf eine Restfunktion des veränderten CRN-Proteins zurückzuführen sein.



**Abb. 6 Karpellanzahl von *clv/crn*-Allelen im Ökotyp *Ler*.**

Durchschnittliche Karpellanzahl der *clv/crn*-Mutanten im Ökotyp *Ler*. Gezählt wurden die ersten fünf Schoten einer Pflanze mit  $N \geq 40$ . +/- Standardfehler.

### 3.1.1 Der Ökotyp Landsberg *erecta* modifiziert den *clv*-Phänotyp.

Die verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis* enthalten unterschiedliche Hintergrundmutationen, die den Phänotyp von Mutanten modifizieren können. Alle publizierten Daten von *clv/crn*-Mutanten wurden im Ökotyp Landsberg *erecta* (*Ler*) analysiert. *Ler*-Pflanzen haben einen kleineren und kompakteren Wuchs im Vergleich zu anderen Ökotypen wie Columbia (*Col*) (Rèdei, 1992). Diese kompaktere Wuchsform wurde auf eine Punktmutation im Genlocus von *ERECTA* (*ER*) zurückgeführt (Torii *et al.*, 1996). Durch die Analyse von *crn*- und *clv*-Allelen im Ökotyp *Col* soll dessen Einfluss auf den *clv*-Phänotyp analysiert werden. *CRN* wie auch *CLV2* werden in der Wurzel exprimiert, wobei ihr Funktionsverlust zu keinen offensichtlichen Phänotypen führt. Jedoch ist eine Insensitivität gegenüber CLE-Peptidbehandlung im proximalen WAM beobachtet worden (siehe 1.1.4 und 1.2.2). Eine beobachtete geringe Desorganisation von *Ler*-Wurzeln im WAM erschwerte eine Funktionsanalyse von *CLV2* und *CRN*. Zu diesem Zweck sollen Allele im *Col*-Hintergrund isoliert werden. Eine mögliche Funktion oder Expression von *CLV1* in der Wurzel ist bisher noch nicht beschrieben worden und wird daher nicht ausgeschlossen.

In *CLV1* konnten drei T-DNA-Insertionslinien im *Col*-Hintergrund identifiziert werden, die einen *clv*-Phänotyp zeigen (Abb. 7A). In *clv1-sail* und *clv1-salk* sind die T-DNAs im transkribierten 5' Bereich, vor dem Translationsstart, inseriert (Abb. 7 D). Die T-DNA in *clv1-wis* ist innerhalb des kodierenden Bereichs der extrazellulär gelegenen LRRs inseriert. Für *CLV2* konnte eine T-DNA-Insertionslinie *clv2-gabi* identifiziert werden, die ebenfalls einen *clv*-Phänotyp zeigt (Abb. 7C). Dieses *clv2*-Allel führt ebenfalls zur Ausbildung des als „valveless“ bezeichneten Phänotyps. Dabei ist das das Gynoecium bedeckende Gewebe der Fruchtblätter basal verkürzt oder fehlt ganz und wird durch Zellen des Replums ersetzt (Abb. 7L). Dieser Phänotyp ist für *clv2-1*- und *crn-1*-Mutanten beschrieben und tritt ebenfalls im hypermorphen *CLV1*-Allel *clv1-4* auf (Jeong *et al.*, 1999; Dievart *et al.*, 2003b; Müller *et al.*, 2008). Solch ein „valveless“ Phänotyp ist jedoch nicht auf eine reduzierte Meristemgröße zurückzuführen. Die zusätzlichen inneren Wirtel führen zur apikalen Verdickung des Pistills sowie zu dessen Aufbrechen durch proliferierendes Gewebe. Ursache für diesen Effekt könnte die veränderte Architektur des Blütenmeristems sein. Der „valveless“ Phänotyp stellt eine Störung der proximal-distalen Achse dar. Dieser Phänotyp ist bisher in Pflanzenlinien beobachtet worden, die Defekte im Auxintransport oder in der auxinabhängigen Signaltransduktion aufweisen (Sessions *et al.*, 1997). Die Ermittlung der SAM-Größe anhand der Karpellanzahl wird durch den „valveless“ Phänotyp überlagert, weshalb nur Blüten mit vollständigen oder partiellen Fruchtblättern ausgewertet wurden.

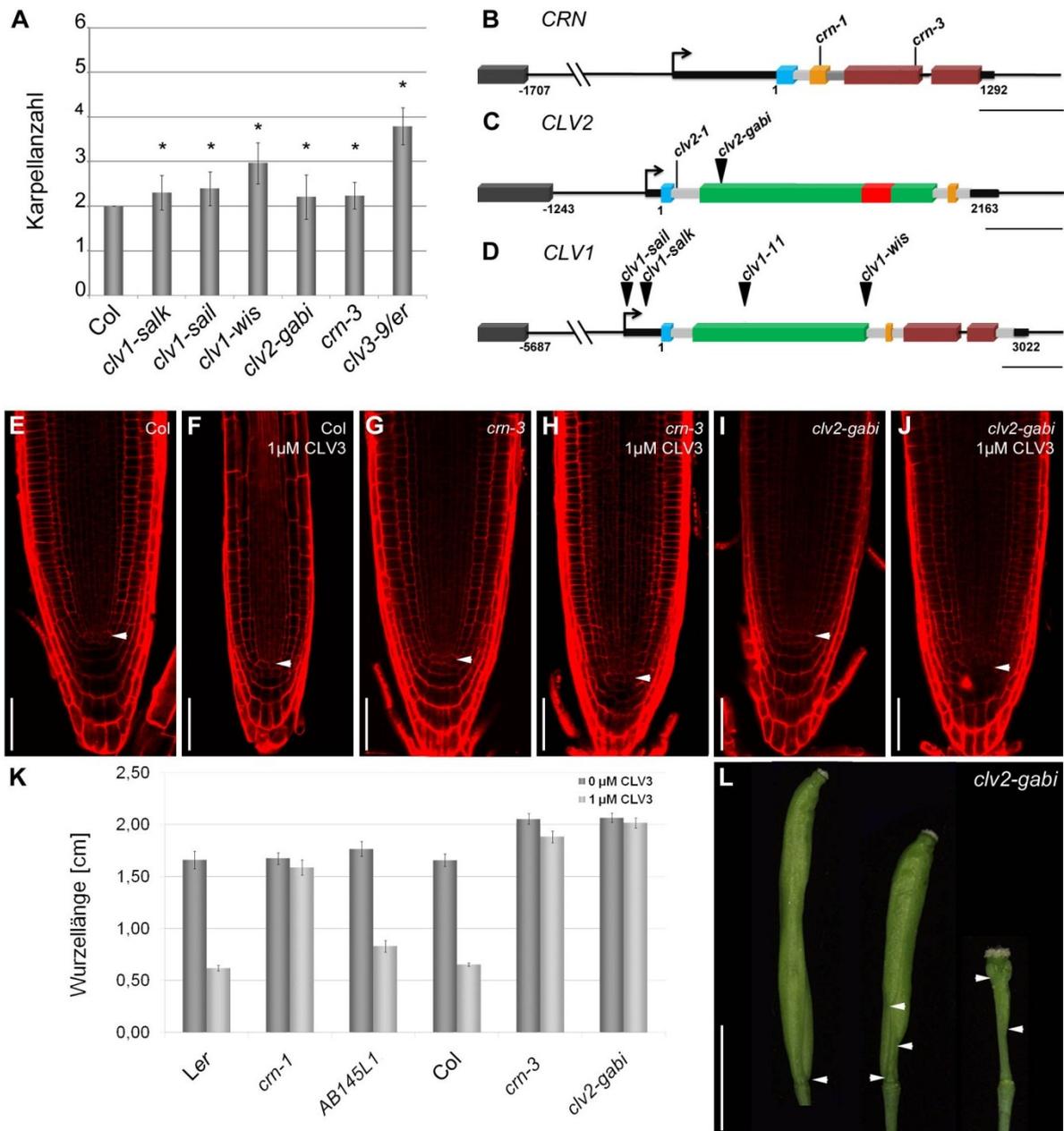
Im Fall von *CRN* wurde ein „Tilling“-Allel, *crn-3*, mit erhöhter Karpellanzahl identifiziert. Diese *crn-3*-Allel hat eine Punktmutation innerhalb der Kinasedomäne, die zum Austausch eines Glutamins gegen ein Stopcodon führt (Abb. 7B; Till *et al.*, 2003). Der mutante Phänotyp von *crn-3* deutet eine funktionelle Relevanz der Kinasedomäne für die Weiterleitung des CLV3-Signals an. Die Reduktion des CLV-Signalweges in *crn-3* könnte auf den Verlust der enzymatischen Kinaseaktivität oder einer möglichen Protein-Protein-Interaktion beruhen. Um sicherzugehen, dass die Punktmutation in *CRN* die Ursache für den *clv*-Phänotyp von *crn-3* ist, wurden ein Allelietest mit *crn-1* sowie eine Rückkreuzung mit Col durchgeführt. Innerhalb des Allelietests zeigten alle F1-Pflanzen (N = 15) der *crn-1* X *crn-3* Kreuzung den *clv*-Phänotyp und alle F1-Pflanzen der Rückkreuzung mit Col waren wildtypisch (N = 40). Die Rückkreuzung mit Col bewies, dass der Gendefekt in *crn-3* rezessiv ist und nur im homozygoten Zustand ausgeprägt wird. Der Allelietest zeigte, dass in *crn-1* und *crn-3* derselbe Genlocus betroffen ist und es sich daher um zwei Allele eines Gens handelt. Um die Auswirkungen eines CLV3-Signalverlustes im Col-Hintergrund zu überprüfen, wurde *clv3-9* ebenfalls analysiert. Dabei handelt es sich jedoch um eine *clv3-9/er*-Doppelmutante, da die Einzelmutanten nicht vorlagen.

Alle beschriebenen *clv/crn*-Allele im Ökotyp Col zeigen mit ~ 2.3 Karpellen pro Blüte einen signifikanten Anstieg der Karpellanzahl im Vergleich zum Wildtyp (wt) (Student T-Test  $p < 0.006$ ). *clv1-wis* hat mit durchschnittlich drei Karpellen eine signifikant höhere Karpellanzahl gegenüber den anderen Rezeptormutanten (Student T-Test  $p < 0.001$ ; Abb. 7A). Die Ursache für dieses hypermorphe *clv1*-Allel ist jedoch unklar. Da die T-DNA kurz vor der TMD-kodierenden Sequenz inseriert ist, kann es zur Transkription der LRR-kodierenden Sequenz oder der TMD mit Kinasedomäne kommen. Die synthetisierten Proteine könnten auf unbekannte Weise die CLV-Signalstärke negativ beeinflussen.

Wie zu erwarten war, entwickeln *clv3-9/er*-Mutanten mit ~ 3.8 Karpellen den stärksten Phänotyp im Col-Hintergrund. Die Differenz in der Karpellanzahl zwischen *clv3-9/er* in Col und *clv3-2/er* in Landsberg deutet auf weitere regulatorische Signalwege im Stammzellerhalt hin, die in Col aktiv, in *Ler* jedoch reduziert sind.

Die Behandlung der Wurzel von wildtypischen Pflanzen mit CLV3-Peptid führt zur Differenzierung des proximalen und distalen Wurzelmeristems. Der Funktionsverlust von CLV2 oder CRN in *clv2-1* oder *crn-1* Pflanzen bewirkt eine reduzierte Sensitivität des proximalen WAM gegenüber CLV3-Peptidbehandlung, was auch für die neu identifizierten *clv2-gabi*- und *crn-3*-Allele festgestellt werden konnte (Abb. 6C-J; Fiers *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008).

Die Analyse von *clv3-9/er* im Col-Hintergrund verdeutlicht, dass der starke *clv*-Phänotyp in *Ler* nicht ausschließlich auf den Funktionsverlust von *clv3* und *er* zurückzuführen ist. In Ökotyp *Ler* müssen weitere Gene defekt sein, die in die Regulation der Stammzellen involviert sind. Mithilfe der neuen *clv/crn*-Allele kann eine genauere Analyse der Proteinfunktion in der Wurzel stattfinden.



**Abb. 7** Analyse von *clv/crn*-Allelen im Col-Hintergrund.

(A) Durchschnittliche Karpellanzahl der *clv/crn* Mutanten im Ökotyp Col. Gezählt wurden die ersten zehn Schoten einer Pflanze mit  $N \geq 100$ .  $\pm$  Standardfehler. \* markiert Pflanzen mit signifikantem Anstieg in der Karpellanzahl im Vergleich zu Col. Student T-Test  $p < 0.005$ . (B-D) Exon/Intron sowie Proteinstruktur von *CRN*, *CLV2* und *CLV1*. Dargestellt sind die genomischen Regionen. Dunkelgraue Box: 5' gelegenes Gen; Pfeil: vorhergesagter Transkriptionsstart; schwarze dicke Linie: 5' und 3'-Bereich der CDS, Farbige Boxen markieren den translatierten Bereich; blaue: vorhergesagtes Signalpeptid; hellgraue: Proteinregion mit nicht spezifizierbarer Funktion; orange: vorhergesagte Transmembrandomäne; grün: LRR; rot: Inseldomäne; braun: Kinasedomäne. Die verschiedenen Allele

sind eingezeichnet, wobei eine Pfeilspitze eine Insertion kennzeichnet und eine Linie eine Punktmutationen. Translationsstart und Translationsende sind mit den entsprechenden bp-Werten gekennzeichnet, wobei der Translationsstart auf 1 gesetzt wurde. Rechts unten ist ein Größenstandard eingezeichnet, der 500 bp entspricht. **(E-J)** Konfokale Aufnahmen einer Propidiumiodid (PI) gefärbten Wurzelspitzen (7 TnK), die auf GM (E,G,I) oder 1  $\mu$ M CLV3-Peptid enthaltenden GM-Platten (F,H,J) gewachsen sind. Das RZ ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. **(K)** Wurzellängenmessung von Keimlingen (7 TnK), die auf GM oder 1  $\mu$ M CLV3-Peptid enthaltenden GM-Platten gewachsen sind. **(L)** Der „valveless“ Phänotyp von *clv2-gabi*-Schoten. Das proximale Ende der Valves ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Größenstandard in E-J = 20  $\mu$ M; in L = 1 cm.

### 3.1.2 RPK2 ist involviert in die CLE-abhängige Regulation von Meristemen.

Die Suppression des *clv*-Phänotyps von Rezeptormutanten unter Kurztagbedingungen (Tageslänge < 8h) und die Modifizierung der Phänotypsstärke durch Wachstumsbedingungen, deuten auf bisher nicht identifizierte Signalwege zur Regulation des Stammzellerhalts (Kayes *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008). Zur Erlangung eines tieferen Verständnisses in der Stammzellregulation müssen neue Komponenten isoliert und analysiert werden. Das Labor von H. Fukuda konnte, durch Isolierung von CLE-Peptid-resistenten Pflanzen in der Wurzel, RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE2 (RPK2)/TOADSTOOL2 (TOAD2) als Komponente der CLE-abhängigen Regulation des WAM identifizieren (persönliche Mitteilung von H. Fukuda). *rpk2*-Mutante zeigen Defekte in der Embryonalentwicklung, der Antherendehiszenz sowie der Pollenreifung, die zur Sterilität der Pflanzen führen (Mizuno *et al.*, 2007; Nodine *et al.*, 2007; Nodine *et al.*, 2008). Bei der phänotypischen Analyse des identifizierten CLE-Resistenten *rpk2*-Allels (*rpk2-4*) konnten neben den bereits beschriebenen Phänotypen auch eine erhöhte Karpellanzahl (~3.2 Karpelle; Abb. 8M, N) sowie wenige zusätzliche Wirtel in der Blütenentwicklung beobachtet werden. Da die isolierte Mutante eine Punktmutation innerhalb der Kinasedomäne trägt, die zu einem AS-Austausch (G885R) führt, könnte es sich auch um ein neomorphes *rpk2* Allel handeln. Die Analyse der *rpk2-1*-, *rpk2-2*- sowie *rpk2-3*-Allele, die aufgrund einer T-DNA Insertion putative Nullallele darstellen (Mizuno *et al.*, 2007), bestätigte den Blütenphänotyp sowie die reduzierte Sensitivität gegenüber CLE-Peptidbehandlung in der Wurzel (persönliche Mitteilung von H. Fukuda). Diese Beobachtung deutet auf eine Funktion von RPK2 in der Stammzellregulation im SAMs und WAMs hin.

Um die genetische Beziehung zwischen *RPK2* und den einzelnen Rezeptoren des CLV-Signalweges zu untersuchen, wurden Doppelmutanten aus *clv1-11*, *clv2-1* bzw. *crn-1* und *rpk2-1* bzw. *rpk2-4* analysiert. Die *rpk2*-Allele mit einer T-DNA-Insertion zeigen mit ~2.2 Karpellen pro Blüte einen schwächeren *clv*-Phänotyp als die für die Kreuzung verwendeten *clv/crn*-Mutanten (~ 4 Karpelle/Blüte; Abb. 8M, N). Dies lässt sich durch die verschiedenen Ökotypen (Col im Vergleich zu *Ler*) erklären. Im Vergleich zu den in

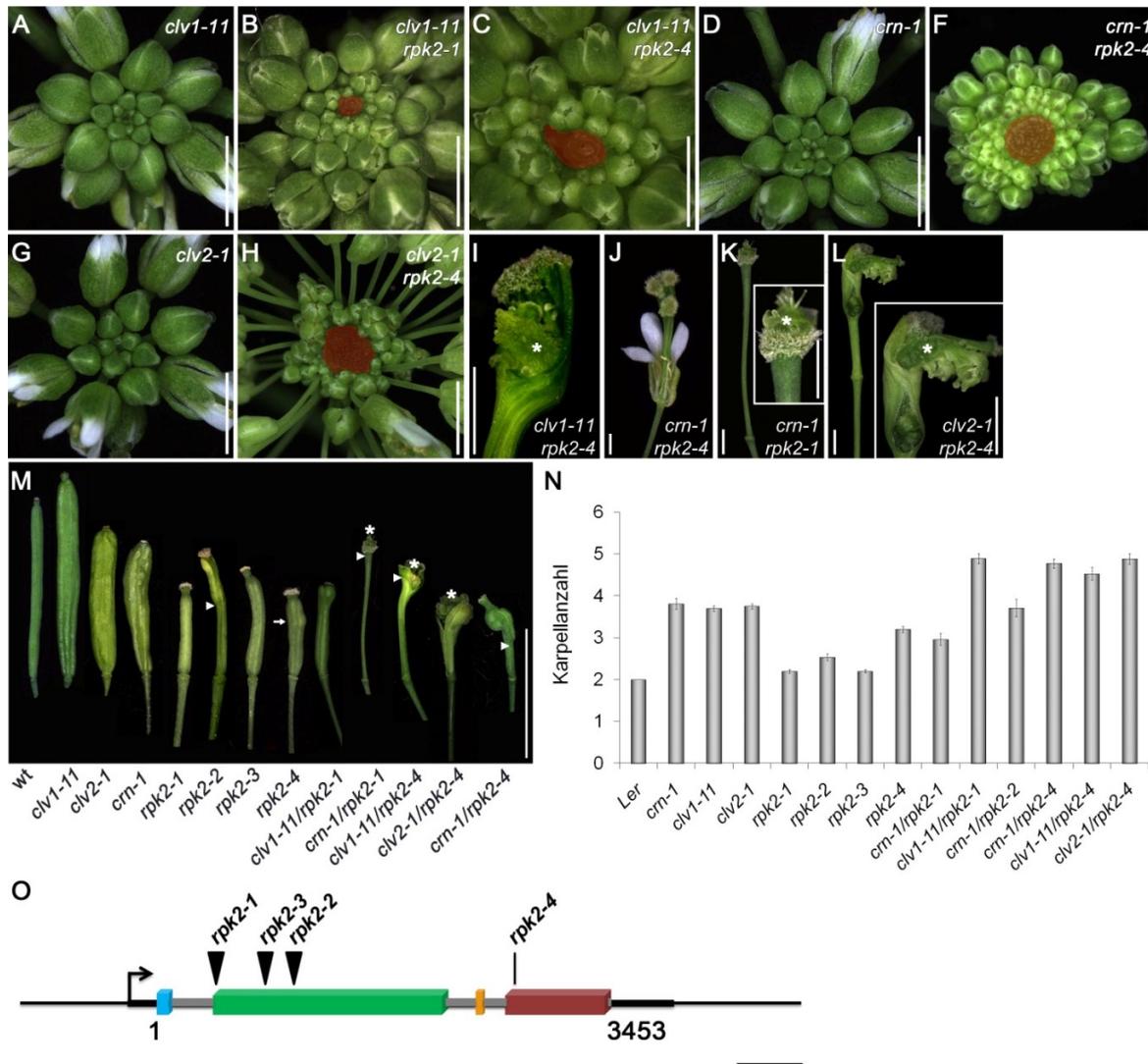
Abschnitt 3.1.1 beschriebenen *clv/crn*-Allelen der Rezeptormutanten im Col-Hintergrund ist die Phänotypsstärke, gemessen an der Karpellanzahl, ähnlich. Zum damaligen Zeitpunkt lagen diese Allele jedoch noch nicht vor. *rpk2-4* in Col stellt mit der Bildung von ~ 3.2 Karpellen ein rezessives hypermorphes Allel dar. Neben der erhöhten Karpellanzahl ist in den *rpk2*-Pflanzen auch der als „valveless“ beschriebene Phänotyp zu beobachten. Dieser „valveless“ Phänotyp tritt sowohl in *rpk2-1*- als auch *rpk2-2*-, *rpk2-3*- und *rpk2-4*-Mutanten auf, jedoch mit unterschiedlicher Frequenz (*rpk2-1*: ~ 1 %; *rpk2-4*: ~ 20 %; N<sub>≥</sub>100).

Die Analyse der erzeugten Doppelmutanten erfolgte anhand der Nachkommen der in der F<sub>2</sub> isolierten *clv1-11* *-/-* *rpk2-1/-4* *+/-*, *clv2-1* *-/-* *rpk2-1/-4* *+/-* bzw. *crn-1* *-/-* *rpk2-1/-4* *+/-* Pflanzen. Aufgrund der Kreuzung verschiedener Ökotypen wurde die Karpellanzahl von *clv1-11*, *clv2-1* und *crn-1* in F<sub>3</sub>-Pflanzen ermittelt, die nicht steril waren und damit heterozygot oder wildtypisch für die *rpk2*-Mutation. Hierbei fällt auf, dass die Karpellanzahl stark von den Allelen im Col-Hintergrund abweicht und den Messungen im *Ler*-Hintergrund entspricht. Die Identifizierung der für *clv1-11*, *clv2-1* oder *crn-1* homozygoten F<sub>2</sub>-Pflanzen erfolgte anhand des Karpellphänotyps. Dies führte wahrscheinlich zu einer unbeabsichtigten Selektion des durch den Ökotypen *Ler* verstärkten *clv*-Phänotyps. Für die Analyse der Doppelmutanten wurden vier unabhängige Pflanzenlinien untersucht, die jedoch anhand der Karpellzählung der *clv*- bzw. *crn*-Mutanten einem vorwiegenden *Ler*-Hintergrund entsprechen. Die Doppelmutanten der F<sub>3</sub> wurden durch die durch *rpk2* verursachte Sterilität identifiziert. Ein Funktionsverlust von *RPK2* wirkt sich additiv auf den *clv*-Phänotyp von *clv1-11*-Pflanzen aus (*clv1-11* 3.7 Karpelle; *clv1-11/rpk2-1* 4.9 Karpelle; Abb. 8N).

Die Auswirkung auf den *clv*-Phänotyp von *crn-1* Pflanzen ist nicht signifikant und kann vermutlich auf die unterschiedlichen genetischen Hintergründe zurückgeführt werden (*crn-1* 3.8 Karpelle; *crn-1/rpk2-1* 3.0 Karpelle). Eine Analyse von *clv2-1/rpk2-1*-Doppelmutanten steht noch aus. Die Frequenz des „valveless“ Phänotyps steigt in den Doppelmutanten an (20 % *clv1-11/rpk2-1*; 70 % *crn-1/rpk2-1*), wodurch die Auswirkungen des Funktionsverlustes von *rpk2* und *clv* bzw. *crn* auf das SAM verdeckt wird. In der Kombination mit dem hypermorphen *rpk2-4*-Allel zeigen alle Doppelmutanten eine Verstärkung des *clv*-Phänotyps (*clv1-11/rpk2-4* 4.5 Karpelle; *clv2-1/rpk2-4* 4.9 Karpelle; *crn-1/rpk2-4* 4.8 Karpelle).

Bei Betrachtung des Infloreszenz von *clv1-11/rpk2-4*, *clv2-1/rpk2-4* oder *crn-1/rpk2-4* fällt eine starke Akkumulation von undifferenzierten Zellen auf, was bei den verwendeten Wachstumsbedingungen bei keiner Einzelmutante zu beobachten war (Abb. 8A-H). Die Terminierung des Blütenmeristems ist ebenfalls stark verzögert. Die Akkumulation von

undifferenzierten Zellen führt hier zum Aufbruch der fusionierten Karpelle (Abb. 8I-M). Solch eine Überproliferation ist auch für *clv3-2*-Mutanten im *Ler*-Hintergrund beschrieben, bei *crn-1* unter wärmeren Wachstumsbedingungen (28°C) sowie für einige Doppelmutanten.



**Abb. 8 Phänotypische Analyse von *rpk2/clv*- bzw. *rpk2/crn*- Doppelmutanten.**

(A-H) Infloreszenz von Einzel- und Doppelmutanten. Das in *crn-1/rpk2-4*, *clv2-1/rpk2-4*, *clv1-11/rpk2-4* und *clv1-11/rpk2-1* akkumulierte Gewebe ist hervorgehoben. Größenstandard = 1 mm (I-L) Die Akkumulation von undifferenziertem Gewebe im Blütenmeristem führt zum Aufbruch der Schote. Aus dem undifferenziertem Gewebe wachsen pistillähnlichen Gewebsstrukturen aus. Größenstandard = 1 mm (I-M) Schoten von Einzel- und Doppelmutanten. Der Funktionsverlust von *rpk2* führt zu einer erhöhten Karpellanzahl, die im Fall von *rpk2-4* mit der Bildung von inneren Wirteln einhergeht (mit Pfeil gekennzeichnet). In *rpk2*-Mutanten ist ebenfalls der als „valveless“ beschriebene Phänotyp zu beobachten (mit Pfeilspitze gekennzeichnet). In den *rpk2-1/clv1-11*- und *rpk2-4/clv1-11*-Doppelmutanten ist ein additiver Phänotyp zu beobachten. Die Akkumulation von undifferenziertem Gewebe in den zusätzlichen inneren Wirteln führt zum Aufbruch der Schote (mit \* gekennzeichnet). Diese Akkumulation von Gewebe ist auch in *rpk2-4/clv2-1*- und *rpk2-4/crn-1*-Pflanzen zu sehen. Außerdem kommt es zur Verstärkung des „valveless“ Phänotyps in allen Doppelmutanten. Größenstandard = 1 cm. (N) Durchschnittliche Karpellanzahl von Einzel- und Doppelmutanten im Ökotyp Col. Gezählt wurden die ersten zehn Schoten einer Pflanze mit  $N > 70$ . +/- Standardfehler. (O) Exon/Intron sowie Proteinstruktur von *RPK2*. Dargestellt sind die genomischen Regionen: Pfeil: vorhergesagter Transkriptionsstart; schwarze dicke Linie: 5' und 3'-UTR; farbige Boxen markieren

den translatierten Bereich; blaue: vorhergesagtes Signalpeptid; hellgraue: Proteinregion mit nicht spezifizierbarer Funktion; orange: vorhergesagte Transmembrandomäne; grün: LRR; braun: Kinasedomäne. Die verschiedenen Allele sind eingezeichnet, wobei eine Pfeilspitze eine Insertion und eine Linie eine Punktmutation kennzeichnet. Zur Größenorientierung sind der Abstand zum 5' gelegenen Gen, der Translationsstart und das Translationsende mit dem entsprechenden bp-Wert gekennzeichnet, wobei der Translationsstart auf 1 gesetzt wurde. Rechts unten ist ein Größenstandard eingezeichnet, der 500 bp entspricht.

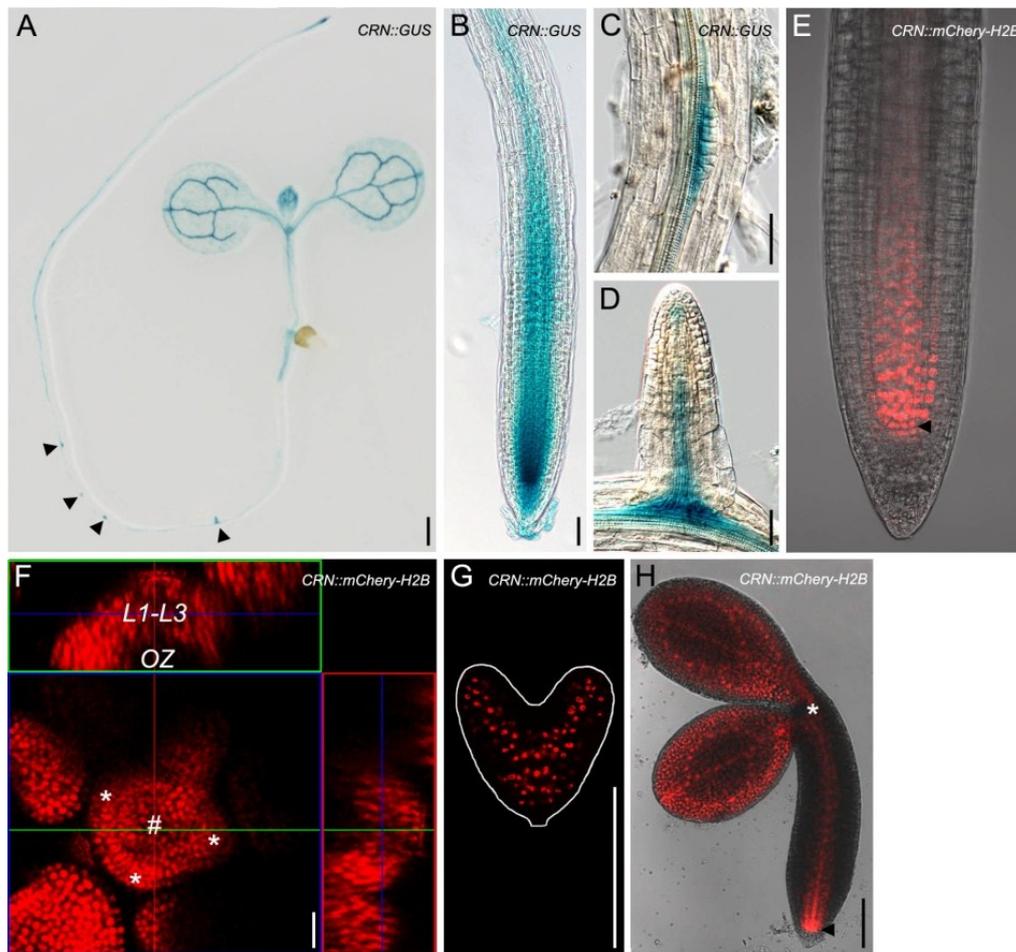
## 3.2 Expressionsstudien

Der Verlust von diversen Proteinen hat Auswirkungen auf den Stammzellerhalt. Der Funktionsverlust von *CLV1*, *CLV2* und *CRN* führt zu einer Vergrößerung des SAMs, wohingegen der Funktionsverlust von den *CLV1*-Homologen *BARELY ANY MERISTEMI* (*BAM1*) und *BAM2* zu einer Reduktion des SAMs führt. Die Dreifachmutante *bam1/bam2/clv1* zeigt eine Verstärkung des *clv*-Phänotyps, wohingegen in *bam1/bam2/clv3* der *clv*-Phänotyp supprimiert wird. Eine räumliche und zeitliche Expressionsanalyse dieser Rezeptoren kann Einblick in deren Zusammenspiel bei der Regulation der Stammzellpopulation geben. Im Folgenden wird hierzu die Expression von *CRN*, *CLV2* und *BAM1* anhand von Reporterlinien in *Arabidopsis* analysiert.

### 3.2.1 *CRN* ist im gesamten SAM, dem proximalen WAM sowie der Vaskulatur exprimiert.

Um die Gewebe zu identifizieren in denen *CRN* exprimiert wird, wurden eine *CRN::GUS* (*59L2*)- sowie eine *CRN::mCherry-H2B* (*191L4*)-Reporterlinie hergestellt. Im Verlauf der Embryogenese kann eine Expression von *CRN* in der Provaskulatur sowie die Etablierung eines Expressionsmaximum im embryonalem WAM detektiert werden (Abb. 9G-H). Diese vaskuläre Expression mit einem Maximum im WAM ist auch in Keimlingen detektierbar (Abb. 9A-E). Aus den Zellen des Perizykels erfolgt die Initiation und Bildung von Seitenwurzeln, die mit einem Expressionsmaximum von *CRN* einhergeht. Dieses Expressionsmuster von *CRN* entspricht der Verteilung von Auxin in der Wurzel und könnte auf eine Induzierbarkeit durch Auxin hindeuten. Die zelluläre Auflösung der *CRN::mCherry-H2B*-Linie zeigt, dass *CRN* im proximalen, aber nicht im distalen WAM exprimiert wird. Dies steht mit der reduzierten Sensitivität des proximalen WAM von *crn-1*-Pflanzen gegenüber CLE-Peptidbehandlung im Einklang (Abb. 9E; Abb. 7K). Innerhalb des SAMs zeigt *CRN* eine gleichförmige Expression durch alle drei Schichten (L1-L3). Eine Expression im OZ ist jedoch nicht zu detektieren (Abb. 9F). Die hier dargestellte Expression von *CRN* stimmt mit den bisherigen Expressionsdaten aus RNA-*In-situ*-Hybridisierungen überein

(Müller *et al.*, 2008). Außerdem ist das verwendete Promotorfragment ausreichend um *crn-1*-Mutanten durch Expression von *CRN* zu komplementieren (Abschnitt 3.3.1).



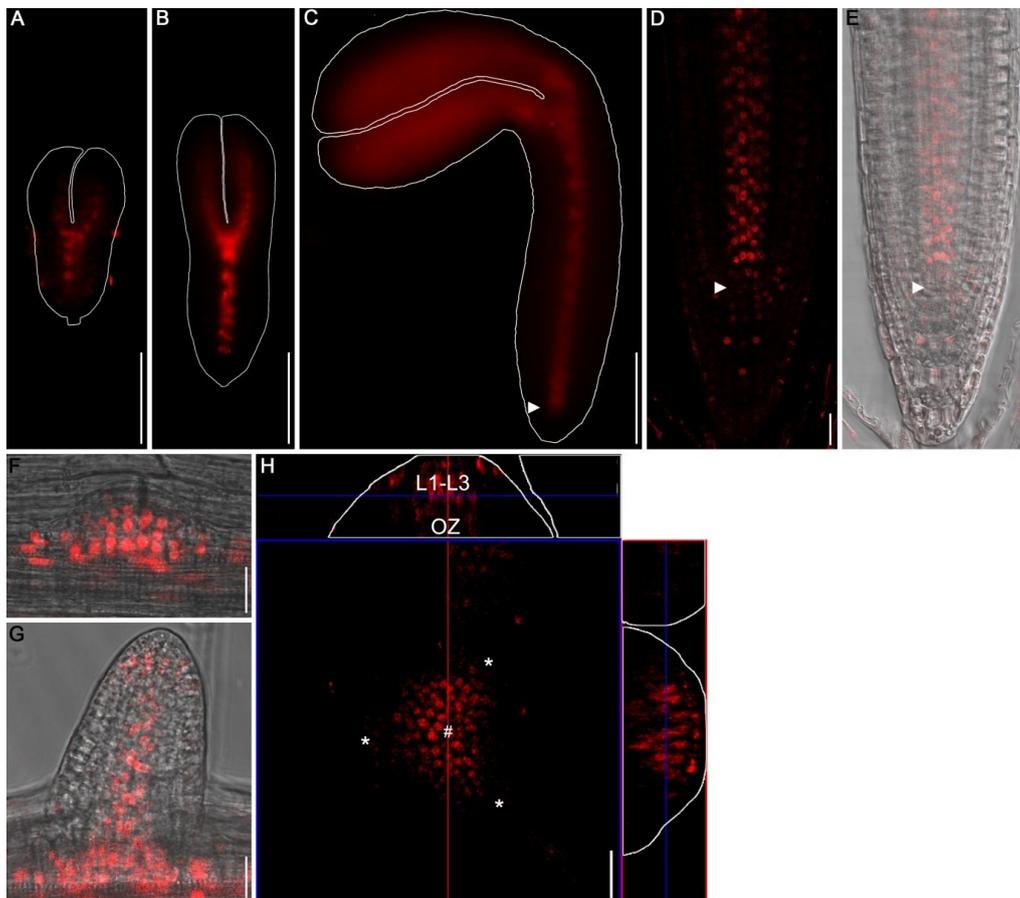
**Abb. 9** Expressionsanalyse von *CRN*

Expressionsanalyse von *CRN* anhand einer *CRN::GUS* (*59L2*)- und einer *CRN::mCherry-H2B* (*191L4*)-Reporterlinie. **(A-D)** Lichtmikroskopische Aufnahmen einer *CRN::GUS*-Linie. **(A)** *CRN*-Expression im Keimling (7 TnK). Ein blauer Farbniederschlag ist entlang der Vaskulatur zu beobachten, **(B)** mit einem Maximum in der Wurzelspitze und den neu angelegten Seitenwurzeln (in A mit Pfeilspitze gekennzeichnet; C + D). **(E-H)** Konfokale Aufnahmen einer *CRN::mCherry-H2B*-Reporterlinie. **(E)** *CRN* wird oberhalb des RZ (mit Pfeilspitze gekennzeichnet) in der meristematischen Zone exprimiert (Keimlingswurzel 6 TnK). **(F)** Im SAM zeigt *CRN* eine gleichförmige Expression in allen drei Schichten (L1-L3), jedoch keine detektierbare Fluoreszenz im OZ und in der Rippenzone (5 WnK, Z-Bildstapel des SAMs). Die ZZ ist durch # und Primordien mit \* gekennzeichnet. **(G+H)** Während der Embryogenese spezifiziert sich die Expression von *CRN* auf die Provaskulatur, das WAM (Pfeil) und das zukünftige SAM (\*). Größenstandard: A = 100 µm; B-E+G-H 50 µm; F = 20 µm.

### 3.2.2 *CLV2* ist im gesamten SAM, WAM sowie in der Vaskulatur exprimiert.

Die Expression von *CLV2* entspricht dem Expressionsmuster von *CRN*, ist jedoch schwächer, weshalb die Detektion der *CLV2*-Expression in früheren Stadien der Embryogenese nicht möglich war. Während der Embryogenese etabliert sich die Expression von *CLV2* im provaskulären Gewebe mit einem Maximum im embryonalen WAM (Abb. 10

A-C). Die Expressionsanalyse in der Wurzel zeigt neben der starken Fluoreszenz im proximalen WAM auch eine schwache *CLV2*-Expression im distalen Bereich (Abb. 10D, E). Die Bildung von Seitenwurzeln geht mit einer erhöhten *CLV2*-Expression einher (Abb. 10F, G). Innerhalb des SAM ist *CLV2* innerhalb der ZZ und PZ exprimiert. Diese Expression ist in allen drei Schichten sowie im OZ zu beobachten. Eine Expression in jungen Primordien ist mit dieser Reporterlinie nicht zu erkennen (Abb. 10H). Eine Expressionsanalyse von *CLV2* basierend auf RNA-*In-situ*-Hybridisierung ist bisher nicht publiziert. Die Verwendung des Promotorfragments zur Expression von *CLV2* führt zur Komplementation der *clv2*-Mutanten in allen isolierten Linien (Absatz 3.3.1).

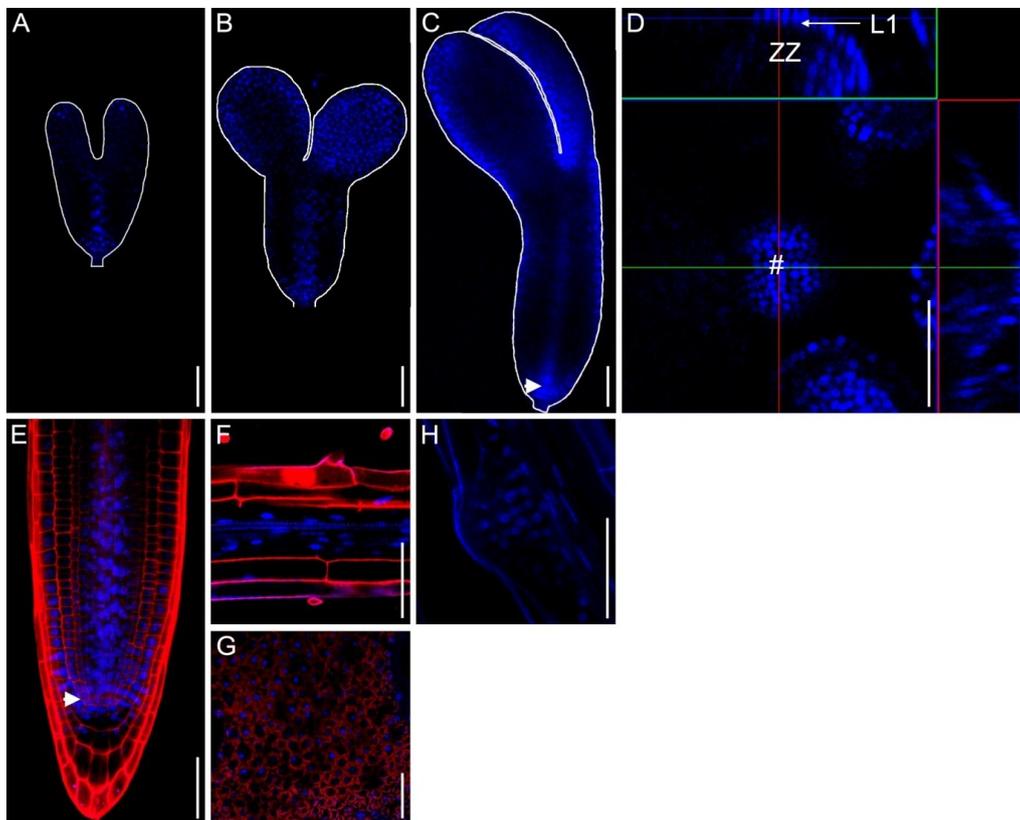


**Abb. 10 Expressionsanalyse von *CLV2***

(A-C) Lichtmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von Embryos einer *CLV2::mCherry-H2B*-Reporterlinie (183L9) deren Konturen durch eine weiße Umrandung gekennzeichnet wurde. Während der Embryogenese ist die *CLV2*-Expression ab dem Herzstadium im provaskulären Gewebe detektierbar, die während der postembryonalen Entwicklung aufrechterhalten wird. (A) frühes Torpedostadium. (B) Spätes Torpedostadium. (C) Bentkotyledonstadium (D-H) Konfokale Aufnahmen der *CLV2::mCherry-H2B*-Reporterlinie. (D-E) Wie *CRN* zeigt *CLV2* eine starke Expression im proximalen WAM, wobei eine schwache Expression auch im distalen Meristem zu beobachten ist. (F-G) Der Initiation von Seitenwurzeln folgt eine erhöhte Expression von *CLV2*. (H) Im SAM lässt *CLV2* eine spezifische Expression in der ZZ und PZ erkennen. Das RZ ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. Eine # kennzeichnet die ZZ, die von den Primordien (\*) umgeben ist. Größenstandard in A-C = 100  $\mu$ m; in D-H = 20  $\mu$ m.

### 3.2.3 *BAM1* zeigt eine PZ- und L1-spezifische Expression im SAM.

Die Expression von *BAM1* wurde mittels einer *BAM1::Cerulean-H2B*-Reporterlinie (*194L4*) analysiert. Während der Embryogenese zeigt *BAM1* eine vaskuläre und L1-spezifische Expression (Abb. 11A-C). Innerhalb des sich etablierenden WAMs ist eine starke Fluoreszenz in der Provaskulatur, dem RZ mit den umgebenden Initialen sowie der Kolumella zu beobachten. Dieses Expressionsmuster wird auch in der postembryonalen Entwicklung aufrechterhalten (Abb. 11E-G). Bereits nach wenigen Zellteilungen in der Seitenwurzelentwicklung ist eine Expression von *BAM1* detektierbar (Abb. 11H). Die Expressionsanalyse innerhalb des SAMs zeigt eine spezifische *BAM1*-Expression in der peripheren Zone sowie der L1 innerhalb der zentralen Zone. Diese Expression im SAM stimmt mit den publizierten Expressionsanalysen überein (DeYoung *et al.*, 2006).



**Abb. 11** Expressionsanalyse von *BAM1*.

Konfokalmikroskopische Expressionsanalyse von *BAM1* mittels einer *BAM1::Cerulean-H2B* (*194L4*)-Reporterlinie. (A-C) Während der Embryogenese ist Expression von *BAM1* ab dem Herzstadium im provaskulären Gewebe, der L1 und im sich etablierenden WAM detektierbar. Embryokonturen wurden durch eine weiße Umrandung gekennzeichnet. Die Expression wird während der postembryonalen Entwicklung aufrechterhalten. (D) Innerhalb des SAMs wird *BAM1* in der peripheren Zone sowie in der L1 der zentralen Zone exprimiert. # markiert die ZZ. (E) In der Wurzelspitze ist *BAM1* im gesamten meristematischen Bereich aktiv und reduziert sich im differenzierten proximalen Wurzelbereich auf die Vaskulatur und die Epidermis. Eine Pfeilspitze markiert das RZ. (F+H) Die Bildung von Seitenwurzeln geht ebenfalls mit *BAM1*-Expression einher. (G) Die L1-spezifische Expression beschränkt sich nicht nur auf die Wurzel und das SAM, sondern ist auch in den Blättern zu detektieren. Größenstandard = 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 *In-planta*-Lokalisations- und -Interaktionsstudie der Rezeptoren des CLV-Signalweges.

Auf der Basis der Untersuchung von Einzel- und Doppelmutanten ergaben sich verschiedene Modellvorschläge für potentielle Rezeptorkomplexe. Trotz der funktionellen Separierung von CLV2 und CRN von CLV1 konnte eine Kommunikation zwischen diesen Komplexen nicht ausgeschlossen werden. Ebenfalls ist unklar, ob eine direkte Interaktion zwischen CRN und CLV2 stattfindet. Um Einblick in die Komposition der CLV-Rezeptorkomplexe zu erhalten, wird eine *In-planta*-Proteininteraktionsstudie durchgeführt. Hierzu wird die Sequenz der Rezeptoren mit der Sequenz von bestimmten Fluorophoren (GFP oder mCherry) fusioniert, um Fusionsproteine in der Zelle zu exprimieren. Proteine, die mit einem Fluorophor markiert sind (hier eines mit GFP und eines mit mCherry), können zu einer subzellulären Lokalisationsstudie von Protein sowie durch eine Quantifizierung des Energietransfers zwischen den Fluorophoren (FRET-Effekt) zu einer Proteininteraktionsstudie verwendet werden (siehe Abschnitt 2.3 und 2.3.1).

#### 3.3.1 Die C-terminale Fusion eines Fluoreszenzproteins beeinflusst nicht die Funktionalität der Rezeptorproteine.

Die translationale Fusion von Fluorophoren an Proteinen kann einen negativen Einfluss auf deren Proteinfunktion haben. Sie kann Proteininteraktionen stören, die korrekte Proteinfaltung verhindern oder destabilisierend wirken. Um zu überprüfen, ob eine C-terminale Fusion eines Fluoreszenzproteins (FP) an die zu untersuchenden Rezeptoren inhibierend auf die CLV3-Signalweiterleitung wirkt, wurden Komplementationsexperimente mit entsprechenden Mutanten durchgeführt. Hierzu wurden jeweils drei Ansätze gewählt: die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen Promotors (*CLV1::CLV1-GFP/-mCherry*, *CLV2::CLV2-GFP/-mCherry*, *CRN::CRN-GFP*); die konstitutive Transgenexpression unter der Kontrolle des ‚*Cauliflower Mosaic Virus*‘ (*CaMV*)-35S-Promotors (*35S::CLV1-GFP/-mCherry*, *35S::CLV2-GFP/-mCherry*, *35S::CRN-GFP/-mCherry*) und die Expression mittels eines  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren *CaMV35S*-Promotors (*iCLV1-GFP/-mCherry*, *iCLV2-GFP/-mCherry*, *iCRN-GFP/-mCherry*).

Die Funktionalität der Fusionsproteine wurde durch Zählen der Karpellanzahl bestimmt, die die Aktivität des CLV-Signalweges im SAM widerspiegelt. Transgene Pflanzen, die *CLV1-FP*, *CLV2-FP* oder *CRN-FP* unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimierten, zeigten eine konstitutive Rettung des *clv*-Phänotyps. Dabei unterscheidet sich der prozentuale Anteil an rettenden Linien stark voneinander (Abb.

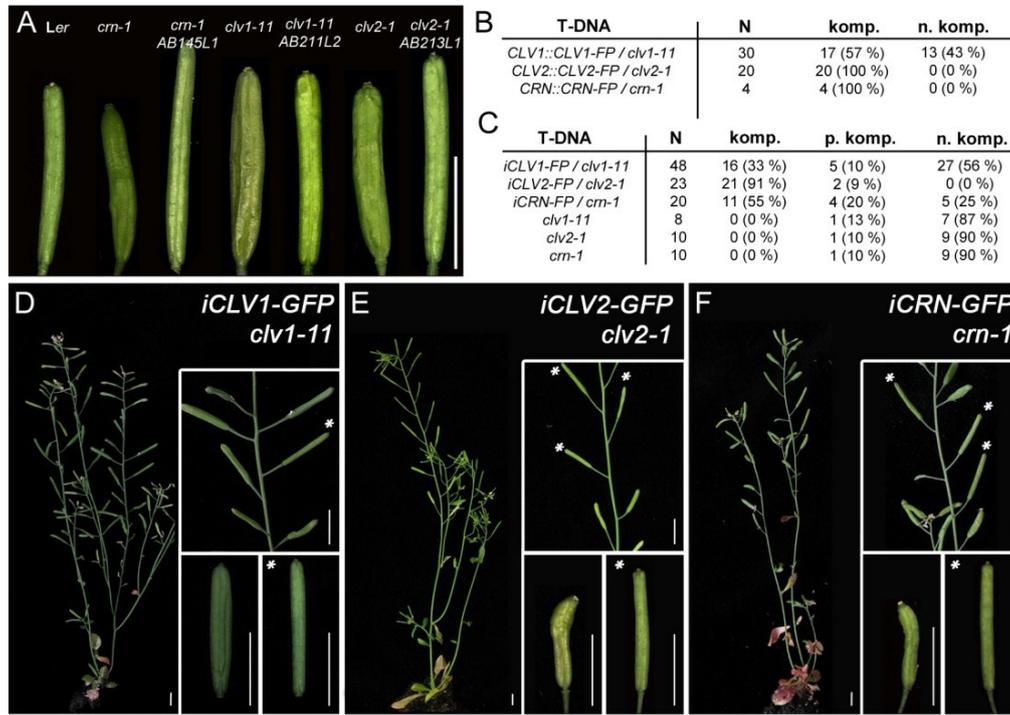
12A, B). Als rettend wurden die Pflanzen bezeichnet, deren Karpellmittelwert nicht signifikant von dem wildtypischer Pflanzen abwich (Abb. 12A, B). Alle *CLV2::CLV2-FP/clv2-1*-Pflanzen zeigten keine signifikante Abweichung in der Karpellanzahl vom WT. Im Gegensatz hierzu konnten nur 57 % der *clv1-11*-Pflanzen durch die inserierte T-DNA *CLV1::CLV1-FP* komplementiert werden (Abb. 12B). Dieser Unterschied in der Rettungseffizienz könnte auf die verwendeten Promotorbereiche zurückgeführt werden. Aufgrund der bisher fehlenden Reporterlinie kann über die Expressionsstärke und die Gewebespezifität des verwendeten CLV1-Promotorfragmentes keine Aussage getroffen werden. Vielleicht fehlen regulatorische Elemente, die für eine zur Rettung ausreichende Expressionsstärke, notwendig sind.

Im Fall von *CRN::CRN-GFP*-tragenden Pflanzen konnten bisher zu wenig Linien isoliert werden, um eine statistisch abgesicherte Auswertung durchführen zu können. Die vier isolierten Linien retten jedoch den Karpellphänotyp von *crn-1*-Pflanzen. Die für *CRN* und *CLV2* verwendeten Promotoren erlauben daher eine ausreichende Genexpression in den essentiellen Geweben, um eine Aktivierung des CLV-Signalweges zu ermöglichen.

Bei Verwendung des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors konnten keine geretteten Pflanzen identifiziert werden, in denen auch FP-Expression detektiert werden konnte. Ferner führte die Überexpression der Fusionsproteine im Wildtyp (wt) zur Bildung von keulenförmigen Schoten. Grund dafür ist wahrscheinlich ein „Silencing“ des Transgens sowie des endogenen Gens, verursacht durch die starke Überexpression in allen pflanzlichen Geweben. Aufgrund dieses Effekts wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

Die  $\beta$ -Estradiol-induzierte Transgenexpression in vier Wochen alten Pflanzen über einen Zeitraum von einer Woche (wobei jeden zweiten Tag induziert wurde) bewies ebenfalls die Funktionalität der Rezeptor-FP-Proteine. Da es sich um ein Induktionsexperiment handelt, wurden Pflanzen, die während des Induktionszeitraums zwei oder mehr Blüten mit zwei Karpellen gebildet hatten, als gerettet gewertet. Pflanzen, die nur eine Blüte mit zwei Karpellen bildeten, wurden als teilweise gerettet betrachtet. Dies trat mit sehr geringer Frequenz auch in den Kontrollpflanzen auf (Abb. 12C). 70 % der induzierten *iCLV2-FP/clv2-1*-Pflanzen bilden nur wt-Schoten, wohingegen induzierte *iCRN-FP/crn-1*- bzw. *iCLV1-FP/clv1-11*-Pflanzen meist zwei bis drei Blüten mit zwei Karpellen bilden (Abb. 12D-F). Unter den gegebenen Wachstumsbedingungen bildet ein SAM ca. zwei Blütenprimordien pro Tag (Smyth *et al.*, 1990). Dies lässt darauf schließen, dass im Fall von *iCRN-FP* und *iCLV1-FP* innerhalb der ersten 24 h nach Induktion zwei bis drei Blütenprimordien mit funktionalem CLV-Signalweg angelegt wurden. Der CLV-Signalweg

von *iCLV2-FP*-Pflanzen war dagegen über den gesamten Induktionszeitraum aktiv (Abb. 12C-F). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei Verwendung eines konstitutiven Promotors ist davon auszugehen, dass die Funktionalität der Rezeptoren vom Expressionslevel abhängt.



**Abb. 12 Komplementation von *clv/crn*-Mutanten mittels Rezeptor-FP-Fusionsproteinen.**

(A) Die Expression der Rezeptor-FP Fusionsproteine unter der Kontrolle des eigenen Promotors führte zur Aktivierung des CLV-Signalweges, wodurch die Karpellanzahl von vier auf zwei Karpelle reduziert wurde. *AB145L1* = *CRN::CRN-GFP* in *crn-1*; *AB213L1* = *CLV2::CLV2-GFP* in *clv2-1*; *AB211L1* = *CLV1::CLV1-GFP* in *clv1-11*. (B) Komplementationshäufigkeit der inserierten rezeptor-FP-exprimierenden T-DNAs unter der Kontrolle des endogenen Promotors. Als komplementierend (komp.) wurden die Pflanzen gewertet, deren Karpellanzahl ( $N > 6$ ) sich nicht signifikant vom WT unterscheidet. Student T-Test mit  $p < 0.005$ . (C) Rettungshäufigkeit der inserierten Rezeptor-FP T-DNAs unter der Kontrolle eines  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren *CaMV35S*-Promotors. Als komp. wurden die Pflanzen gewertet, die  $\geq 2$  Schoten mit 2 Karpellen gebildet haben. Als partiell komplementiert (p. komp.) wurden die Pflanzen gewertet, die eine Schote mit zwei Karpellen bildeten. (D-F) Rettung des Karpellphänotyps von *clv*-Mutanten durch einwöchige  $\beta$ -Estradiol-induzierte Transgenexpression. Schoten mit einer wildtypischen Karpellanzahl sind mit einem \* gekennzeichnet. Die Expression von *CLV1-GFP* (D) bzw. *CRN-GFP* (F) führt zur Bildung von zwei bis drei Schoten mit zwei Karpellen, wohingegen *CLV2-GFP*-Expression (E) zur Bildung von  $\sim 10$  Schoten mit zwei Karpellen führt. Größenstandard = 1 cm.

Neben der Analyse der Aktivität des CLV-Signalweges im SAM wurde im Fall von *CLV2::CLV2-GFP* und *CRN::CRN-GFP* ebenfalls ein Funktionstest im WAM durchgeführt. Der Funktionsverlust von CLV2 oder CRN bewirkt eine Insensitivität des proximalen WAMs gegenüber CLE-Peptidbehandlung (siehe Abschnitt 1.1.4 und 1.2.2). Um die Proteinfunktion von CRN-GFP im WAM zu testen, wurde eine rettende *CRN::CRN-GFP*-Linie (*AB145L1*) auf 1  $\mu$ M CLV3-Peptid enthaltenden GM-Platten ausgelegt (Abb. 7K). Die Behandlung mit

CLV3-Peptid führte zur Bildung von verkürzten Wurzeln. Diese Komplementation des induzierbaren Wurzel Phänotyps von *crn-1* beweist somit die Funktionalität des exprimierten *CRN-GFP*-Fusionsproteins im proximalen WAM.

Diese Komplementationstests zeigen, dass die C-terminale Fusion eines FP an CLV1, CLV2 oder CRN keinen negativen Einfluss auf deren Proteinfunktion ausübt und deshalb Lokalisationsstudien und Interaktionsstudien die *In-vivo*-Situation widerspiegeln. Des Weiteren konnte angedeutet werden, dass der Expressionslevel ein entscheidendes Kriterium für die Funktionalität der Rezeptoren ist.

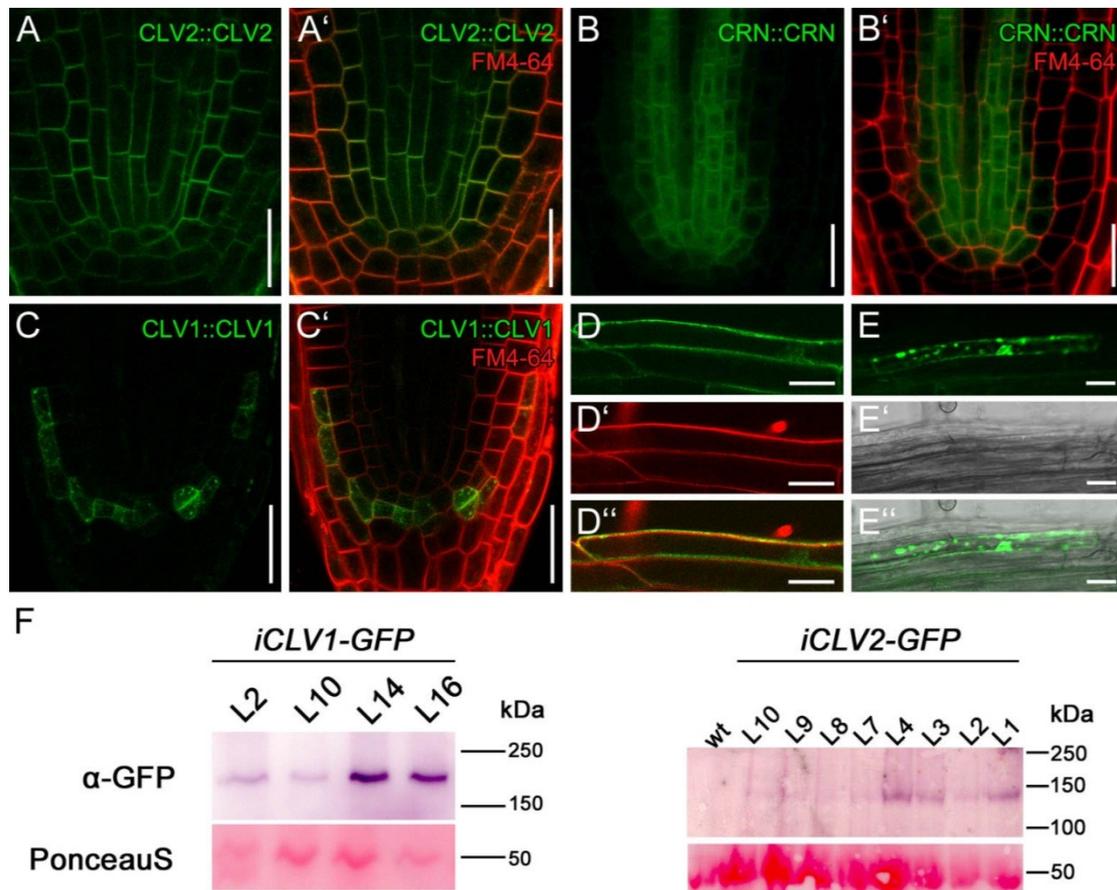
### 3.3.2 CLV1, CLV2 sowie CRN zeigen eine PM-Lokalisation in *Arabidopsis*.

Für eine Proteinlokalisationsstudie wurden zunächst die transgenen *Arabidopsis*-Linien analysiert, die ein funktionales *CLV1-GFP*, *CLV2-GFP* oder *CRN-GFP* unter der Kontrolle des endogenen Promoters exprimieren. Alle drei Reporterlinien zeigen eine sehr schwache Fluoreszenz, durch die Detektionsgrenze des konfokalen Mikroskops bedingt ist. Die Expressionsstudie von *CRN::CRN-GFP* und *CRN::CLV2-GFP* entspricht der zuvor beschriebenen *CRN::mCherry-H2B*- bzw. *CLV2::mCherry-H2B*-Reporterlinie.

CRN-GFP kolokalisiert mit dem PM-spezifischen Farbstoff FM4-64 (Invitrogen™) und zeigt zudem eine starke Fluoreszenz im ER (Abb. 13B-B'). Die stärkste Fluoreszenz ist hierbei in der Stele des proximalen WAMs zu beobachten. Eine schwache GFP-Fluoreszenz ist auch im RZ zu sehen. CLV2-GFP kolokalisiert ebenfalls mit FM4-64 an der PM (Abb. 13A-A'), und ist hierbei im gesamten WAM exprimiert. Eine erhöhte Expression ist in der Stele des proximalen Meristems zu detektieren. In zehn der CLV2-GFP exprimierenden Linien konnte neben der Fluoreszenz an der PM auch eine starke ER-Fluoreszenz beobachtet werden. Eine *CLV1*-Expression in der Wurzel ist bisher noch nicht beschrieben. Die isolierten *CLV1::CLV1-GFP*-Linien zeigen eine spezifische *CLV1*-Expression in den Initialen der Kolumella sowie einigen Epidermiszellen (sichtbar in 20 von 22 isolierten Linien). Die PM-Lokalisation von CLV1 konnte durch die Kolokalisation mit dem FM4-64-Farbstoff bestätigt werden (Abb. 13C-C'). Zudem ist GFP-Fluoreszenz in Vesikeln zu beobachten. Aufgrund der geringeren Quantenausbeute von mCherry konnten keine Linien isoliert werden, die eine ausreichend starke Rezeptor-mCherry-Fluoreszenz aufwiesen.

Die Estradiol-induzierte Expression der Rezeptoren unter der Kontrolle eines *CaMV35S*-Promotors führt nur im Fall von *CLV1* zu einer detektierbaren *CLV1-GFP*-Expression (Abb. 13D-D'). Im Fall von *CRN-GFP* oder *CLV2-GFP* konnte nur selten oder nie eine Expression beobachtet werden, obwohl die verwendeten Linien die Mutante

komplementierten. Außerdem konnte das CLV2-GFP- und CLV1-GFP-Fusionsprotein in induzierten *Arabidopsis*-Linien mittels einer Western Blot-Analyse durch einen GFP-Antikörper detektiert werden (Abb. 13F). Dies machte eine *In-vivo*-Proteininteraktionsstudie unmöglich. Eine Rezeptorlokalisationsstudie im SAM schlug bisher aufgrund der zu geringen Fluoreszenz fehl.



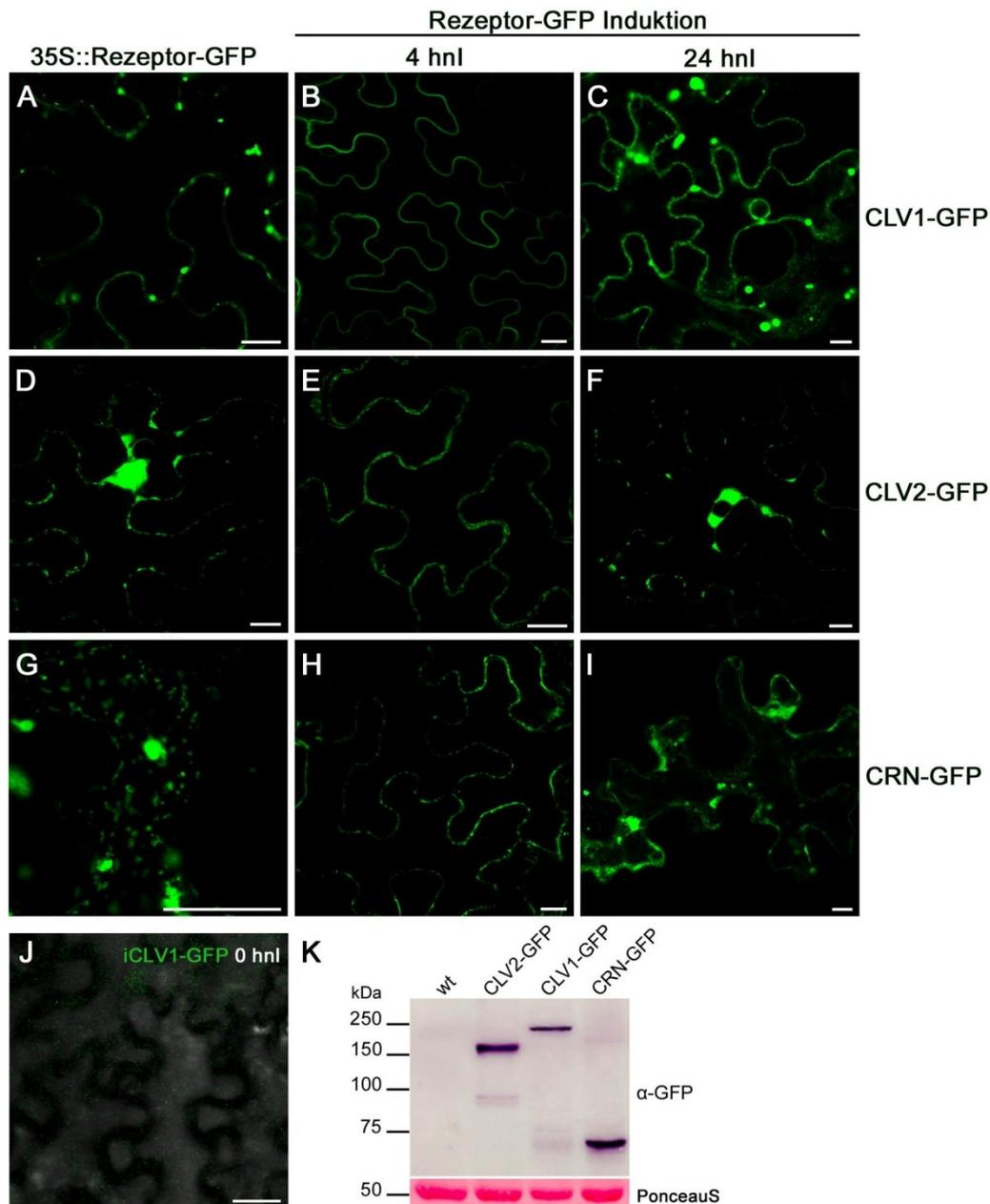
**Abb. 13 Lokalisation von CLV1-GFP, CLV2-GFP und CRN-GFP in *Arabidopsis thaliana*.**

(A-C') Lokalisationsstudie von Rezeptor-GFP-Fusionen unter der Kontrolle des eigenen Promotors im WAM (7 TnK). (A-A') *CLV2-GFP* (213L2) wird im gesamten WAM exprimiert und kolokalisiert mit FM4-64 in der PM. (B-B') *CRN-GFP* (145L1) wird im proximalen WAM exprimiert, kolokalisiert mit FM4-64 in der PM und zeigt starke Fluoreszenz im ER. (C-C') *CLV1-GFP* (211L3) wird in den Kolumellainitialen sowie in wenigen Epidermiszellen exprimiert und kolokalisiert mit FM4-64 in der PM. Ebenso ist eine starke Fluoreszenz in Vesikeln zu erkennen. Größenstandard = 20  $\mu$ M (D-D'') Induzierte *CLV1-GFP*-Expression acht Stunden nach Induktion (SnI) in Epidermiszellen der Wurzel. *CLV1-GFP* kolokalisiert mit dem FM4-64-Farbstoff in der PM. (E-E'') 36 SnI sind große fluoreszierende Aggregate in den Zellen sichtbar. (F) Western Blot-Analyse von induzierten *iCLV1-GFP*- und *iCLV2-GFP*-Pflanzen (12 SnI). In den getesteten Linien wird eine spezifische Bande bei ~180 kDa bzw. ~140 kDa sichtbar, die durch die Bindung des GFP-Antikörper bedingt ist. Zum Vergleich der aufgetrennten Proteinmenge ist die PonceauS-gefärbte Ribulosebiphosphatcarboxylase (Rubisco)-Bande dargestellt.

### 3.3.3 In den Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* ist die PM-Lokalisation von CRN und CLV2 jeweils abhängig von dessen Koexpression.

Aufgrund der schwachen Expression in *Arabidopsis* wurde für eine genauere Lokalisation- und Interaktionsstudie ein heterologes System, *Nicotiana benthamiana*, gewählt. In diesem System erfolgt die Expressionsanalyse in Blattepidermiszellen, was die Verwendung eines ubiquitär exprimierenden Promotors voraussetzt. Die Komplementationsstudien zeigten, dass die Expressionsstärke für die Proteinfunktion eine entscheidende Rolle spielt, da eine konstitutive Überexpression bzw. eine induzierte Überexpression keine bzw. nur eine kurzzeitige Aktivierung des CLV-Signalweges ermöglichte (siehe Abschnitt 3.3.1). Die transiente Expression der GFP-gekoppelten Rezeptoren unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promotors führt zur Bildung von großen fluoreszierenden Aggregaten (Abb. 14 A, D, G). In *CLV1-GFP* exprimierenden Blattepidermiszellen sind große globuläre Aggregate sichtbar, die im Fall von CLV2-GFP und CRN-GFP eher „wolkig“ aussahen. Um die Proteinkonzentration in der Zelle steuern zu können, wurde zu einem  $\beta$ -Estradiol-induzierbaren Expressionssystem gewechselt (Zuo *et al.*, 2000). Hierzu wurden verschiedener Fluorophore in den 3'-Bereich der Gatewaykassette des pMDC7 inseriert. Die ermöglicht eine induzierte Expression eines C-terminal-markierten Fusionsproteins.

*CLV1-GFP* exprimierende Zellen zeigten vier Stunden nach Induktion (4 SnI) eine gleichmäßige Fluoreszenz an der PM und in den Vesikeln (Abb. 14B). Die PM-Lokalisation konnte durch die Kolokalisation mit FM4-64 bestätigt werden (Abb. 15 A-A''). *CLV1-GFP*-Vesikel kolokalisieren nur teilweise mit dem FM4-64, was auf eine kontrollierte Vesikelbildung von CLV1 hindeuten könnte, da nicht jeder neu gebildete FM4-64-markierte Vesikel auch CLV1-GFP enthielt (Abb. 15 G-G''). Die durch konstitutive Expression erzielte Aggregatsbildung erschien auch bei der induzierten Expression in *N. benthamiana*-Epidermiszellen nach ca. 12 h (Abb. 14C). Diese Aggregation von CLV1-GFP konnte auch in den induzierten Wurzelzellen von *Arabidopsis* beobachtet werden (Abb. 13E-E''). CLV2-GFP und CRN-GFP zeigten keine gleichmäßige Fluoreszenz an der PM, sondern ein diffuseres GFP-Signal neben der PM, was für ER-lokalisiertes Protein typisch ist (Abb. 14E, H). Die ER-Lokalisation ließ sich durch die Färbung mit FM4-64 und die Koexpression mit der ER-spezifischen Reporterlinie ER-rb (Nelson *et al.*, 2007) bestätigen (Abb. 15 C-F'').



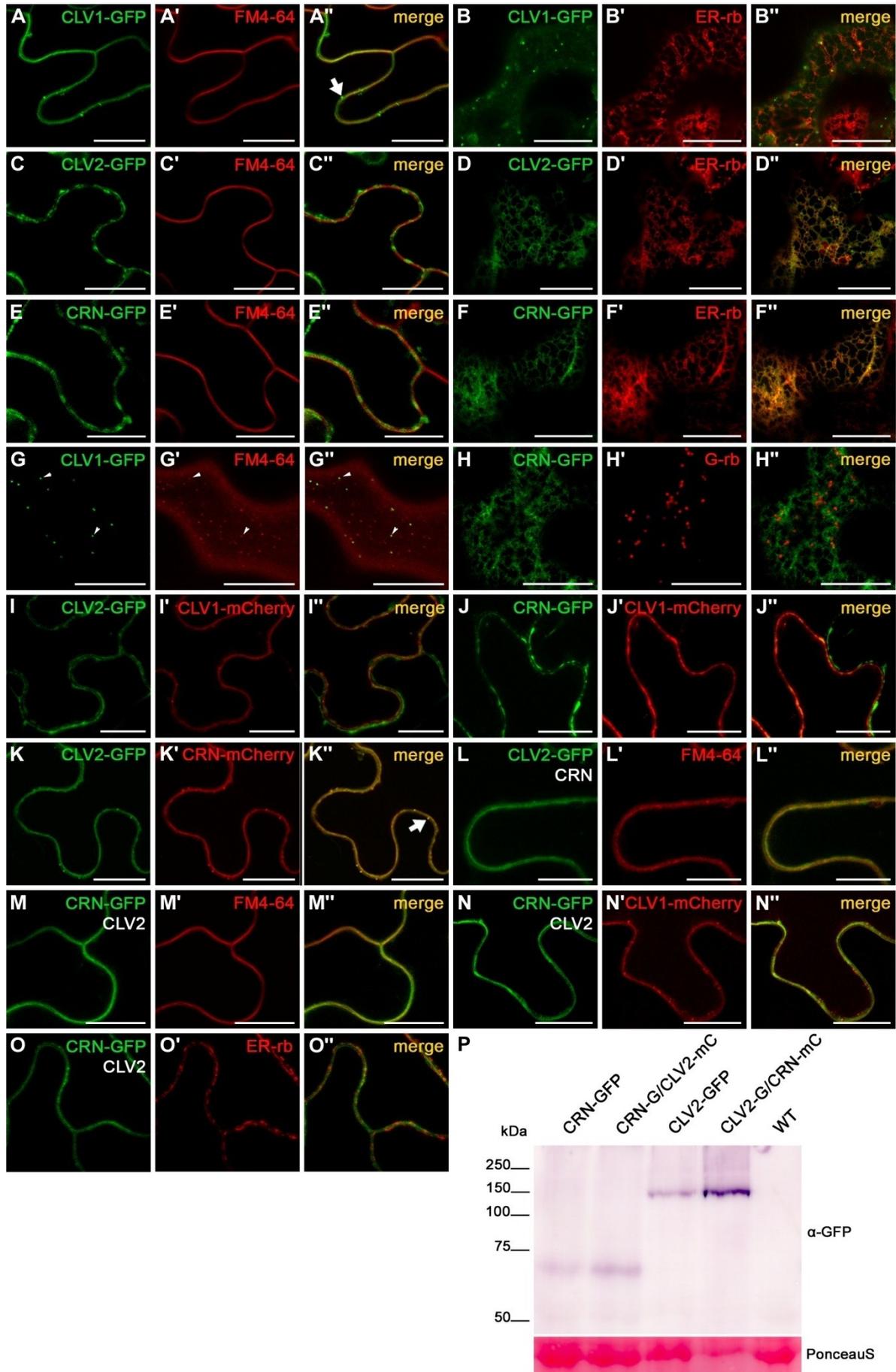
**Abb. 14 Vergleich der Lokalisation von Rezeptor-GFP-Fusionsproteinen unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors.**

Transiente Expression der Rezeptor-GFP-Fusionsproteine in *Nicotiana benthamiana*-Blattepidermiszellen. **(A,D,G)** Expression von *CLV1-GFP*, *CLV2-GFP* und *CRN-GFP* unter der Kontrolle des *CaMV35S* Promotors zwei Tage nach der durch das Agrobakterium vermittelten Transformation. Die Rezeptoren bilden große fluoreszierende Aggregate. **(B,E,H)** Expression der Rezeptor-GFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Estradiol-induzierbaren Promotors zwei Tage nach Transformation und vier Stunden nach Induktion (4 SnI). Die gleichmäßige Fluoreszenz der PM in *CLV1-GFP* exprimierenden Zellen unterscheidet sich von der eher diffuseren, lückenhaften Fluoreszenz in *CLV2-GFP* oder *CRN-GFP* exprimierenden Zellen, die auf eine ER-Lokalisation dieser beiden Proteine hindeutet. **(C,F,I)** Expression der Rezeptoren über einen längeren Zeitraum (24 SnI) führt zur Bildung der zuvor beschriebenen Aggregate. **(J)** Nicht induzierte *iCLV1-GFP*-Blattepidermiszellen. **(K)** Die Stabilität der exprimierten Fusionsproteine in *N. benthamiana* konnte durch eine Western Blot-Analyse gezeigt werden. Eine distinkte Proteinbande wurde durch den verwendeten GFP-Antikörper detektiert. *CLV1-GFP* (138 kDa), *CLV2-GFP* (110 kDa) *CRN-GFP* (75 kDa). Zum Vergleich der aufgetrennten Proteinmenge ist die PonceauS-gefärbte Rubisco-Bande dargestellt. Größenstandard = 20  $\mu$ m.

Eine Kolokalisationsstudie mit dem Golgi-Marker G-rb (Nelson *et al.*, 2007) zeigte, dass CLV2 (nicht dargestellt) oder CRN das ER über den Golgi-Apparat in nicht detektierbarer Menge verlässt (Abb. 15 H-H''). Diese ER-Lokalisation veränderte sich nicht in Abhängigkeit vom Induktionszeitraum und kann somit nicht auf einen Effekt der Proteinkonzentration zurückgeführt werden.

Die aggregierenden CLV2- und CRN-Proteine werden nach ca. 12 h sichtbar und sind auf eine Verklumpung der Proteine im ER zurückzuführen. Die globulären Aggregate in CLV1 hingegen sind wahrscheinlich auf eine Verklumpung von Vesikeln zurückzuführen (Abb. 14C, F, I). Die Western Blot-Analyse zeigt, dass die Rezeptor-GFP-Fusionsproteine stabil exprimiert werden, da jeweils nur eine spezifische Bande zu erkennen ist (Abb. 14J). CLV1-GFP hat eine errechnete Größe von 138 kDa, CLV2-GFP von 110 kDa und CRN-GFP von 75 kDa. Die detektierten Proteinbanden sind im Fall von CLV1 und CLV2 bei einer etwas größeren Masse zu erkennen, als die Aminosäurezusammensetzung vermuten lässt. Dies ist wahrscheinlich auf posttranslationale Proteinmodifikationen, wie Glykosylierung, zurückzuführen, was bereits für andere LRR enthaltende Rezeptoren beschrieben wurde (Jin *et al.*, 2007). Da für jedes Fusionsprotein nur eine spezifische Bande im Western Blot zu detektieren war, ist eine ER-Zurückhaltung aufgrund verringerter Proteininstabilität ausgeschlossen.

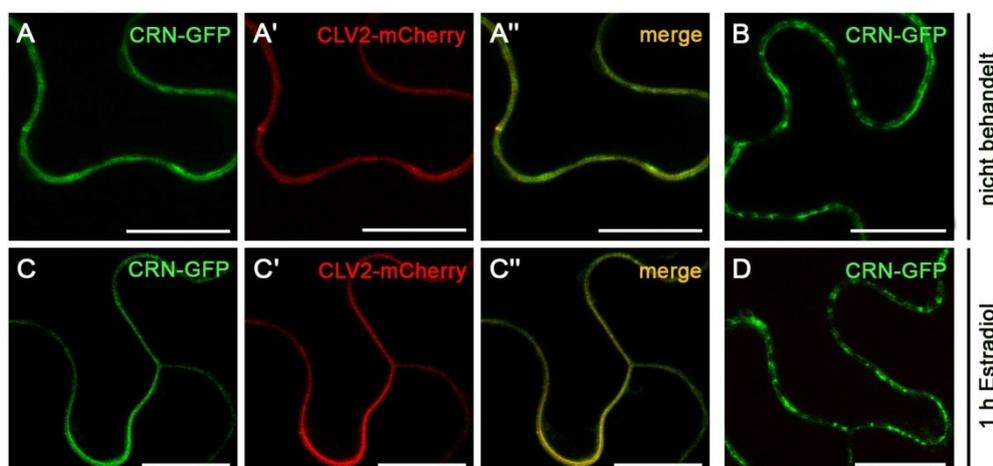
Es folgte eine Kolokalisationsstudie der einzelnen Rezeptoren miteinander. Wie erwartet, zeigt die Koexpression von CLV1 mit CLV2 oder CRN keine Kolokalisation (Abb. 15I-J''). Die Koexpression von CLV2 und CRN hingegen führte zu einer Translokation der Proteine zur PM und zur Bildung von Transportvesikeln (Abb. 15K-K''). Um diese Änderung in der Proteinlokalisierung mit den bereits zuvor verwendeten Markern zu bestätigen, wurde jeweils ein nicht markiertes CRN oder CLV2 mit einem GFP-markierten CLV2 bzw. CRN koexprimiert. Die Färbung dieser CLV2 und CRN koexprimierenden Zellen mit dem FM4-64-Farbstoff sowie deren Koexpression mit dem ER-Marker ER-rb bestätigten die Abhängigkeit der PM-Lokalisation der Proteine von deren Koexpression (Abb. 15L-M'' und O-O''). Durch eine Western Blot-Analyse von koexprimierenden und einzeln exprimierenden Blättern konnte neben der Lokalisationsänderung auch eine erhöhte Proteinkonzentration festgestellt werden. So ist in koexprimierenden Zellen mehr GFP-markiertes Protein (CLV2-GFP oder CRN-GFP) zu detektieren (Abb. 15P). Eine Kolokalisation von CRN oder CLV2 mit CLV1 kann nur durch die Expression aller Rezeptoren erzielt werden (Abb. 15 N-N'').



### Abb. 15 Zelluläre Lokalisationsstudie von CLV1, CLV2 und CRN.

Induzierte transiente Expression der fluorophorgekoppelten Rezeptoren in *N. benthamiana*-Blattepidermiszellen (4-8 SnI). Dargestellt sind konfokale optische Querschnitte durch die Mitte der Zelle (A-A'', C-C'', E-E'' und I-O'') und unterhalb der oberen Zellwand (B-B'', D-D'', F-F''). (A-A'', C-C'', E-E'', G-G'' und L-M'') zeigen eine Kolokalisationsstudie der Rezeptor-FP Fusionsproteine mit dem PM-spezifischen Farbstoff FM4-64. (B-B'', D-D'', F-F'', H-H'' sowie O-O'') zeigen Kolokalisation der Rezeptor-FP-Proteine mit dem mCherry-gekoppelten ER-Markerprotein ER-rb. (H-H'') zeigt die Kolokalisation von CRN-GFP mit dem mCherry gekoppelten Golgi-Markerprotein G-rb. (A-A'') CLV1-GFP lokalisiert an der mittels FM4-64 markierten PM, (G-G'') und in Vesikeln (mit Pfeilspitzen gekennzeichnet). (B-B'') Nur eine schwache GFP-Fluoreszenz ist ebenfalls im ER zu erkennen. (D-D'' und F-F'') CRN-GFP und CLV2-GFP zeigen diese PM-Lokalisation nicht, sondern eine starke Kolokalisation mit ER-rb. (H-H'') CRN-GFP gelangt nicht in den Golgi-Apparat, sondern wird im ER zurückgehalten. (K-M'' und O-O'') Die Koexpression von CRN mit CLV2 führt zu dessen Translokation zur PM mit der Bildung von Transportvesikeln. (I-J'') Diese Relokalisation kann nicht durch die Koexpression von CRN oder CLV2 mit CLV1 bewirkt werden. (N-N'') Nur die Expression aller drei Rezeptoren führt zur Kolokalisation von CLV1 mit CLV2 oder CRN an die PM. (P) Western Blot-Analyse von Proteinextrakten aus *N. benthamiana*-Blättern, die CRN (75 kDa) oder CLV2 (110 kDa) alleine oder zusammen exprimierten. Zum Nachweis der Fusionsproteine wurde ein GFP-Antikörper verwendet. Zum Vergleich der aufgetrennten Proteinmenge ist die Ponceaus-gefärbte Rubisco-Bande dargestellt. Größenstandard = 20 µm.

Die Behandlung mit dem Steroid  $\beta$ -Estradiol könnte zu einer veränderten Zusammensetzung der PM führen, was einen negativen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine haben könnte. Um auszuschließen, dass die Ursache für die ER-Zurückhaltung von CRN und CLV2 die Behandlung mit Steroiden ist, wurden die Rezeptoren unter der Kontrolle des konstitutiven *CaMV35S*-Promoters exprimiert (Abb. 16A-B). Auch die konstitutive Expression von *CLV2* und *CRN* führte zur Zurückhaltung im ER und zur Translokation an die PM, wenn sie koexprimiert wurden. Dieser Effekt verändert sich auch nicht durch die Behandlung mit  $\beta$ -Estradiol (Abb. 16C-D). Dies schließt aus, dass der verwendete Induktor  $\beta$ -Estradiol Ursache dieses Effektes ist.



### Abb. 16 PM Lokalisationsabhängigkeit von CRN und CLV2 ist nicht $\beta$ -Estradiol-induziert.

Transiente Expression von Rezeptor-FP-Fusionsproteinen in *N. benthamiana*-Blattepidermiszellen unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promoters. (A-B) Proteinlokalisierung in Zellen, die nicht mit  $\beta$ -

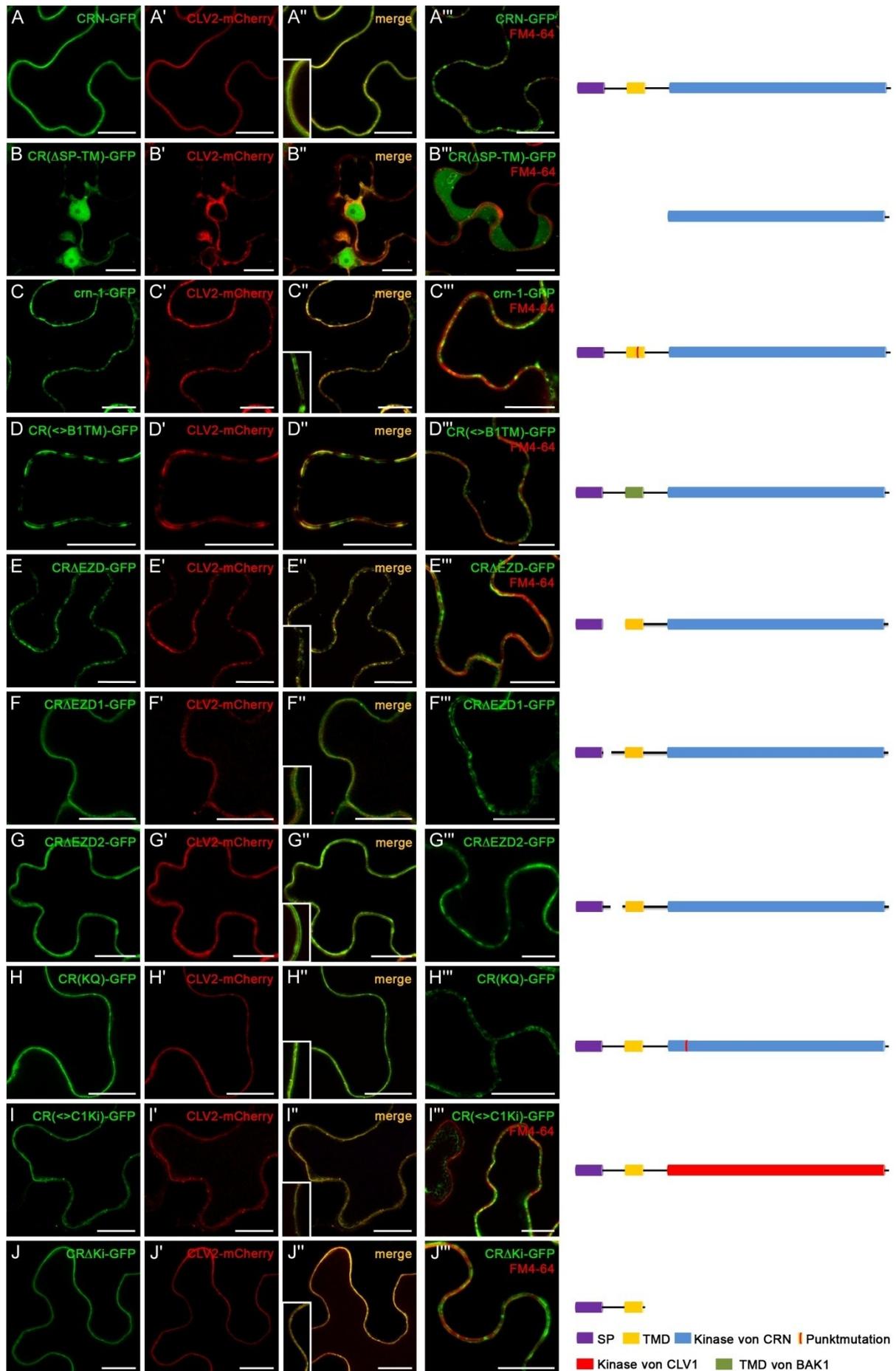
Estradiol behandelt wurden. (C- D) Proteinlokalisierung in Zellen eine Stunde nach Behandlung mit  $\beta$ -Estradiol. (A-A'') und (C-C'') Koexpression von *CRN* und *CLV2*. (B+D) Expression von *CRN-GFP* alleine. Die zelluläre Lokalisation von CRN-GFP verändert sich nicht durch Estradiolbehandlung. (A-A'' und C-C'') CRN-GFP lokalisiert an der PM, wenn *CLV2* koexprimiert ist und wird sonst im ER zurückgehalten (B und D). Größenstandard = 20  $\mu$ m.

### 3.3.4 Der Transport von CRN und CLV2 an die PM ist abhängig von der TMD sowie der EZD von CRN.

Um den Mechanismus der ER-Zurückhaltung von *CLV2* und *CRN* zu analysieren, wurden verschiedene Derivate erzeugt und deren Lokalisation bei Einzel- und Koexpression untersucht. Die Kinasefunktion oder die Kinasedomäne von *CRN* ist an dem Mechanismus der ER-Zurückhaltung oder PM-Translokation bei Koexpression nicht beteiligt. Der Austausch der Kinasedomäne gegen die Kinasedomäne von *CLV1* (CR(<>C1Ki)), der Austausch des an der ATP Bindung beteiligten Lysins (K) innerhalb der Kinasedomäne (CR(KQ)), die Deletion dieser Domäne (CR $\Delta$ Ki) oder die cytoplasmatische Expression der Kinasedomäne (CR( $\Delta$ SP-TM)) haben keinen Effekt auf die Proteinlokalisierung. Diese *CRN*-Derivate bleiben, mit Ausnahme von CR( $\Delta$ SP-TM), bei alleiniger Expression im ER oder lokalisieren an der PM, wenn *CLV2* koexprimiert wird (Abb. 17 B-B'''; H-J''').

Die Expression des in den *crn-1*-Pflanzen gebildeten Proteins führte zur ER-Zurückhaltung von *crn-1* auch bei Koexpression von *CLV2* (Abb. 17C-C'''). Vereinzelt sind in den *crn-1/CLV2* exprimierenden Zellen Vesikel sichtbar, was darauf hindeutet, dass die Punktmutation den PM-Transport nicht komplett inhibiert. Die Deletion der extrazellulären Domäne (EZD) von *CRN* (CR $\Delta$ EZD), sowie der Austausch der Transmembrandomäne (TMD) gegen die TMD von BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE (BAK1), einem Rezeptor des Brassinosteroid-Signalweges (CR(<>B1TM)), führt zu einer konstitutiven ER-Zurückhaltung von *CRN* trotz Koexpression von *CLV2*.

Durch Unterteilung der EZD von *CRN* in zwei Bereiche und deren Deletion (CR $\Delta$ EZD1 und CR $\Delta$ EZD2) konnte kein Effekt auf die Lokalisationsabhängigkeit von *CRN* und *CLV2* festgestellt werden. Dies könnte andeuten, dass ein Teil der EZD von *CRN* ausreicht, um einen ER-Export zu vermitteln. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Deletion der gesamten EZD einen negativen Effekt auf die Proteinfaltung ausübt und deshalb das Protein das ER nicht verlassen kann. Die Western Blot-Analyse der exprimierten *CRN*-Derivate schloss jedoch einen Effekt auf die Proteinstabilität aus, da bei den getesteten Derivaten eine deutliche Bande mit der erwarteten Größe zu detektieren war (auszugsweise in Abb. 18G dargestellt). An dieser Stelle kann ein Effekt der Deletion auf die Proteinfaltung nicht ausgeschlossen werden.

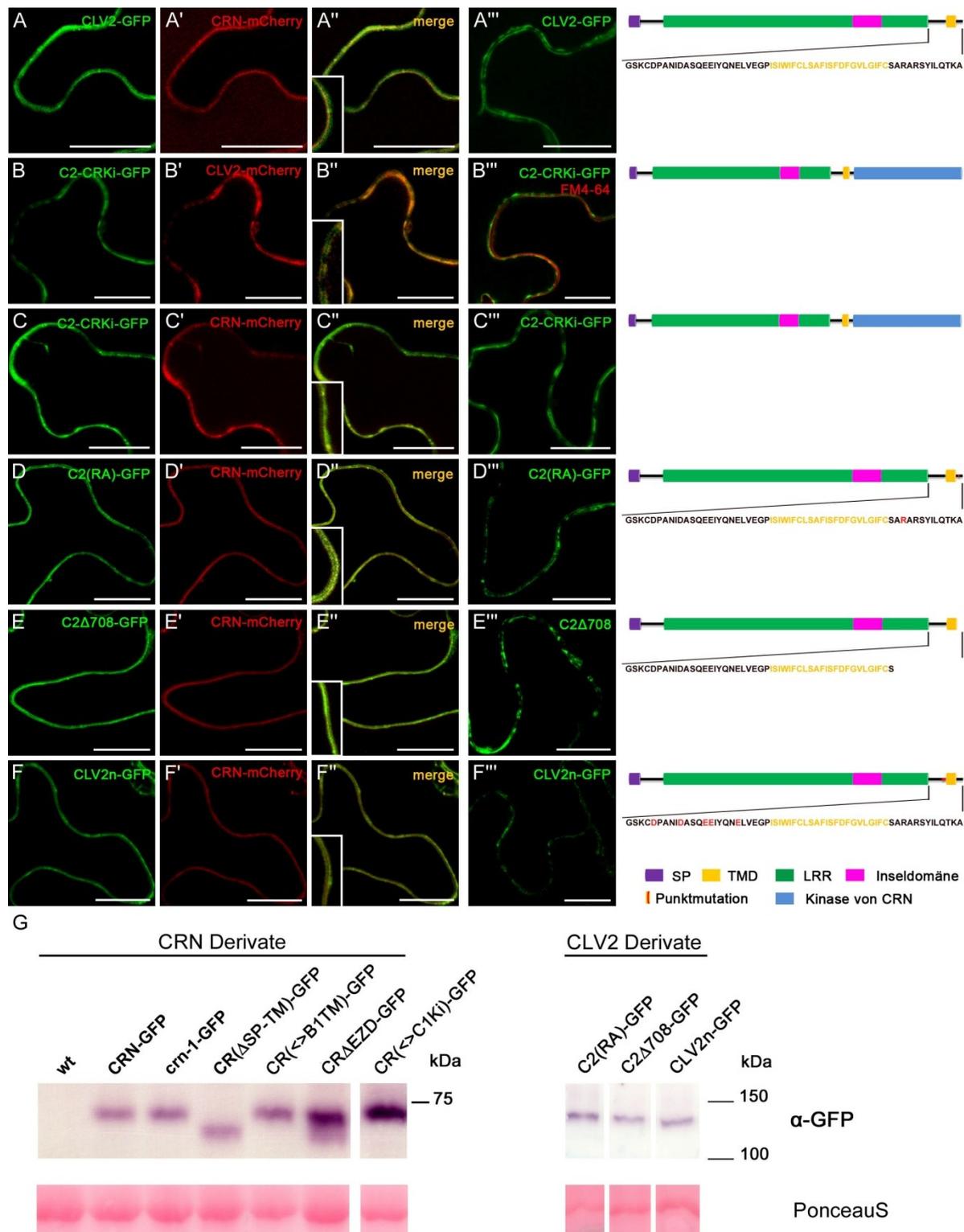


**Abb. 17 Der Mechanismus der PM-Translokation von CRN und CLV2 wird beeinflusst durch die TMD und der EZD von CRN.**

Induzierte transiente Transgenexpression von *CRN*-Derivaten in *N. benthamiana*-Blattepidermiszellen (4-8 SnI). Spalte 1-3 Lokalisation der CRN-GFP Derivate in CLV2-mCherry koexprimierenden Zellen. Spalte 4 Lokalisationen der CRN-GFP Derivate in Abwesenheit von CLV2. Spalte 5 Proteinmodelle des in der Zeile dargestellten CRN-Derivats. (A-A'') CRN lokalisiert nur in Anwesenheit von CLV2 an der PM und wird sonst im ER zurückgehalten. (B-B'') Die cytoplasmatisch lokalisierte Kinasedomäne von CRN führt nicht zur PM-Lokalisation von CLV2. (C-E'') Der Verlust der extrazellulären Domäne (EZD) von CRN, die Punktmutation in der Transmembrandomäne (TMD) in *crn-1*-Mutanten und der Austausch der TMD führt zur Zurückhaltung von CRN im ER, auch in Anwesenheit von CLV2. (F-G'') Eine partielle Deletion der EZD bewirkt die ER-Zurückhaltung in Anwesenheit von CLV2 jedoch nicht. (H-J'') Der Verlust der Kinasefunktion oder deren Deletion hat keine Auswirkungen auf die Relokalisation der CRN/CLV2-Proteine bei Koexpression oder auf die ER-Zurückhaltung in Abwesenheit von CLV2. Proteinmodell: SP = Lila; TMD von CRN = Gelb; TMD von BAK1 = Grün; Kinase von CRN = Blau; Kinase von CLV1 = Rot; Punktmutationen = Rot; Proteinsequenzen mit unbekannter Struktur = Schwarz. Größenstandard = 20 µm.

Die Analyse der Proteinsequenz von CLV2 ergab zunächst keinen Hinweis auf den Mechanismus der ER-Zurückhaltung (Abb. 18). Auf der cytoplasmatischen Seite befindet sich jedoch ein potentiell RXR-Motiv, das im Fall des K<sup>+</sup>(ATP)-Kanals, wie auch bei der Bildung des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors, zur Zurückhaltung der einzelnen Untereinheiten im ER führt. Erst durch Abschirmung des RXR-Motives durch einen vom Interaktionspartner gebildeten Leucin-Zipper findet der Transport an die PM statt (Zerangue *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 2001). Durch Alanin-Substitution (C2(RA)) sowie die Deletion (C2Δ708) der in dem RXR-Motiv enthaltenen AS konnte eine Funktion dieser AS in der ER-Zurückhaltung von CLV2 ausgeschlossen werden (Abb. 18D-E''). Kein CLV2-Derivat zeigt eine veränderte Proteinlokalisierung bei Einzel- oder Koexpression.

CLV2 wie auch CRN enthalten sehr stark entgegengesetzt geladene EZDs. Die Bestimmung des pI von 28 extrazellulär gelegenen AS, was der Größe der EZD von CRN entspricht, ergab im Fall von CRN einen pI von 11.6 und im Fall von CLV2 einen pI von 3.7. Diese entgegengesetzten Ladungen könnten zu einer Zusammenlagerung dieser Proteinbereiche führen, an der andere Proteine, die den Export des Proteinkomplexes regulieren, binden können. Eine Neutralisierung dieses Proteinbereichs sollte somit die PM-Translokation des Proteinkomplexes inhibieren. Hierzu wurden zunächst in CLV2 fünf negativ geladene Aminosäuren (Asparagin oder Glutamin) gegen ein Alanin ausgetauscht (AS D664 D670 E673 E674 E679). Die Analyse dieses CLV2-Derivats (CLV2n) ergab jedoch keine Veränderung in der ER-Zurückhaltung und Translokation durch Koexpression von CRN (Abb. 18F-F''). Diese Substitution von fünf AS hat einen Anstieg des pI auf 4.5 zur Folge.



**Abb. 18 CRN-Lokalisationsabhängigkeit von CLV2-Proteindomänen**

(A-F'') Induzierte Transgenexpression von *CLV2*-Derivaten in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen. Spalte 1-3 Koexpression von *CLV2-GFP*-Derivaten mit *CRN-mCherry*. Spalte 4 Lokalisationen der *CLV2-GFP*-Derivate in Abwesenheit von CRN. Spalte 5 Proteinmodelle des exprimierten *CLV2*-Derivats. (A-A'') Nur die Koexpression von CLV2 und CRN führt zu deren Lokalisation an der PM. (B-C'') Trotz der C-terminalen Fusion der Kinasedomäne von CRN an CLV2 führt nur die Koexpression mit CRN zur Lokalisation an der PM. (D-E'') Keine der in den cytoplasmatischen Bereich von CLV2 eingefügten Modifikationen, (D-D'') sei es die Alanin-Substitution des Arginins eines potentiellen RXR-Motives oder (E-E'') die Deletion von 12 AS, hat einen Einfluss auf die

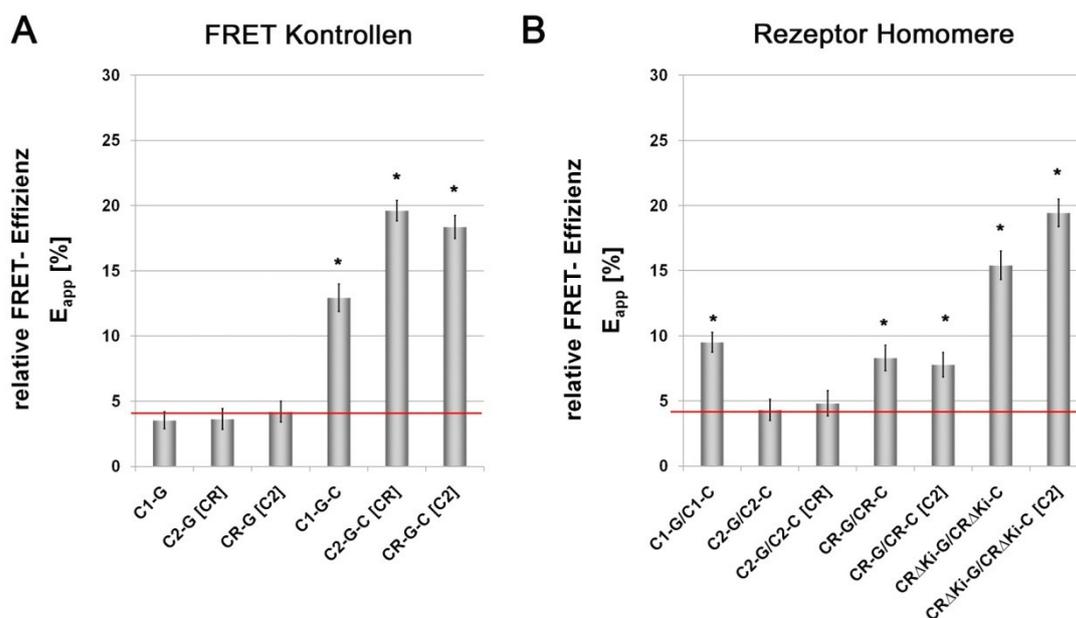
subzelluläre Lokalisation von CLV2 bei Einzel- und Koexpression. (**F-F''**) Eine Alanin-Substitution der negativ geladenen AS in der extrazellulär gelegenen TMD-benachbarten Sequenz hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von CLV2 bei Einzel- und Koexpression. Proteinmodell: SP = Lila; LRR = Grün; Inselektorendomäne = rosa; TMD = Gelb; Punktmutationen = Rot; Proteinsequenzen mit unbekannter Struktur = Schwarz, C-terminale Proteinsequenz, in der die AS, die in dem entsprechenden Derivat gegen ein Alanin ausgetauscht wurden, rot gekennzeichnet sind. Größenstandard = 20  $\mu\text{m}$  (**G**) Western Blot-Analyse von Proteinextrakten aus *N. benthamiana*-Blättern, die CRN- oder CLV2-Derivate alleine oder zusammen exprimierten. Zum Nachweis der Fusionsproteine wurde ein GFP-Antikörper verwendet. Zum Vergleich der aufgetrennten Proteinmenge ist die PonceauS-gefärbte Rubisco-Bande dargestellt. Erwartete Proteingrößen: CRN-GFP: 73 kDa; crn-1-GFP: 73 kDa; CR( $\Delta$ SP-TM)-GFP: 63kDa; CR( $\langle$ B1TM)-GFP: 73 kDa; CR $\Delta$ EZD-GFP: 71 kDa; CR( $\langle$ C1Ki)-GFP: 74 kDa; C2(RA)-GFP: 110 kDa; C2 $\Delta$ 708-GFP: 108 kDa; CLV2n-GFP: 109 kDa.

Die Fusion von CLV2 mit der Kinasedomäne von CRN (C2-CR) verdeutlicht nochmals die Abhängigkeit der CLV2-Lokalisation von CRNs TMD und EZD, da nur die Koexpression mit CRN zur PM-Lokalisation dieses Fusionsproteins führt (Abb. 18B-C'''). Die Proteinstabilität der erzeugten CLV2-Derivate wurde mittels eines Western Blot untersucht. Die Derivate konnte vom GFP-Antikörper in einer distinkten Bande detektiert werden, dies zeigt, dass die Veränderungen in CLV2 nicht zur Instabilität des Proteins führten (Abb. 18G).

### 3.3.5 CLV1 und CRN bilden Homomere.

Eine Proteininteraktionsstudie wurde mittels Fotozerstörung des Akzeptors (APB) durchgeführt, wobei die physikalischen Gesetzmäßigkeiten und die Durchführung dem Methodenteil zu entnehmen sind. Zur Bestimmung des Hintergrundes bei APB-Experimenten wurden die Fluoreszenzfluktuation des Rezeptor-GFP-Fusionsproteins in An- und Abwesenheit eines nicht-interagierenden PM-lokalisierten Rezeptor-mCherry-Fusionsproteins gemessen ( $E_{\text{app}} = \sim 4\%$ ) (Abb. 19A, Abb. 23). Diese GFP-Fluoreszenzzunahme in einem APB-Experiment wurde schon von L. Albertazzi beschrieben und kann vielleicht auf eine Restabilisierung des GFP-Chromophores während der Fotozerstörung des mCherrys zurückgeführt werden (Albertazzi *et al.*, 2009). Es ist anzumerken, dass jedes APB-Experiment von CRN- oder CLV2-Derivaten, sofern nicht anders beschrieben, durch die Koexpression des nichtmarkierten Partners an der PM durchgeführt wurde. Mit diesen Experimenten konnte eine untere Grenze für die Messung der apparenten FRET-Effizienz ( $E_{\text{app}}$ ) festgelegt werden. Die Fusion von Rezeptor, GFP und mCherry diene als Positivkontrolle, wobei in solch einem APB-Experiment der intramolekulare Energietransfer des GFPs auf das mCherry sowie, bei eventueller Bildung von Homomeren, der intermolekulare Energietransfer quantifiziert wird.

Durch die Koexpression der einzelnen Rezeptoren in Fusion mit einem GFP oder mCherry konnte die Bildung von CLV1-Homomeren (9.5 % +/- 0.76) und CRN-Homomeren (8.3 % +/- 0.98), unabhängig von CLV2, gezeigt werden (Abb. 19B). Ferner ist die Bildung von CRN-Homomeren unabhängig von deren Kinasedomäne, da die Deletion zu einem erhöhten Energietransfer zwischen den beiden Chromophoren führt (19.4 % +/- 1.05). Die  $E_{app}$ -Erhöhung ist dabei wahrscheinlich auf eine Verkürzung des Abstandes zwischen den beiden Chromophoren zurückzuführen, die durch die Deletion der Kinasedomäne direkt an der PM unterhalb der TMD lokalisieren. Solch eine Bildung von Homomeren konnte für CLV2 nicht bestätigt werden (4.8 % +/- 0.98). Nur ein Drittel aller Rezeptorhomomere wird in diesem Experiment erfasst, da die gebildeten Fluorophorhomomere (GFP/GFP und mCherry/mCherry) keinen quantifizierbaren Energietransfer aufweisen. Dies kann eine Erklärung für die niedrigen  $E_{app}$ -Werte sein, da sie den Mittelwert der Fluoreszenzveränderung aller GFP-Moleküle darstellen.



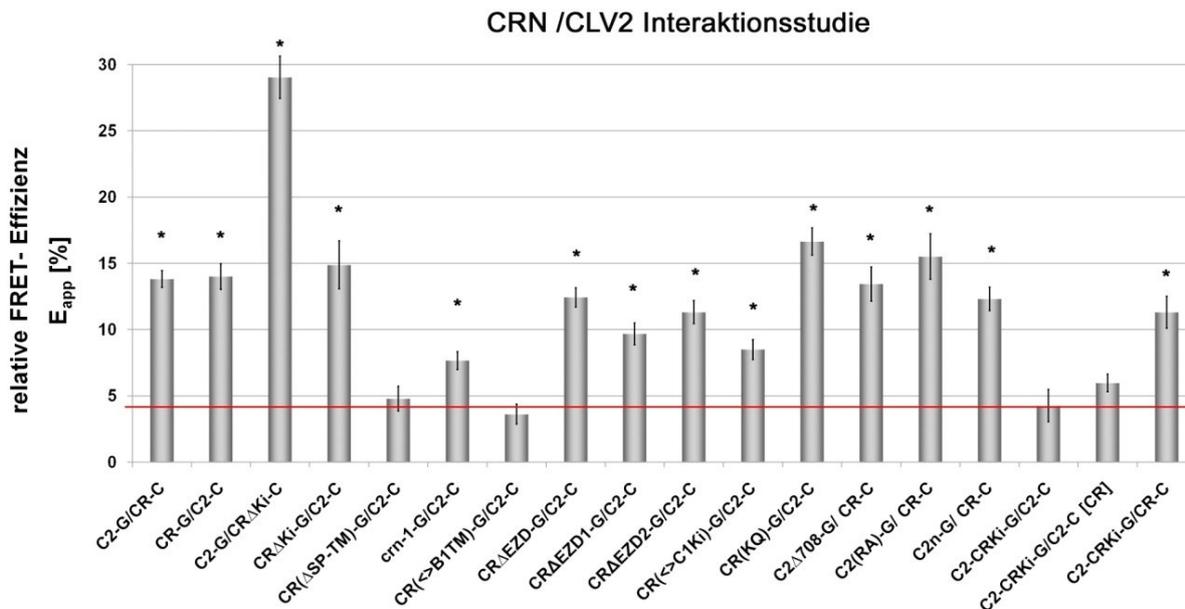
**Abb. 19 CLV1 und CRN bilden Homomere.**

Quantifizierung des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren in APB-Experimenten, durchgeführt in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. (A) Unter den angewendeten Standardbedingungen zeigt die GFP-Fluoreszenzintensität in Abwesenheit eines mCherrys einen 4%igen Anstieg (rote Linie). Diese Standardbedingungen sind geeignet, den intramolekularen Energietransfer in PM-lokalisierten GFP-mCherry-Fusionsproteinen zu quantifizieren. (B) Der Energietransfer zwischen CLV1-GFP/CLV1-mCherry und CRN-GFP/CRN-mCherry ist signifikant höher als die GFP Hintergrundfluktuation. \* Kennzeichnet eine signifikante Erhöhung ( $p < 0.005$ ) der FRET-Effizienz im Vergleich zur Negativkontrolle (BAK1-GFP/CLV1-mCherry exprimierenden Zellen). C1 = CLV1; C2 = CLV2; CR= CRN;  $\Delta$  = Deletion; Ki = Kinasedomäne; / = koexprimierte Proteine; [] = koexprimiertes Protein ohne FP-Fusion;  $N \geq 15$ ; +/- Standardfehler.

### 3.3.6 Direkte Interaktion von CRN und CLV2.

Die genetische Gruppierung von CLV2 und CRN als eine funktionelle Gruppe des CLV-Signalweges, wie die in Abschnitt 3.3.4 beschriebene PM-Lokalisationsabhängigkeit, deutet eine direkte Interaktion dieser Proteine an. Die durchgeführten APB-Experimente bestätigten dies (13.9 % +/- 0.55) (Abb. 20). Im Abschnitt 3.3.4 konnte gezeigt werden, dass die Kinasedomäne keinen Einfluss auf die Translokation des Rezeptorkomplexes zur PM hat. Der Austausch der Kinasedomäne (CR( $\leftrightarrow$ C1Ki)) sowie der potentielle Funktionsverlust (CR(KQ)) resultiert ebenfalls in keiner Veränderung des  $E_{app}$ -Wertes. Die Deletion der Kinasedomäne hat einen erhöhten Energietransfer, wahrscheinlich verursacht durch den reduzierten Abstand der Chromophore (21.8 % +/- 1.70), zur Folge. Die Deletion der gesamten EZD (CR $\Delta$ EZD), die zur ER-Zurückhaltung des CLV2/CRN-Komplexes führt, hat keinen Einfluss auf deren Interaktion (12.4 % +/- 0.73). Dies deutet die korrekte Faltung des gebildeten Proteins an. Die Deletionen der einzelnen Bereiche der EZD (CR $\Delta$ EZD1 und CR $\Delta$ EZD2) hatten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Interaktion mit CLV2 (CR $\Delta$ EZD1 9.68 % +/- 0.83; bzw. CR $\Delta$ EZD2 11.3 % +/- 0.88).

Nur Veränderungen in der TMD von CRN führen, sei es durch Deletion (CR( $\Delta$ SP-TM)) oder Austausch (CR( $\leftrightarrow$ B1TM)), zur Blockierung der CLV2/CRN-Interaktion (4.8 % +/- 0.93 und 3.62 % +/- 0.75). Die Punktmutation innerhalb der TMD in *crn-1*-Pflanzen bewirkt eine vorwiegende Zurückhaltung des Proteins im ER. Dies lässt sich unter anderem durch eine verminderte Interaktion mit CLV2 erklären (7.7 % +/- 0.68). Die Veränderungen in den verschiedenen CLV2-Derivaten hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Interaktion mit CRN. Die funktionelle Gruppierung von CRN und CLV2 ließ sich durch die Messung einer direkten Interaktion dieser Proteine, vermittelt durch die TMD, bestätigen.



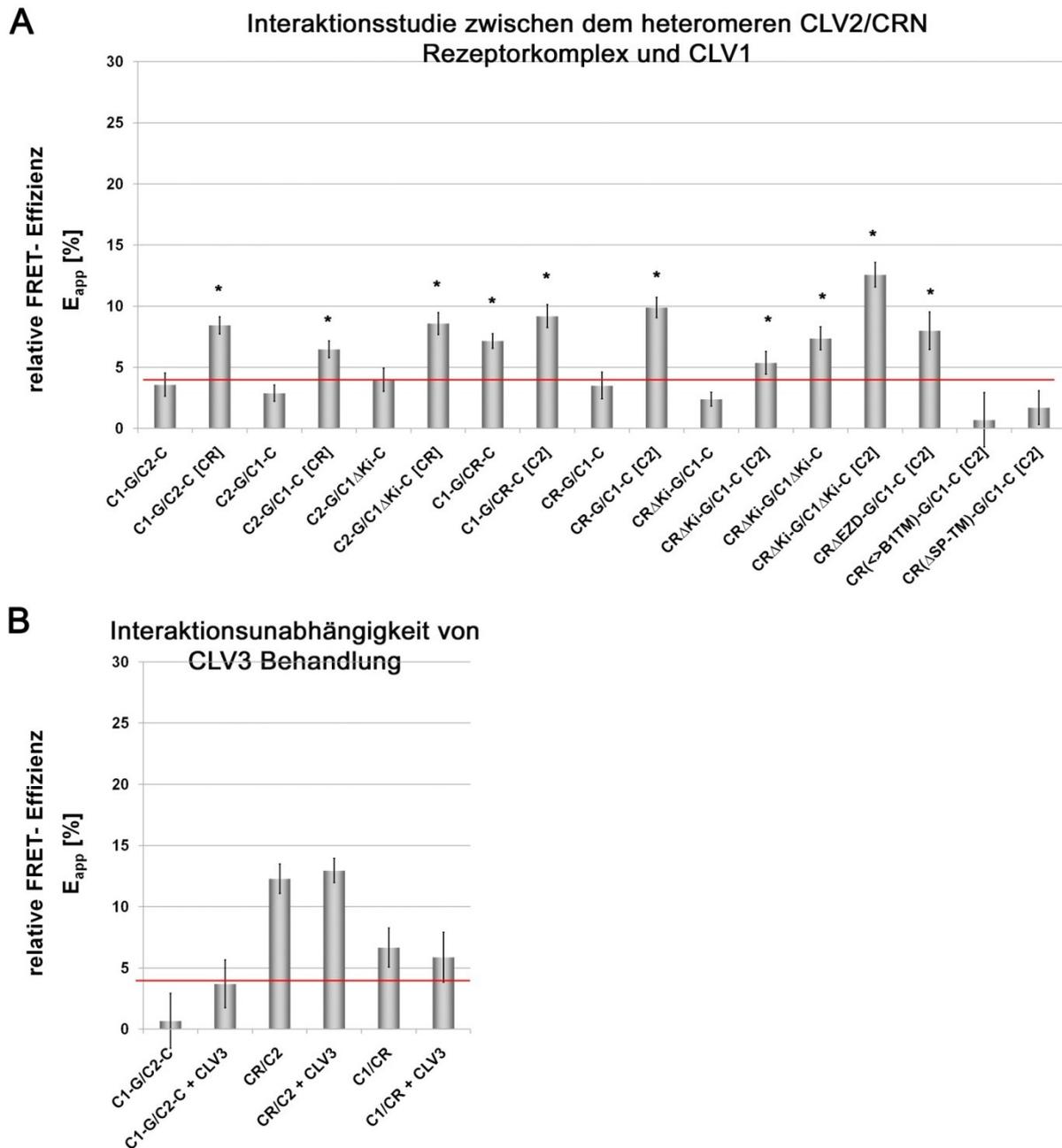
**Abb. 20 Die Interaktion zwischen CRN und CLV2 wird über die TMD vermittelt.**

Quantifizierung des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren, gemessen durch APB-Experimente. Diese wurden durchgeführt in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. \* Kennzeichnet eine signifikante Erhöhung ( $p < 0.005$ ) der FRET-Effizienz im Vergleich zur Negativkontrolle (BAK1-GFP/CLV1-mCherry exprimierende Zellen). Eine rote Linie markiert den Schwellenwert der Hintergrundfluktuation des GFPs. C1 = CLV1; C2 = CLV2; CR = CRN; G = GFP; C = mCherry; - = in Fusion; Δ = Deletion; Ki = Kinasedomäne; / = koexprimierte Proteine; [] = koexprimiertes Protein ohne FP Fusion;  $N \geq 10$ ; +/- Standardfehler.

### 3.3.7 CRN vermittelt die Interaktion des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes mit CLV1.

Die funktionelle Separierung von CLV1 und CRN/CLV2 aufgrund von genetischen Daten schließt eine Kommunikation zwischen den verschiedenen Rezeptorkomplexen nicht aus. Durch APB-Experimente konnte auch eine Interaktion zwischen CLV1 und dem CRN/CLV2-Rezeptorkomplex bestätigt werden (Abb. 21; CLV1-FP/CLV2-FP mit CRN 7.3 % +/- 0.5 bzw. CLV1-FP/CRN-FP mit CLV2 9.6 % +/- 0.62). Hierbei ist jedoch unklar, ob CRN oder CLV2 die Interaktion vermittelt. Der gemessene Energietransfer zwischen CLV1-FP und CRN-FP ist höher als zwischen CLV1-FP und CLV2-FP. Dies deutet auf eine direkte Interaktion von CRN und CLV1. Eine weitere Erklärung liefert die Proteinstruktur von CLV2, die aufgrund einer fehlenden Kinasedomäne das FP direkt an der PM lokalisiert. Die Interaktionsstudien zu CLV1 mit ER-lokalisierten CRN oder CLV2 (in Abwesenheit des nicht fluoreszierenden Partners) zeigt nur bei CRN einen signifikant über dem Hintergrund liegenden Energietransfer (5.5 % +/- 0.69), jedoch lässt sich auch dieser Unterschied durch die Position der Fluorophore erklären. Um die Unabhängigkeit dieser Messung von der Proteinstruktur zu gewährleisten, erfolgte eine weitere Messung von CLV1 ohne die Kinasedomäne (C1ΔKi) sowie mit CRΔKi. Dies führte zu einem deutlichen Anstieg

des messbaren Energietransfers zwischen CLV1 und CRN, nicht aber zu CLV2 (C1ΔKi-FP/CRAΔKi-FP [CLV2] 12.57 % +/- 0.94 gegenüber C1ΔKi-FP/CLV2-FP [CRN] 8.0 % +/- 0.58). Dies beweist eine direkte Interaktion zwischen CLV1 und CRN, während der Energietransfer zu CLV2 nur innerhalb eines großen multimeren Rezeptorkomplexes stattfindet. Ferner ist die CRN/CLV1-abhängige Interaktion durch die TMD von CRN vermittelt, da ein FRET zwischen CR(ΔB1TM) und CLV1 nicht mehr messbar ist. Der Energietransfer zwischen CRAΔKi und C1ΔKi ist im Vergleich zum Energietransfer zwischen CRAΔKi und CLV2 geringer, was auf eine konstitutive Interaktion zwischen CRN und CLV2 hinweisen könnte, wohingegen nur eine kleine Proteinpopulation an der Bildung eines multimeren Rezeptorkomplexes aus CRN, CLV2 und CLV1 beteiligt ist. Dass möglicherweise spezifische Funktionsunterschiede zwischen CLV1-Homomeren, CLV2/CRN-Heteromeren sowie dem multimeren Rezeptorkomplex existieren, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Die Behandlung mit CLV3-Peptid führt jedoch zu keiner messbaren Verstärkung der Proteininteraktion (Abb. 21B).



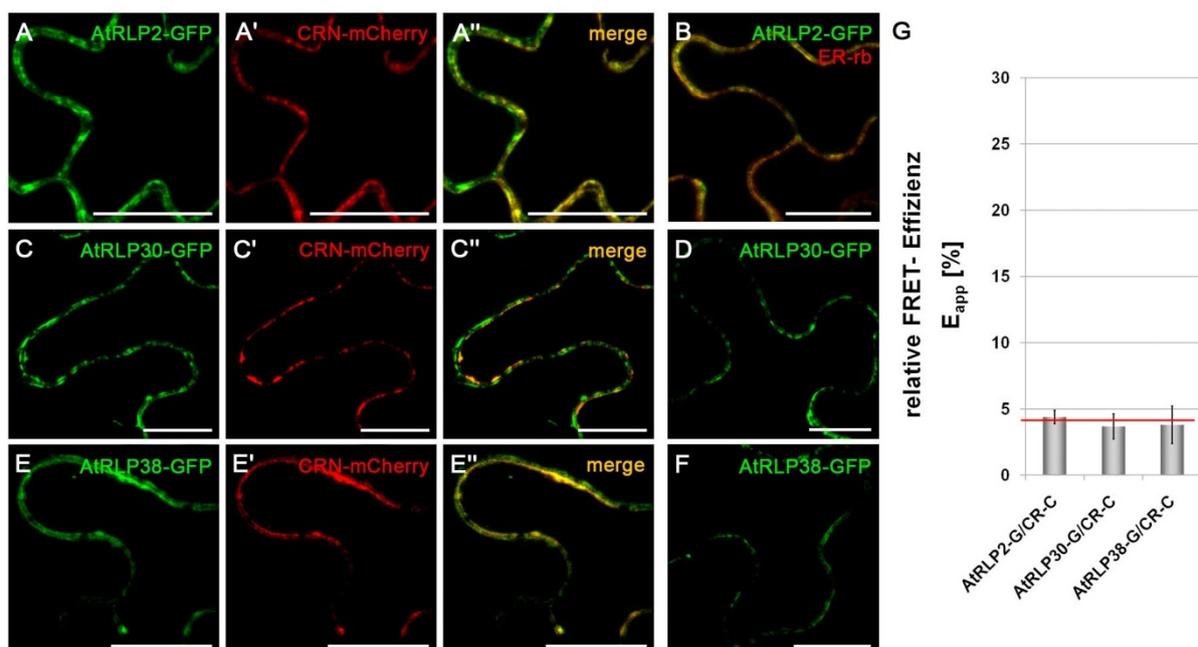
**Abb. 21** Der heteromere CRN/CLV2-Rezeptorkomplex interagiert mit CLV1.

Quantifizierung des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren in den APB-Experimenten, durchgeführt in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. (A) Interaktionsstudie des heteromeren CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes mit CLV1. \* Kennzeichnet eine signifikante Erhöhung ( $p < 0.005$ ) der FRET-Effizienz im Vergleich zur Negativkontrolle (BAK1-GFP/CLV1-mCherry exprimierende Zellen). (B) Einfluss von CLV3-Behandlung auf die Proteininteraktion. Eine rote Linie markiert den Schwellenwert der Hintergrundfluktuation des GFPs. C1 = CLV1; C2 = CLV2; CR = CRN; G = GFP; C = mCherry; - = in Fusion;  $\Delta$  = Deletion; Ki = Kinasedomäne; / = koexprimierte Proteine; [] = koexprimiertes Protein ohne FP-Fusion;  $N \geq 10$ ; +/- Standardfehler.

### 3.3.8 Die ER-Zurückhaltung von CLV2-Homologe ist unabhängig von CRN.

Guodong Wang zeigte, dass zwei CLV2-Homologe, AtRLP12 (Arabidopsis thaliana Receptor-like Proteins 12) und AtRLP2, die CLV2-Funktion im Spross ersetzen können, jedoch nicht AtRLP17, AtRLP30 und AtRLP38 (Wang *et al.*, 2010). AtRLP38 konnte die CLV2-Funktion im SAM ebenfalls ersetzen, wenn dessen LRRs der extrazellulären Domäne gegen die LRR von CLV2 ausgetauscht werden, was auf einer Veränderung der potentiellen Ligandenbindungsstelle beruhen kann. Daher stellt sich die Frage, ob der ER-Zurückhaltungsmechanismus von CLV2 und CRN auf andere RLP-Proteine übertragbar ist und ob daher AtRLP2 und AtRLP12 auch durch CRN an die PM vermittelt wird.

Die Expression von *AtRLP2* (*iRLP2-GFP*), *AtRLP30* (*iRLP30-GFP*) und *AtRLP38* (*iRLP38-GFP*) in *N. benthamiana*-Blättern zeigte eine ER-Lokalisation, die durch Koexpression von RLP2 und dem ER-Marker *Er-rb* überprüft wurde (Abb. 22B). In einem Zellquerschnitt kann statt einer durchgehenden Fluoreszenz der PM die für ER-Lokalisation typische punktuelle Fluoreszenz entlang der Zellwand beobachtet werden. Diese ER-Lokalisation der RLPs verändert sich jedoch nicht durch Koexpression von CRN. Aufgrund einer Western Blot-Analyse und der induzierten Proteininduktion kann eine ER-Zurückhaltung aufgrund von Proteininstabilität oder Überexpression ausgeschlossen werden. Es ist gut vorstellbar, dass andere rezeptor-ähnliche Kinasen die RLPs an die PM bringen, um dort einen funktionellen Komplex zu bilden. Aufgrund der nicht sichtbaren PM-Translokation von CRN in Koexpression mit den verschiedenen RLPs konnte erwartungsgemäß in APB-Experimenten auch keine Interaktion zwischen den RLPs und CRN gemessen werden.



### Abb. 22 Lokalisations- und Interaktionsstudie von CLV2-Homologen mit CRN.

(A-F) Proteinlokalisationsstudie von RLPs bei Einzel- und Koexpression von CRN-mCherry in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. (A-B) AtRLP2 lokalisiert im ER bei Koexpression mit CRN oder dem ER-Marker ER-rb. (C-F) AtRLP30 und AtRLP38 zeigen eine ER-Lokalisation bei Einzel- und Koexpression mit CRN. Größenstandard = 20  $\mu\text{m}$  (G) Quantifizierung des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren in APB-Experimenten, durchgeführt in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. Eine rote Linie markiert den Schwellenwert der Hintergrundfluktuation des GFPs. CR = CRN; G = GFP; C = mCherry; - = in Fusion; / = koexprimierte Proteine;  $N \geq 10$ ; +/- Standardfehler.

### 3.3.9 Direkte Regulation der Rezeptorkinasen durch die Phosphatasen POL und KAPP.

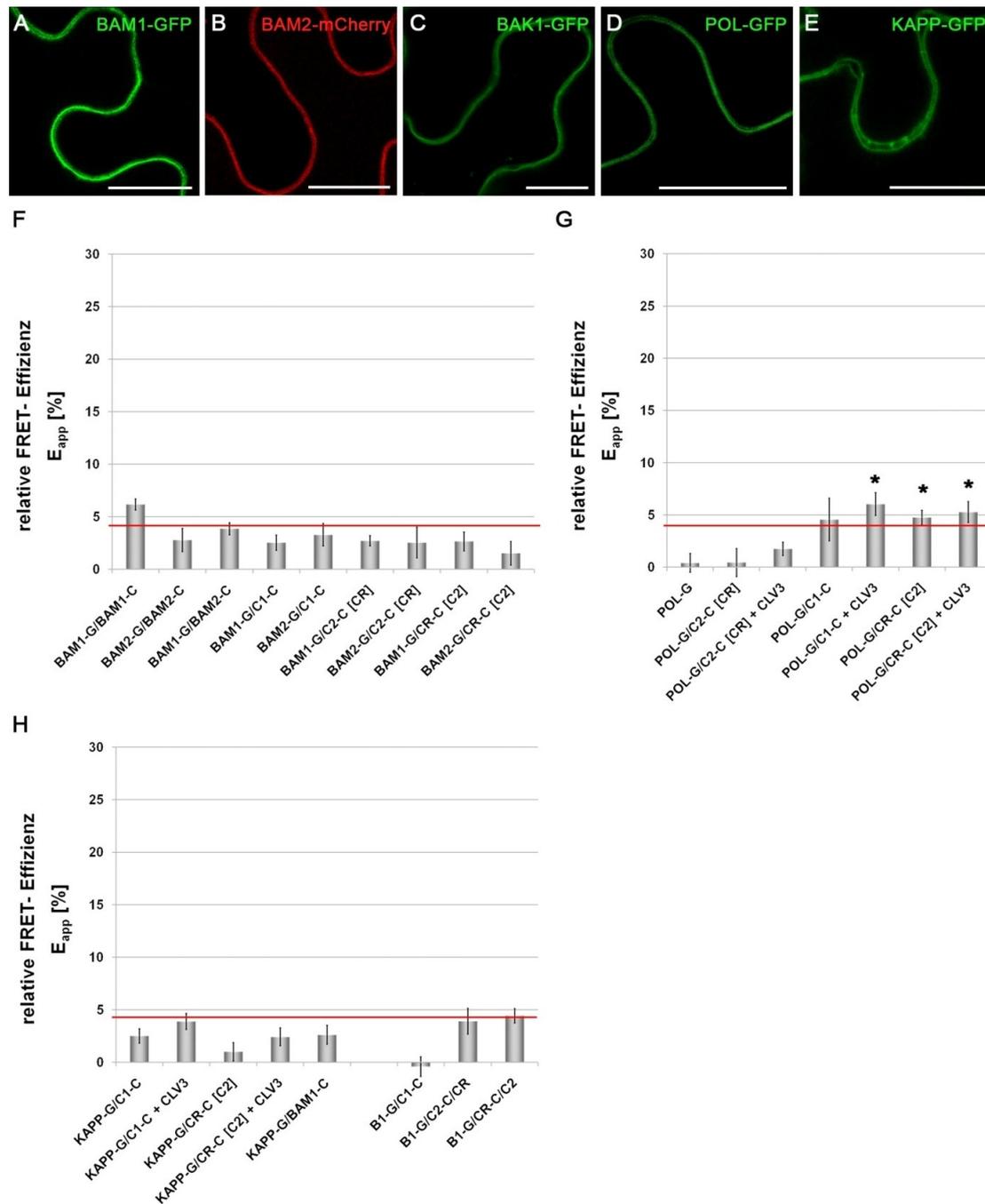
Es sind andere Proteine bekannt, deren Funktionen Auswirkungen auf den CLV-Signalweg haben, die bereits in der Einleitung aufgeführt wurden. Proteine, die aufgrund ihrer vorhergesagten PM-Lokalisation potentielle Interaktoren sein könnten, wurden nun mittels APB-Experimenten untersucht. Die zwei CLV1-Homologe BARELY ANY MERISTEM1 (BAM1) und BAM2, die an einem gegenüber dem CLV-Signalweg antagonistisch wirkenden Signalweg beteiligt sind, zeigen eine PM-Lokalisation sowie die Bildung von fluoreszierenden Transportvesikeln (*iBAM1-GFP* und *iBAM2-GFP*) (Abb. 23A, B). Überexpression führt, wie im Fall von CLV1, zur Bildung von großen fluoreszierenden Aggregaten. Weder BAM1 noch BAM2 zeigen innerhalb der APB-Experimente eine messbare Interaktion mit CLV1, CLV2 oder CRN (Abb. 23E). Die Koexpression von *BAM1-GFP* und *BAM1-mCherry* führte zur Messung eines erhöhten  $E_{\text{app}}$ -Wertes, der jedoch aufgrund der geringen Anzahl an Messdaten nicht signifikant über dem Hintergrund liegt (6.17 % +/- 0.52).

POLTERGEIST (POL), eine Proteinphosphatase, lokalisiert mittels N-Myristoylierung und Palmitoylierung an der PM (Abb. 23D,G) (Gagne *et al.*, 2010). Die Studie zur Interaktion von POL mit CLV1, CLV2 und CRN ergab erhöhte  $E_{\text{app}}$ -Werte, die mit ~ 4-5 % im Bereich der zuvor gemessenen GFP-Fluktuation liegen, jedoch im Vergleich zur POL-GFP-Fluktuation signifikant erhöht sind. Des Weiteren führt eine 30-minütige Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  CLV3-Peptid zu einer weiteren Erhöhung der FRET-Effizienz. Durch diese Messung ist eine potentielle direkte Regulation der Rezeptoren durch POL vorstellbar, an der jedoch eine Proteinsubpopulation mitwirkt. Die APB-Methode ist zur Ermittlung von Interaktionen kleiner Subpopulationen nicht sensitiv genug, da diese im Hintergrundrauschen des Systems untergehen.

Mittels *In-vitro*- und *In-vivo*-Bindungsexperimenten wurde gezeigt, dass die membrangebundene kinaseassoziierte Proteinphosphatase KAPP, an CLV1 binden kann (Stone *et al.*, 1998). Die induzierte Expression von KAPP-GFP zeigt die erwartete PM-

Lokalisation mit der Bildung größerer Vesikel (Abb. 23E, H). In der über APB gemessenen Proteininteraktionsstudie konnte eine solche Bindung an CLV1, CLV2, CRN oder BAM1 nicht festgestellt werden. Die Zugabe des CLV1-Liganden CLV3 führte zu einer Erhöhung der  $E_{app}$ -Werte, jedoch nicht auf ein Maß, das signifikant über dem Hintergrundrauschen des Systems liegt. Jedoch ist es, wie auch im Fall von POL, nicht auszuschließen, dass eine Interaktion nur zwischen Subpopulationen stattfindet und somit im Hintergrundrauschen untergeht.

Als negative Kontrolle wurde BAK1 (BRI1-assoziierte Rezeptorkinase1), eine LRR enthaltene Rezeptorkinase, die in den brassinosteroid-abhängigen Signaltransduktionsweg (zusammengefasst in Wang *et al.*, 2006) sowie in die flagellininduzierten Pathogenabwehr involviert ist (Chinchilla *et al.*, 2007). Eine Funktion im SAM konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Der exprimierte Rezeptor lokalisiert an der PM und zeigt keine Interaktion mit einem der Rezeptoren des CLV-Signalweges (Abb. 23C, H).



**Abb. 23 Lokalisations- und Interaktionsstudie potentieller Interaktionspartner.**

(A-E) Proteinlokalisationsstudie in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. (A+B) Die CLV1-Homologe BAM1 und BAM2 zeigen eine gleichförmige Fluoreszenz an der PM. (C) BAK1 weist eine gleichmäßige GFP-Fluoreszenz an der PM auf. (D+E) Die beiden Proteinphosphatasen POL und KAPP sind an der PM assoziiert. (F-H) Quantifizierung des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren in APB-Experimenten, durchgeführt in transient transformierten Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. (F) Interaktionsstudie der BAM-Rezeptoren. (G) Interaktionsstudie von POL mit den Rezeptoren des CLV-Signalweges. \* Kennzeichnet eine signifikante Erhöhung der FRET-Effizienz im Vergleich zu POL-GFP exprimierenden Zellen (Student T-Test  $p < 0.005$ ). (H) Interaktionsstudie von KAPP und BAK1 mit den Rezeptoren des CLV-Signalweges. Eine rote Linie markiert den Schwellenwert der Hintergrundfluktuation des GFPs. C1 = CLV1; C2 = CLV2; CR = CRN; G = GFP; C = mCherry; - = in Fusion;  $\Delta$  = Deletion; K = Kinasedomäne; / = koexprimierte Proteine; [] = koexprimiertes Protein ohne FP Fusion;  $N \geq 5$ ; +/- Standardfehler.

### 3.3.10 Etablierung der Proteininteraktionsstudie mittels FLIM-Messungen.

Eine Zelle unterliegt ständigem Wandel. Neue Komponenten werden hinzugefügt und andere Komponenten werden wiederum entfernt. Diese Veränderung basiert im hohen Maße auf Proteinsynthese und -abbau, außerdem auch auf der Bildung von Proteinkomplexen und deren Auflösung, was die Konzentration freier potentieller Interaktoren beeinflusst. Veränderungen in der Ionenkonzentration können sich ebenfalls auf Proteinstrukturen und damit auf deren Funktion auswirken. Dieser ständige Wechsel führt zu einer Balance in der Zelle, die ihre Funktion und Identität bestimmt. In solch einem dynamischen System stellt die Proteininteraktionsmessung mittels APB-Experimenten nur eine statische Momentaufnahme dar. Bei APB-Experimenten wird die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb einer großen Fläche gemessen, um Fluktuationen der Donorfluoreszenz zu mitteln. Dabei kann nicht zwischen interagierenden und nicht interagierenden Molekülen unterschieden werden. Die daraus resultierenden  $E_{app}$ -Werte werden also nicht nur vom Abstand der beiden Fluorophore beeinflusst, sondern ebenfalls durch die nicht interagierende Proteipopulation. Des Weiteren kann die Zuführung hoher Energiemengen bei der Fotozerstörung des Akzeptors negativen Einfluss auf die Proteinfunktionalität und -stabilität ausüben.

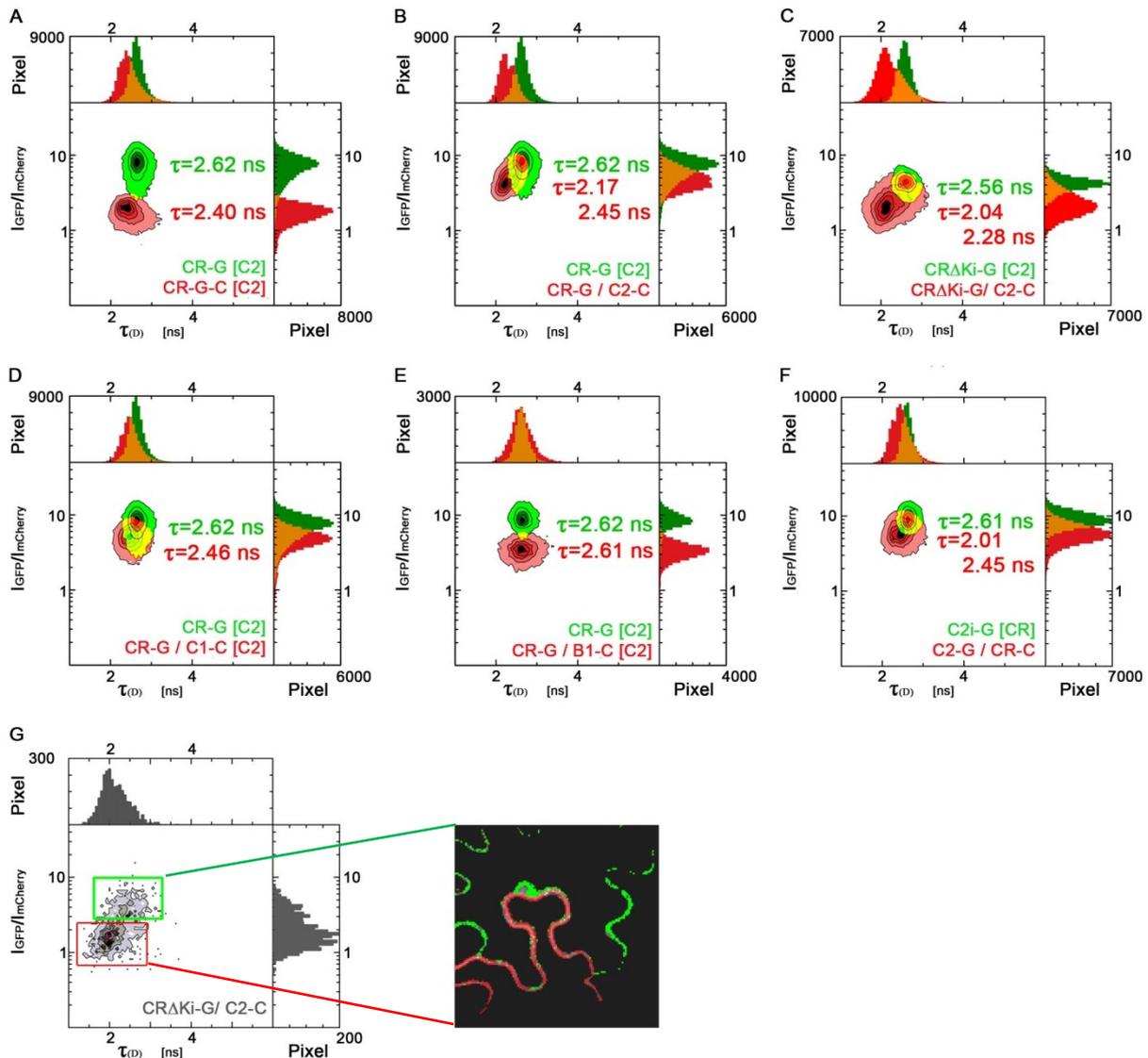
Eine Quantifizierung des Energietransfers ist durch die Messung der veränderten Lebenszeit des Donors möglich. Dies findet ohne solch eine hohe Energieeinwirkung statt und kann für jedes Pixel über die Zeit bestimmt werden. Jedoch ist auch in diesem Fall die resultierende Lebenszeit ein Mittelwert aus der Donorlebenszeit von interagierenden und nicht-interagierenden Molekülen. Unter der Annahme, dass der prozentuale Anteil interagierender Moleküle nahe 100 % ist, kann anhand dieser Lebenszeit eine zuverlässige Abstandsbestimmung zwischen den Fluorophoren berechnet werden. Unter der Annahme eines dynamischen Systems, in dem die Proteinzusammensetzung und Komplexbildung einem ständigen Wandel unterliegt, wird immer eine Mischung aus gerade interagierenden und in diesem Moment freien Donorproteinen gemessen. Eine Abstandsberechnung auf Basis einer so ermittelten Donorlebenszeit ist daher verfälscht. Kurzzeitige Interaktionen von Proteinsubpopulationen könnten somit im Rauschen verschwinden und nicht detektiert werden. Die Bestimmung der Donorlebenszeit unter der Annahme eines Zweikomponentensystems mit jeweils einer monoexponentiellen Zerfallskurve gibt Auskunft über das Verhältnis von interagierenden zu nicht interagierenden Proteinen sowie über deren Veränderung über die Zeit. Die daraus ermittelten Lebenszeiten können zur Abstandsbestimmung der Fluorophore herangezogen werden.

Zunächst sollen die in den APB-Experimenten gemessenen Interaktionen zwischen den Rezeptoren bestätigt werden. Hierzu wurde eine gemittelte Lebenszeit mittels der „Maximum *likelihood*“-Methode für jeden Pixel bestimmt (Kudryavtsev *et al.*, 2007). Wie zu erwarten war, zeigt die Expression von CRN und CLV2 mit den stärksten gemessenen  $E_{app}$ -Werten auch die stärkste Lebenszeitverkürzung (Abb. 24B). Dabei wurde die Pixellebenszeit in Abhängigkeit vom Verhältnis der GFP/mCherry (G/R)-Fluoreszenz und in Abhängigkeit von der Pixelanzahl in einem Histogramm aufgetragen (3D-Plot). Unter der Annahme einer Gauß-Normalverteilung kann die mittlere Lebenszeit ermittelt werden. Die Lebenszeit des Donors CRN-GFP an der PM (in Anwesenheit von CLV2) beträgt  $\tau_{(D)} = 2.62 \pm 0.002$  ns (N= 10, Abb. 24A). Als positive Kontrolle wurde ebenfalls die Lebenszeit von CRN-GFP-mCherry bestimmt, dessen intramolekularer sowie intermolekularer Energietransfer durch Bildung von Homomeren zu einer Lebenszeitverkürzung führt ( $\tau_{(D(A))} = 2.23 \pm 0.006$  ns N=6).

Die Analyse der CRN-GFP und CLV2-mCherry koexprimierenden Zellen (N=10) führte im 3D-Plot zur Bildung von zwei Pixelpopulationen mit unterschiedlichen  $\tau$ - und G/R-Werten (Abb. 24B). Durch die jeweilige Anpassung mit einer Gaußkurve kann der Pixelpopulation mit kleinerem G/R-Verhältnis ein  $\tau_{(D(A))}$  von  $2.17 \pm 0.008$  ns zugeordnet werden und der zweiten ein  $\tau_{(D(A))}$  von  $2.45 \pm 0.012$  ns. Diese Lebenszeitverkürzung unabhängig davon messbar, welcher Bindungspartner den Donor bzw. Akzeptor trägt (CLV2-GFP  $\tau_{(D)} = 2.61 \pm 0.002$ ; CLV2-GFP/CRN-mCherry  $\tau_{(D(A))} = 2.01 \pm 0.021$  und  $\tau_{(D(A))} = 2.42 \pm 0.006$ ; Abb. 24F). Diese zwei Populationen treten auch bei einzelnen Messungen auf, die immer auf der Analyse von zwei benachbarten PM basieren, somit von zwei Zellen. So können bei Einzelmessung die Pixel mit längerer Lebenszeit einer donor-exprimierenden Zelle zugeordnet werden, die in direkter Nachbarschaft zu einer koexprimierenden Zelle liegt (Abb. 24G). Die gleichzeitige Aufnahme zweier benachbarter Zellen, von denen die eine CRAK1-GFP und CLV2-mCherry exprimiert, die zweite lediglich CRAK1-GFP, demonstriert die Genauigkeit dieser Auswertungsmethode.

Als Negativkontrolle, um die Auswirkungen eines PM-lokaliserten mCherry auf die Donorlebenszeit und auf das G/R-Verhältnis zu bestimmen, wurde CRN-GFP mit BAK1-mCherry koexprimiert (Abb. 24E). Dies führte nicht zu einer verkürzten Lebenszeit, jedoch zu einem reduzierten G/R-Verhältnis. ( $\tau_{(D(A))} = 2.61 \pm 0.004$  ns; N=6). Diese Reduktion des G/R-Verhältnisses kann wahrscheinlich auf eine Anregung des mCherrys durch den 473 nm-Laser zurückgeführt werden. Mittels dieser Lebenszeitanalyse konnte auch die Interaktion mit CLV1 bestätigt werden. So führt die Koexpression von CRN-GFP (CLV2) CLV1-mCherry zu

einer messbaren Donorlebenszeitverkürzung auf  $\tau_{(D(A))}=2.46 \pm 0.003$  ns (Abb. 24D). Diese Lebenszeitverkürzung ist höher bei deletierter Kinasedomäne ( $\tau_{(D(A))}=2.04 \pm 0.031$  und  $\tau_{(D(A))}=2.28 \pm 0.018$ ; Abb. 24C).

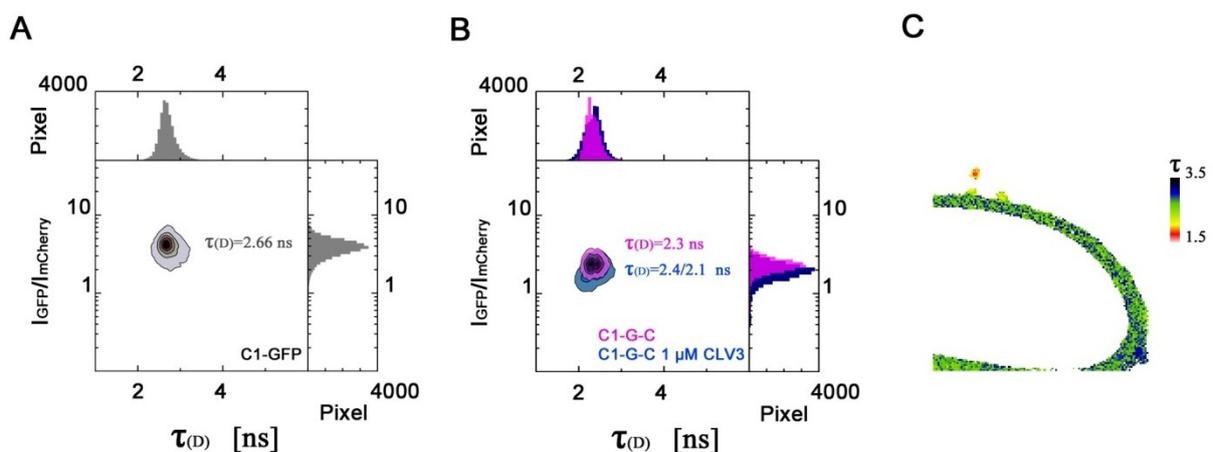


**Abb. 24 Proteininteraktionsstudie durch FLIM.**

(A-F) Histogramm der Pixellebenszeit in Abhängigkeit vom Verhältnis der GFP/mCherry (G/R)-Fluoreszenz und in Abhängigkeit von der Pixelanzahl (3D-Plot). Mittlere Lebenszeitbestimmung von donor-exprimierenden (grüne) sowie donor- und akzeptor-exprimierenden (rot) Zellen unter Annahme einer Gauß-Normalverteilung. Analysiert wurden Blattepidermiszellen von transient transformierten *N. benthamiana*, 4-8 SnI (A-D; F) N = 10 (E) N = 4 (A) Der intramolekulare Energietransfer in CRN-GFP-mCherry führt zu einer mittleren Lebenszeit von 2.40 ns, was einer Reduktion von 0.22 ns im Vergleich zur Lebenszeit von CRN-GFP entspricht. (B,F) Im 3D-Plot der CRN/CLV2-koexprimierenden Zellen sind zwei Lebenszeitpopulationen zu erkennen. Die Interaktion führt neben einem reduziertem G/R-Verhältnis zu einer Lebenszeitverkürzung von 0.45 ns/ bzw. 0.17 ns mit CRN als Donor ( $\tau_{(D)} = 2.62$  ns;  $\tau_{(D(A))} = 2.17/2.45$  ns) und von 0.61 ns/ bzw. 0.17 ns mit CLV2 als Donor ( $\tau_{(D)} = 2.61$  ns;  $\tau_{(D(A))} = 2.01/2.45$  ns). (C) Ebenfalls zwei Lebenszeitpopulationen sind bei der Analyse des Kinasedeletionsderivats von CRN zu erkennen. Eine Lebenszeitverkürzung von  $\tau_{(D)} = 2.56$  ns auf  $\tau_{(D(A))} = 2.04$  und 2.28 ns ist zu erkennen. Ein für FRET typisches reduziertes G/R-Verhältnis ist

ebenfalls zu beobachten. **(D)** Die Lebenszeitanalyse von *CRN-GFP[CLV2]/CLV1-mCherry*-exprimierenden Zellen zeigte auch ein reduziertes G/R-Verhältnis sowie eine Lebenszeitverkürzung von 0.16 ns ( $\tau_{(D)} = 2.62$  ns;  $\tau_{(D(A))} = 2.46$  ns). **(E)** Die Koexpression von *CRN-GFP [CLV2] / BAK1-mCherry* führte nur zu einer Reduktion des G/R-Verhältnisses ( $\tau_{(D)} = 2.62$  ns;  $\tau_{(D(A))} = 2.61$  ns). **(G)** Die Aufnahme zweier Nachbarzellen, wobei die eine nur den Donor exprimiert, die andere Donor und Akzeptor. Im 3D-Plot sind zwei Pixelpopulationen zuerkennen mit unterschiedlichen Lebenszeiten und unterschiedlichem G/R-Verhältnis. Diese können den zwei Zellen zugeordnet werden. Grün: Pixelpopulation mit höherer Lebenszeit und hohem G/R-Verhältnis gehören zur Zelle die nur CR $\Delta$ Ki-GFP exprimierten. Rot: Pixelpopulation mit niedriger Lebenszeit und geringerem G/R-Verhältnis gehören zur Zelle die CR $\Delta$ Ki-GFP und CLV2-mCherry exprimiert. GFPs C1 = CLV1; C2 = CLV2; CR = CRN; B1 = BAK1; G = GFP; C = mCherry; - = in Fusion;  $\Delta$  = Deletion; Ki = Kinasedomäne; / = koexprimierte Proteine; [] = koexprimiertes Protein ohne FP-Fusion.

Die Analyse von CLV1-GFP-mCherry zeigte eine stärkere Lebenszeitreduktion des GFPs in Vesikeln als an der PM (Abb. 25C). CLV1-GFP hat eine Lebenszeit von  $\tau_{(D)} = 2.60 \pm 0.002$  ns (Abb. 25A), die durch den intra- und intermolekularen Energietransfer in CLV1-GFP-mCherry exprimierenden Zellen auf  $\tau_{(D(A))} = 2.30 \pm 0.004$  ns reduziert wird. In der Einzelmessungsanalyse zeigt sich jedoch, dass in Vesikeln die Lebenszeit weiter sinkt. Die beste Messung hierfür wurde bei CLV3-Peptidbehandlung erzielt (1  $\mu$ M CLV3 infiltriert, Messung 1 h nach der Behandlung), deren CLV1-GFP-mCherry in Vesikeln eine Lebenszeit von  $\tau_{(D(A))} \approx 1.8$  ns aufwies (Abb. 25C). Da Vesikel durch die Zelle transportiert werden, ist eine solche Vesikelmessung ein seltenes Ereignis, weshalb Vergleichsmessungen für CLV2-GFP-mCherry oder CRN-GFP-mCherry bisher nicht vorliegen. Ebenfalls ist bisher unklar, ob die Vesikelbildung peptidinduziert ist. In nicht peptidbehandelten Zellen sind zwar Ansätze einer reduzierten Lebenszeit in sich gerade abschnürenden Vesikeln zu erkennen, dies scheint jedoch in peptidbehandelten Zellen mit erhöhter Frequenz aufzutreten, was die Auswertung von fünf unabhängigen Messungen einmal ohne (Abb. 25B; Pink) und einmal mit Peptidbehandlung (Abb. 25B; Blau) vermuten lässt.



**Abb. 25 Verkürzte Lebenszeit von CLV1-GFP-mCherry in Vesikeln.**

**(A-B)** Ermittlung der Donorlebenszeit durch Mittelwertbestimmung unter der Annahme einer Gauß-Normalverteilung von CLV1-GFP **(A)** und CLV1-GFP-mCherry **(B; Blau)** exprimierenden

Epidermiszellen von transformierten *N. benthamiana*-Blättern. Für die Mittelwertbestimmung von mit CLV3-Peptid behandelten Zellen (1  $\mu$ M; 1 Stunde nach Ligandenbehandlung) wurde eine Gauß-Normalverteilung mit zwei Maxima angenommen (Pink). (N = 5) (C) FLIM-Aufnahme einer CLV1-GFP-mCherry exprimierenden Blattepidermiszelle eine Stunde nach Behandlung mit CLV3-Peptid (1  $\mu$ M). Die Donorlebenszeit ist in Vesikeln von  $\sim 2.3$  auf  $\sim 1.8$  ns reduziert.

---

KAPITEL 4  
DISKUSSION

## 4 Diskussion

Weltweit arbeiten Arbeitsgruppen an der Erforschung von regulatorischen Prozessen in der Pflanzenentwicklung. Die Aufrechterhaltung der Stammzellen in den apikalen Meristemen ist für das Überleben einer Pflanze essentiell. Die Charakterisierung des CLV-Signalweges auf molekularer Ebene war unter anderem Ziel dieser Arbeit. Hierzu konnte ein induzierbares *In-planta*-Expressionssystem etabliert werden, das es ermöglichte Proteininteraktionsstudien durch Quantifizierung des FRET-Effekts zwischen zwei Fluorophoren durchzuführen. Dies führte zur Identifizierung neuer regulatorischer Ebenen im CLV-Signalweg und kann in Zukunft tieferen Einblick in das dynamische Verhalten von Proteinen in der Zelle geben. Der phänotypische Vergleich von *clv/crn*-Allelen in verschiedenen Ökotypen verdeutlichte die Existenz eines Netzwerkes zur Regulation der Stammzellpopulationsgröße. Diese netzwerkbildenden Signalwege wirken in redundanter Weise, um die Balance des CLV/WUS-Regelkreislaufes zu stabilisieren, sind jedoch in *Ler* reduziert. Um die komplexe Regulation des Stammzellerhalts zu verstehen, ist es notwendig, die Knotenpunkte, bzw. Verbindungen dieser einzelnen Signalwege zu identifizieren und auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die Analyse von Expressionsmustern kann hierbei Hinweise auf regulatorische Prozesse geben sowie potentielle Redundanzen zwischen Proteinen aufdecken.

### 4.1 Funktionelle Unabhängigkeit der CLV1- und CLV2/CRN-Signalwege.

Die Identifizierung von CRN durch Ralf Müller führte zur Etablierung eines neuen Modells des CLV-Signalweges, in dem CLV3 über zwei unabhängige Rezeptorkomplexe von der Zelle wahrgenommen wird (Müller *et al.*, 2008). Genetische Untersuchungen zeigten, dass die CLV2-Funktion abhängig ist von CRN, nicht aber von CLV1. Ferner leitet CLV1 parallel zu CRN das CLV3-Signal weiter. Die Identifikation des mutanten *crn-3*-Allels bestätigte die Integration von CRN in den CLV-Signalweg nochmals, da auch dieses Allel zur Bildung eines vergrößerten SAMs führte. Eine Analyse von *clv1-11/clv2-1*-Doppelmutanten fehlte jedoch noch, um die genetische Abhängigkeit zwischen CLV1 und CLV2 zu analysieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CLV1 und CLV2 durch zwei separate Signalwege die SAM-Größe regulieren, da Doppelmutanten einen *clv3*-ähnlichen Phänotyp ausbilden und damit den Verlust des gesamten CLV-Signalweg zeigen (Abschnitt 3.1). Der schwächere Phänotyp von *clv1-11/crn-1*-Doppelmutanten (~ 5.1 Karpelle) der auf einen partiell aktiven CLV-Signalweg hinweist, basiert wahrscheinlich auf einer Restfunktion des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes. Die durchgeführte Lokalisations- und Interaktionsstudie von

*crn-1* (Abschnitt 3.3.6 und 3.3.4) zeigte, dass der AS-Austausch innerhalb der TMD einen negativen Einfluss auf die Interaktion mit CLV2 hat. Diese gestörte Proteininteraktion könnte auf Konformationsänderungen in der Proteinstruktur von CRN deuten. In koexprimierenden Zellen konnten jedoch vereinzelt Vesikel und eine reduzierte CLV2/*crn-1*-Interaktion gemessen werden. Diese Vesikel könnten funktional aktive CLV2/CRN-Rezeptorkomplexe an die PM transportieren, die die Ursache für die Restaktivität des CLV-Signalweges in *clv1/crn* Pflanzen sein könnten. Natürlich kann an dieser Stelle auch nicht ausgeschlossen werden, dass der reduzierte *clv*-Phänotyp von *clv1-11/crn-1*-Doppelmutanten auf einem anderen regulatorische Mechanismus basiert.

## **4.2 Die Zusammensetzung des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes im ER ist essentiell für den Transport zur PM.**

Die genetische Interaktionsstudie des CLV-Signalweges führte zur Unterteilung der integralen Membranproteine in zwei funktionell unabhängige Rezeptorkomplexe. Diese bestehen aus CLV1 auf der einen und aus CLV2 mit CRN auf der anderen Seite. In *Arabidopsis* konnte für CLV1, CLV2 und CRN eine PM-Lokalisation in Wurzelzellen beobachtet werden. Die Expression bzw. Proteinkonzentration ist jedoch zu gering, um GFP-Fluoreszenz im SAM zu detektieren. Die Komplementation des SAM-Phänotyps beweist jedoch, dass die Rezeptoren in ausreichender Menge im SAM exprimiert werden. Für CRN konnte die Proteinfunktion in der Wurzel nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass die PM-Lokalisation die *In-vivo*-Lokalisation widerspiegelt. Die Proteinlokalisationsstudie im heterologen Expressionssystem zeigte für CRN oder CLV2 eine ER-Lokalisation in Abwesenheit des jeweils anderen Proteins. Die Ursache hierfür konnte bisher nicht genauer geklärt werden.

Die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems ermöglichte die Analyse der Proteinlokalisierung und der Interaktion bei unterschiedlichsten Proteinkonzentrationen. Dies schließt eine ER-Lokalisation von CRN und CLV2 aufgrund einer Überexpression aus. Sekretierte oder membranlokalisierte Proteine werden in das ER hinein synthetisiert und von dort über Vesikel zu ihrem Zielort in der Zelle transportiert. Innerhalb des ERs erhalten Proteine meist posttranslationale Modifikationen und durchlaufen eine sogenannte Qualitätskontrolle, durch die fehlerhaft gefaltete Proteine bereits im ER erkannt, zurückgehalten und schließlich für die Degradation markiert werden. Auch die Assemblierung von größeren Komplexen aus einzelnen Untereinheiten findet im ER statt und ist essentiell für deren Export (zusammengefasst in Pattison *et al.*, 2009). Dies dient dem Zweck, nur

funktionelle Proteine an die PM zu transportieren, die in fehlerhafter Form einen toxischen Effekt auf die Zelle ausüben könnten.

Nach der Proteinsynthese werden viele Proteine durch kovalente Bindung von Oligosacchariden und Bildung von Disulfidbindungen posttranslational modifiziert, was auch für das CLV2 homologe Cf-9 beschrieben ist (Kleizen *et al.*, 2004; Piedras *et al.*, 2000). Die posttranslationale Modifizierung dient unter anderem der Stabilisierung des Proteins und erhöht dessen Faltungseffizienz. Ferner ist die Modifizierung des gebundenen Oligosaccharides für die spezifische Sortierung einzelner Proteine in verschiedene Zellkompartimente vonnöten. Die Faltung von Proteinen im ER wird durch Chaperonbindung (z.B. BIP) an hydrophobe Proteinbereiche unterstützt, da solche Bereiche eines Protein nicht nach außen präsentiert werden. Chaperone unterstützen dabei die erneute Faltung der entsprechenden Proteinbereiche. Diese hydrophoben Bereiche werden auch von dem Enzym UDP-GLUKOSE:GLYKOPROTEIN GLYKOSYLTRANSFERASE (UGGT) gebunden, das eine spezifische Glykosylierung der Oligosaccharide von inkorrekt gefalteten Proteinen katalysiert (McCracken *et al.*, 1996). Diese Oligosaccharidmarkierungen führen zur Bindung der Chaperone Calnexin (CNX) und Calreticulin (CRT), die daraufhin eine erneute Entfaltung des Proteins bewirken. Proteine, die ihre Konformation über einen längeren Zeitraum nicht einnehmen, werden an den ER-assoziierten Protein-Degradationsmechanismus (ERAD) weitergegeben und durch das Proteasom abgebaut (zusammengefasst in Pattison *et al.*, 2009 und Kleizen *et al.*, 2004).

Eine Bindung durch Chaperone könnte somit eine Ursache der ER-Zurückhaltung der einzelnen CRN- und CLV2-Proteine sein. Erst als vollständiger und funktionsfähiger Rezeptorkomplex könnten die Proteine freigegeben und an die PM transportiert werden. Eine Zurückhaltung durch CNX oder CRT wäre durch eine Behandlung mit Endoglykosidase H (Endo H) testbar, da UGGT modifizierte Oligosaccharide von Endo H nicht gespalten werden können (Jin *et al.*, 2007). Eine Untersuchung der Mobilität mittels eines FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) oder FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*)-Experimentes könnte zudem Aufschluss über die Mobilität und Komplexgröße des ER-lokalisierten CLV2- oder CRN-Proteins geben. In einem FRAP-Experiment kann eine molekülspezifische Diffusionskonstante ermittelt werden, die auf die Größe des Proteinkomplexes schließen lässt. Ebenfalls kann in einem FCS-Experiment eine Diffusionskonstante sowie die Molekülkonzentration durch die Betrachtung einzelner Moleküle innerhalb eines konfokalen Volumens bestimmt werden (zusammengefasst in Seward *et al.*, 2009).

Der Export von Proteinen aus dem ER kann durch Exportsignale reguliert werden. Der Export erfolgt an ER-Ausgangspunkten durch COPII Vesikel (zusammengefasst in Hwang *et al.*, 2009). Bestimmte Sequenzen eines Proteins entscheiden dabei über die spätere Lokalisation. So bewirken das KDEL-Motiv auf der dem ER-Lumen zugewandten Seite eines Proteins und das KKXX-Motiv auf cytosolischer Seite den Rücktransport vom Golgi ins ER (Townsend *et al.*, 1994; Itin *et al.*, 1995; Pelham, 1995; Stornaiuolo *et al.*, 2003). Auch das cytosolisch präsentierte RXR-Motiv bewirkt eine Zurückhaltung von Proteinen im ER. Dies ist z.B. für die Untereinheiten des GABA<sub>B</sub>-Rezeptors beschrieben (Pagano *et al.*, 2001). Im Gegensatz hierzu ist das cytoplasmatisch präsentierte saure DXE-Motiv essentiell für den Export von z.B. K<sup>+</sup>-Einstromkanälen (zusammengefasst in Mikosch *et al.*, 2009).

Um ein solches ER-Zurückhaltungsmotiv in CRN oder CLV2 zu identifizieren, wurden zahlreiche Deletionsderivate der beiden Proteine getestet. Da jedoch keines dieser Derivate eine PM-Lokalisation zeigte, ist die Regulation von CRN oder CLV2 durch ein solches ER-Zurückhaltungsmotiv eher unwahrscheinlich, da dessen Deletion sonst zu einer PM-Lokalisation geführt hätte. Die Deletion der EZD von CRN bewirkte allerdings eine Zurückhaltung im ER trotz Koexpression von CLV2. Die nicht gestörte Interaktion zwischen CRN $\Delta$ EZD und CLV2 zeigt, dass keine gravierende Störung in der Proteinfaltung vorlag. Eine partielle Deletion der EZD führte dagegen nicht zur Zurückhaltung des CRN/CLV2-Komplexes im ER, sondern zur Translokation an die PM. Eine Ursache für die zuvor beobachtete ER-Lokalisation könnte somit eine spezifische Interaktion von unbekanntem Proteinen mit Teilen der EZD von CRN sein, die für den PM-Transport essentiell sind.

Eine weitere Möglichkeit ist eine ER-Zurückhaltung durch ein Motiv in der TMD. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass das virale Transmembranprotein gp36.5/m164 des Cytomegalovirus bedingt durch die TMD im ER zurückgehalten wird (Däubner *et al.*, 2010). Von vielen viralen Glykoproteinen ist eine ER-Lokalisation beschrieben worden, deren Mechanismus jedoch nicht genau analysiert werden konnte. Aufgrund der hohen Mobilität von gp36.5 im ER konnte eine Bindung von Chaperonen und dadurch verursachte ER-Zurückhaltung ausgeschlossen werden. Die Fusion der TMD von gp36.5/m164 an ein GFP reicht bereits aus, um eine ER-Lokalisation des GFPs zu bewirken. Da diesem Fusionsprotein eine N-terminale Signalsequenz fehlt, muss die TMD das GFP spezifisch an der ER-Membran fixieren.

Um letztlich sicherzustellen, dass dieser ER-Zurückhaltungsmechanismus von CRN und CLV2 in *Arabidopsis* ebenfalls existiert, müssen die Fusionsproteine bei gleichzeitigem Funktionsverlust des Partners exprimiert und analysiert werden. Dies kann durch die

Expression von CRN-GFP bzw. CLV2-GFP in der *clv2-1-* bzw. *crn-1-*Mutante erzielt werden. Falls CRN und CLV2 nur zusammen an die PM transportiert werden, dann sollte sich die zuvor beobachtete PM-Lokalisation in *Arabidopsis*-Linien zu einer ER-Lokalisation in der entsprechenden Mutante wandeln. Die in einigen *Arabidopsis*-Linien für CLV2 und CRN beobachtete GFP-Fluoreszenz im ER könnte ein Resultat dieses Zurückhaltemechanismus sein. In diesem Fall wäre dies aber möglicherweise durch eine zu hohe Proteinkonzentration ausgelöst.

Die Proteininteraktionsstudie mittels Quantifizierung des FRET-Effektes, durch APB- oder FLIM-Experimente, deutete auf eine direkte Interaktion zwischen CRN und CLV2 hin, die im Fall von CRN auf die TMD zurückzuführen ist. Diese Interaktion ist essentiell für die PM-Lokalisation dieser Proteine (Abb. 26). Aufgrund der hohen gemessenen FRET-Werte und der Lokalisationsabhängigkeit von CRN und CLV2 ist davon auszugehen, dass diese Proteine einen konstitutiven Rezeptorkomplex bilden. CRN ist im Gegensatz zu CLV2 in der Lage, Homomere zu bilden. Der einfachste vorstellbare Rezeptorkomplex besteht deshalb aus zwei CRN-Proteinen, die jeweils ein CLV2-Molekül gebunden haben (Abb. 26). Eine genaue Analyse der sterischen Zusammensetzung eines Rezeptorkomplexes war bisher jedoch nicht möglich. Ein relatives Verhältnis dieser Proteine könnte jedoch durch eine FCCS (*Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy*)- oder eine FIDA (*Fluorescence-Intensity-Distribution-Analysis*)-Messung ermittelt werden. FCCS beruht dabei auf der simultanen Diffusionsanalyse zweier Fluorophore innerhalb eines konfokalen Volumens. FIDA verwendet ebenfalls FCS-Datensätze, errechnet jedoch anhand der Helligkeitsverhältnisse einzelner Amplituden die sterische Zusammensetzung eines Komplexes. Kritisch bei diesen Verfahren ist jedoch immer die Molekülkonzentration und die Autofluoreszenz der Zelle, da nur die Auswertung von Einzelereignissen (bzw. möglich wenigen Ereignissen) ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Dadurch können interagierende Moleküle sowie das Konzentrationsverhältnis der Fluorophore zueinander ermittelt werden.

### **4.3 PM-Translokation von AtRLPs wird nicht durch Koexpression von CRN vermittelt.**

Natürlich stellt sich die Frage, ob dieser ER-Zurückhaltemechanismus CRN/CLV2-spezifisch oder auch auf andere RLPs übertragbar ist. Wang *et al.*, 2010 konnte zeigen, dass die CLV2-Homologe AtRLP2 und AtRLP12 die CLV2-Funktion im Spross ersetzen können. Ebenso kann AtRLP38 CLV2 ersetzen, wenn dessen LRRs durch die von CLV2 ausgetauscht werden. Daher sollte analysiert werden, ob diese RLPs ebenfalls über CRN das CLV3-Signal

in die Zelle weiterleiten. In dem induzierbaren heterologen Expressionssystem zeigten diese RLPs ebenfalls eine ER Lokalisation, die unabhängig von der Proteinkonzentration auftrat. Jedoch führte die Koexpression von CRN in diesen Fällen nicht zu einer PM-Lokalisation. Es stellt sich somit die Frage, ob RLPs im Allgemeinen im ER zurückgehalten werden und ob sie im Komplex mit anderen Proteinen wie den RLCKs (rezeptorähnlichen Kinasen ohne extrazelluläre Domäne) an die PM transportiert werden. An dieser Stelle kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die ER-Lokalisation dieser RLPs ein Effekt des heterologen Expressionssystems oder der C-terminalen FP-Fusion ist, da keine Komplementationsanalyse durchgeführt wurde.

Für das CLV2-Homolog Cf-9 aus Tomate wurde in zwei Publikationen eine jeweils gegensätzliche Lokalisation des Proteins postuliert. Piedras *et al.*, 2000 zeigte mittels einer Zweiphasenauftrennung eines Proteinextraktes aus Cf-9 exprimierenden *N. benthamiana*-Blättern eine PM-Lokalisation. Dagegen postulierte Benghezal *et al.*, 2000 mit derselben Methode anhand von transformierten BY-2-Zellen eine ER-Lokalisation von Cf-9. Da Cf-9 in der Epidermis exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass ein potentieller Interaktionspartner für den Transport an die PM ebenfalls in *N. benthamiana* exprimiert wird und ausreichend konserviert ist, um mit Cf-9 zu interagieren.

Ein anderes RLP, das bisher analysiert wurde, ist TOO MANY MOUTH (TMM), dessen PM-Lokalisation und Expression anhand von Reporterlinien unter der Kontrolle des endogenen Promoters in *Arabidopsis* analysiert wurde. TMM wird in der Epidermis exprimiert und ist an der Stomataentwicklung beteiligt (Nadeau *et al.*, 2002). Falls TMM wie CLV2 einem ER-Zurückhaltmechanismus unterliegt, würde dieser bei der endogenen Expression nicht auffallen. Die Expression von TMM durch das in dieser Arbeit beschriebene heterologe Expressionssystem führte ebenfalls zu einer ER-Lokalisation des Proteins (persönliche Mitteilung von Marc Somssich).

Diese Ergebnisse könnten auch auf eine allgemeine Konzentrationskontrolle RLPs-enthaltender Rezeptorkomplexe an der PM schließen lassen. Des Weiteren deuten sie an, dass RLP2 und RLP38 nicht mit CRN interagieren und daher die publizierte Rettung der *clv2-1*-Pflanzen CRN-unabhängig ist.

#### **4.4 Bildung eines multimeren Rezeptorkomplexes im CLV-Signalweg.**

Die genetischen Untersuchungen des CLV-Signalweges zeigten eine funktionelle Separierung von CLV1 und CLV2/CRN. Dies schließt jedoch die Bildung eines multimeren Rezeptorkomplexes mit Beteiligung aller drei Proteine nicht aus. Tatsächlich konnte eine

Interaktion des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes mit CLV1 gemessen werden. Diese Interaktion deutet eine potentielle Kommunikation der beiden Rezeptorkomplexe an, deren Funktion jedoch bisher unklar ist.

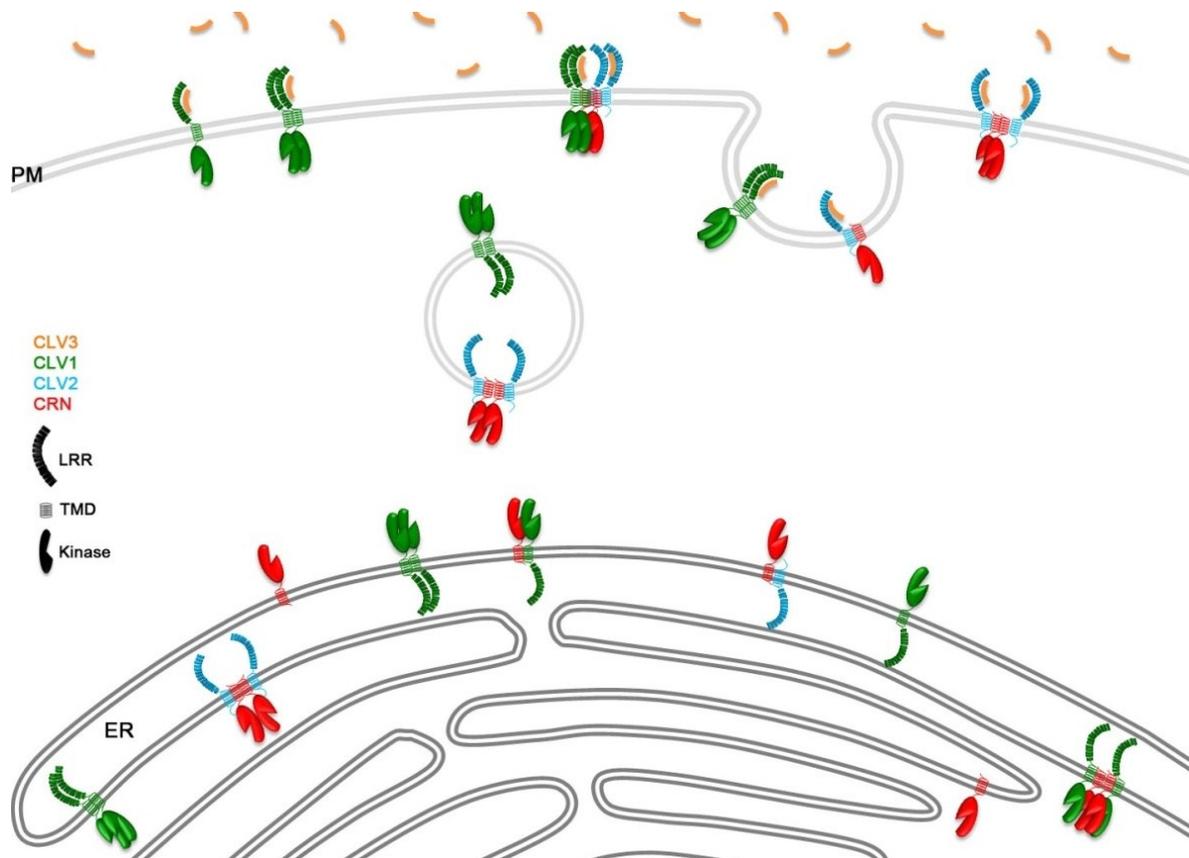
Der Energietransfer zwischen CLV1 und CRN ist höher als der zu CLV2, selbst bei deletierter Kinasedomäne, wodurch die unterschiedliche Proteinstruktur der einzelnen Proteine zu vernachlässigen ist. Dies zeigt, dass die Interaktion des CRN/CLV2 Rezeptorkomplexes mit CLV1 durch CRN vermittelt wird und zwar von der TMD. Aufgrund der messbaren Bildung von CLV1-Homomeren besteht der einfachste multimerer Rezeptorkomplex aus zwei CRN-Molekülen, die jeweils ein CLV2-Molekül gebunden haben, und einem CLV1-Homodimer (Abb. 26).

Der geringe Energietransfer zwischen den Rezeptorkomplexen könnte durch einen höheren Abstand zwischen den Fluorophoren bzw. durch eine fehlerhafte Stellung der Fluorophordipolmomente zueinander erklärt werden. Die Verbindung der FPs an die Rezeptoren fand jedoch über eine 16 AS lange Peptidkette statt, die eine freie Rotation des Fluorophors gewährleisten sollte. Darüber hinaus sollte die Deletion der Kinasedomäne von CLV1 und CRN die Fluorophore in direkter Nachbarschaft an der Membran fixieren, wie es zwischen CRAKi und CLV2 zu messen war. Der geringe Energietransfer zwischen CRAKi und C1ΔKi könnte daher auf einer messbaren Interaktion von kleinen Proteinpulationen beruhen.

Inwieweit diese Bildung eines multimeren Rezeptorkomplexes induzierbar ist und ob Funktionsunterschiede zwischen dem kleinen und dem großen Komplex existieren, ist bisher noch nicht geklärt. Solch eine detaillierte Untersuchung von Proteinpulationen und deren Verhalten bei Ligandenbehandlung ist durch FLIM-Experimente, basierend auf einer multiexponentialen Zerfallskurve, möglich. Auch die Lokalisation der Rezeptorkomplexe kann mit diesem Verfahren analysiert werden. In Abschnitt 3.3.10 wurde hierzu als Beispiel die reduzierte Donorlebenszeit von CLV1-GFP-mCherry-Proteinen in Vesikeln gezeigt. Dieser Effekt könnte auf einer erhöhten Konzentration der einzelnen Proteine im Vesikel basieren, wodurch der intermolekulare Energietransfer erhöht wird. Der erhöhte Energietransfer könnte jedoch auch in einer Konformationsänderung des Proteins begründet sein, wodurch der intramolekulare Energietransfer gesteigert würde.

Ob die Bildung von Vesikeln und der damit verbundene veränderte Energietransfer durch die Ligandenbindung induziert wurde, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht sagen, da entsprechende Kontrollexperimente noch ausstehen. Jedoch könnten die bisher nicht quantifizierte potentielle Steigerung in der Vesikelbildung sowie die reduzierte Lebenszeit

nach CLV3-Behandlung andeuten, dass die CLV3-Bindung eine Internalisierung des Rezeptorkomplexes bewirkt. Das CLV3-Signal würde dann aus Vesikeln in die Zelle weitergeleitet. Solch ein Signalwegmodell ist bereits für die Interaktion zwischen BAK1 und FLS2 sowie zwischen BAK1 und BRI1 beschrieben worden (Robatzek *et al.*, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007; Geldner *et al.*, 2007).



**Abb. 26 Modell des CLV-Signalwegs im SAM, basierend auf Proteininteraktionsstudien.**

Modifiziertes Modell des CLV-Signalwegs. Im ER (dunkelgrau) wird ein Komplex aus CLV2 (blau) und CRN (rot) gebildet, der aufgrund der Homomerisierung von CRN aus zwei CRN-Molekülen mit jeweils einem gebundenen CLV2-Molekül besteht. Solch ein Komplex wird dann an die PM (hellgrau) transportiert. CLV1 (grün) ist in der Lage, Homomere zu bilden und wird direkt an die PM transportiert. Diese beiden Rezeptorkomplexe können, vermittelt durch CRN, miteinander interagieren.

Eine Analyse der CRN- bzw. CLV2-Derivate bezüglich ihrer Funktionalität in *Arabidopsis* konnte bisher aufgrund von Transformationsproblemen nicht durchgeführt werden. Interessant wäre jedoch, ob ein CRN/CLV2-Rezeptorkomplex, der im ER zurückgehalten wird, die *crn-1*-Mutante komplementieren kann. Somit könnte geklärt werden, ob die prozessierten CLE-Peptide nur auf PM-lokalisierte Rezeptoren wirken oder bereits im ER den entsprechenden Signalweg induzieren können. Auch die Funktion der Kinasedomäne von CRN im Signalweg wäre auf diese Weise analysierbar. Die Identifizierung des *crn-3*-Allels, das ein Stopcodon in der Kinasedomäne trägt, zeigt, dass diese Domäne für die

Weiterleitung des CLV3-Signals essentiell ist. Hierbei ist es jedoch unklar, ob nur die Proteindomäne oder auch die enzymatische Aktivität der Domäne benötigt wird. Durch die Lokalisationsstudie der verschiedenen CRN-Derivate konnte allerdings gezeigt werden, dass die Bildung des CLV2/CRN-Rezeptorkomplexes und dessen PM-Lokalisation weder von der Kinasefunktion noch von der Kinasedomäne selbst abhängig sind.

#### **4.5 Stabilisierung der Stammzellpopulationsgröße durch ein Netzwerk vieler Signalwege.**

Geringe Schwankungen in der *CLV3*- oder *WUS*-Expression während der Pflanzenentwicklung haben keinen direkten Einfluss auf die Stammzellpopulationsgröße (Müller *et al.*, 2006; Geier *et al.*, 2008). Die Ausprägung des *clv*-Phänotyps ist abhängig von den Wachstumsbedingungen. So führt ein Wachstum unter Kurztagbedingungen zur Suppression des SAM-Phänotyps (Kayes *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen zeigten, dass die Perzeption des jeweiligen Signals durch andere Signalwege im SAM reguliert und gepuffert wird. Dadurch wird eine konstante Stammzellanzahl und somit eine konstante Organanzahl gewährleistet. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Signalwege, um ein besseres Verständnis der netzwerkartigen Regulation von Stammzellen zu erlangen, ist daher ein wichtiges Ziel. George Rèdei isolierte 1957 den Ökotyp *Ler* aus röntgenbestrahlten Landsberg-Samen und benutzte diesen aufgrund seiner für viele Analysen vorteilhaften kompakten Wuchsform zur Erzeugung und Isolierung verschiedenster Mutanten. Diese kompaktere Wuchsform konnte auf eine Punktmutation im *ERECTA (ER)*-Locus zurückgeführt werden (Torii *et al.*, 1996). Dies schließt allerdings die Existenz von weiteren bisher unbekanntem Hintergrundmutationen nicht aus.

Der Vergleich von *clv/crn*-Allelen in den Ökotypen *Col* und *Ler* zeigte, dass in *Ler* Teile des SAM-stabilisierenden Netzwerks defekt sind. Diese Defekte betreffen redundante Systeme, da *Ler* zwar ein flacheres, jedoch breiteres SAM bildet, welches trotzdem dieselbe Blütenorgananzahl produziert (Laufs *et al.*, 1998b). Die *clv*- oder *crn*-Allele im *Ler*-Ökotyp spiegeln immer die Analyse von Doppelmutanten (*clv/er* bzw. *crn/er*) wider. Demnach könnte der stärkere *clv*-Phänotyp auf dem Funktionsverlust von *er* basieren. *clv3-9/er* (*Col*) weist jedoch im Vergleich zu *clv3-2 (Ler)* einen schwächeren Phänotyp auf (~3.8 Karpelle in *Col er* vs. ~6.0 Karpelle in *Ler*). Beide Allele stellen durch den Verlust des CLE-Motives funktionelle Nullallele dar. Dies zeigt, dass nicht der Funktionsverlust von *ER* die Ursache für die Verstärkung des *clv*-Phänotyps in *Ler* ist, sondern dass weitere Komponenten an der Regulation des CLV-Signalweges beteiligt sind.

Diese Untersuchungen verdeutlichen die Existenz unterschiedlicher Signalwege, die in einem großen Netzwerk miteinander verbunden sind, wodurch Defekte oder Ausfälle einzelner Komponenten durch andere Komponenten kompensiert werden können. Ob die beobachtete Verstärkung des *clv*-Phänotyps in *Ler* auf dem Defekt einzelner Genloci beruht, kann durch Kreuzung dieser beiden Doppelmutanten (*clv3-9/er* X *clv3-2/er*) mit anschließender Segregationsanalyse geklärt werden. Inwieweit der *clv*-Phänotyp aber tatsächlich durch *ER* beeinflusst wird, sollte ebenfalls durch genetische Untersuchungen von Doppel- und Einzelmutanten im Col-Hintergrund analysiert werden.

#### 4.6 Genetische Interaktionsstudie des CLV-Signalweges mit RPK2.

Die Identifizierung von *rpk2-4* als Suppressor der durch CLE-Peptide verursachten Differenzierung des proximalen WAM zeigte die Beteiligung von RPK2 in der CLE-abhängigen Regulation des Wurzelwachstums. Der Funktionsverlust von RPK2 führt, gemessen an der Karpellanzahl, zur Bildung eines vergrößerten SAMs. Die Kombination des hypermorphen *rpk2-4*-Allels mit den einzelnen Rezeptormutanten des CLV-Signalweges wies eine Verstärkung des *clv*-Phänotyps auf, was auf eine weitere Erhöhung der Stammzellanzahl deutet. Dieser additive Phänotyp konnte nur für *clv1-11/rpk2-1*, nicht aber für *crn-1/rpk2-1* beobachtet werden. Eine Analyse von *clv2-1/rpk2-1* steht noch aus. Es ist bislang noch unklar, ob dieser additive Phänotyp andeutet, dass RPK2 Teil des CLV-Signalweges ist, oder ob das vergrößerte Meristem einen indirekten Effekt darstellt.

Über das Expressionsmuster von RPK2 sowie die Auswirkungen eines Funktionsverlustes auf die Expression von *WUS* liegen derzeit keine Daten vor. Während der Embryogenese werden *RPK2* und *RPK1* redundant für die Kotyledoneninitiierung benötigt. Der Funktionsverlust beider RLKs bewirkt eine Störung in der Differenzierung des Protoderms (Nodine *et al.*, 2008). Das Protoderm bzw. die L1 ist jedoch für die Etablierung des gerichteten Auxintransportes, der die Initiierung und Entwicklung von Kotyledonen und späteren Organen reguliert, essentiell (Benkova *et al.*, 2003; Izhaki *et al.*, 2007). Wenn *RPK1*/*RPK2* ebenfalls im postembryonalen Wachstum die Differenzierung von Zellen steuern, könnte die Reduktion dieses Signalweges in *rpk2*-Pflanzen Ursache der beobachteten Phänotypen sein.

Die progressive Akkumulation von undifferenziertem Gewebe in den Doppelmutanten ist ebenfalls durch eine verzögerte Differenzierung der Zellen in der Peripherie zu erklären. Die gestörte Auxinverteilung infolge einer gestörten PIN-Lokalisation erklärt das erhöhte

Auftreten des beschriebenen „valveless“ Phänotyps ebenfalls, da die apikal-distale Achse von Organen durch einen Auxingradienten reguliert wird.

Ferner konnte bei der Analyse von *rpk1/rpk2*-Embryonen eine ektopische *STM*-Expression detektiert werden (Nodine *et al.*, 2008). Sollte in *rpk2*-Pflanzen eine Erhöhung der *STM*-Expression zu verzeichnen sein, könnte auch dies die Ursache für die erhöhte Karpellanzahl darstellen. *STM* reguliert den Cytokiningehalt des SAMs positiv durch Aktivierung der Cytokininbiosynthese (siehe Abschnitt 1.1.5; Jasinski *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005). Cytokinin selbst ist ein positiver Regulator von *WUS* und könnte zu einer erhöhten *WUS*-Expression und damit zu einer erhöhten Stammzellanzahl führen. Da die Analyse auf der Kreuzung verschiedener Ökotypen basiert, die den *clv*-Phänotyp stark beeinflussen, sollte diese erneut mit den Col-Allelen durchgeführt werden, um mögliche Hintergrundeffekte zu eliminieren.

#### 4.7 Querverbindungen des CLV-Signalweges.

Auf der Suche nach Komponenten, die die Stammzellanzahl im SAM beeinflussen, konnten viele Mutanten identifiziert werden. Um diese Regulation auf der molekularen Ebene zu verstehen und damit die regulatorischen Knotenpunkte zwischen den Signalwegen zu identifizieren, wurden einige membrangebundene Komponenten auf ihr Interaktionspotential mit den Rezeptoren des CLV-Signalweges hin untersucht.

Die BAM-Rezeptoren steuern den Erhalt von Stammzellen positiv, da der Verlust dieser redundant wirkenden CLV1-Homologe zum SAM-Arrest führt. Die in *bam1/bam2* beobachtete reduzierte SAM-Größe wurde durch ein Titrationsmodell erklärt. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass im SAM exprimierte CLE-Peptide von BAM-Rezeptoren in der PZ gebunden werden. Im Falle eines Funktionsverlustes der BAMs würde somit mehr ungebundenes CLE-Peptid in die ZZ diffundieren und durch Aktivierung des CLV-Signalweges zu einer verstärkten *WUS*-Repression führen (DeYoung *et al.*, 2006; DeYoung *et al.*, 2008).

Die Analyse der phänotypischen Auswirkungen eines Funktionsverlustes von BAM-Rezeptoren auf den *clv*-Phänotyp wurde als Bestätigung dieses Titrationsmodells interpretiert. Dies ist aber nach heutiger Datenlage nicht mehr haltbar. So wirkt sich der Funktionsverlust von BAM1 oder BAM2 partiell supprimierend auf den *clv*-Phänotyp von *clv3-2*-Pflanzen aus, hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf *clv2-1*-Pflanzen. Der *clv*-Phänotyp von *clv1*-Pflanzen wird durch einen Funktionsverlust der BAMs verstärkt. Die Karpellanzahl ist in Doppel- und Dreifachmutanten höher als in *clv3-2*-Pflanzen. Das Titrationsmodell basiert

noch auf der Annahme, dass ein Rezeptorkomplex, bestehend aus CLV1 und CLV2 das CLV3-Signal weiterleitet. Außerdem wurde davon ausgegangen, dass die BAM-Rezeptoren ebenfalls in der ZZ exprimiert werden und dort redundant mit CLV1 die Repression von *WUS* bewirken. Es gibt jedoch keinerlei Indizien für eine solche Expression der BAMs in der ZZ. Weder die publizierten RNA-*In-situ*-Hybridisierungsdaten noch die im Zuge dieser Arbeit hergestellte BAM1-Reporterlinie (Abschnitt 0) deuten auf eine solche Expression von BAM1 in der L2 oder L3 der ZZ. Basierend auf der Grundlage, dass zwei separate Rezeptorkomplexe für die Weiterleitung des CLV-Signalweges verantwortlich sind, sollte in *clv1/bam1*-, *clv1/bam2*- oder in *clv1/bam1/bam2*-Mutanten keine höhere Karpellanzahl als in *clv3-2*-Pflanzen zu beobachten sein. Dem Tritrationsmodell zufolge sollte es in diesen Doppel- und Dreifachmutanten zu einer erhöhten CLE-Peptidkonzentration in der ZZ kommen. Diese externen CLE-Peptide sowie CLV3 selbst sollten zu einer Aktivierung des CLV2/CRN-abhängigen CLV-Signalweges ausreichen, um *WUS* zu reprimieren.

BAM1 und BAM2 werden in der PZ exprimiert. RNA-*In-situ*-Hybridisierungen von CLV1 hingegen zeigen eine Expression im OZ und der ZZ mit Ausnahme der L1 (Trotochaud *et al.*, 1999). Diese Expressionsdaten schließen eine an der Grenze zwischen ZZ und PZ überlappende Expression dieser Proteine nicht aus. Jedoch konnte keine Interaktion zwischen den Rezeptoren des CLV-Signalweges und den BAMs gemessen werden (Abschnitt 3.3.9).

Das verstärkte Auftreten des „valveless“ Phänotyps in *clv1/bam1/bam2*-Mutanten könnte ebenfalls auf einem Effekt der BAMs auf die Auxinverteilung bzw. auf die Zelldifferenzierung im SAM, ähnlich dem von *rpk2* hervorgerufen, beruhen. BAM1 wird in der L1 des SAMs exprimiert, die auch die Auxinverteilung im SAM reguliert. Diese Auxinverteilung reguliert wiederum die Anlage von Organen sowie deren Auswuchs und ist in *clv1/bam*- sowie in *clv/rpk2*-Pflanzen gestört (Vernoux *et al.*, 2000; Friml *et al.*, 2003; Izhaki *et al.*, 2007; Nodine *et al.*, 2008). Wenn die BAMs ähnlich wie RPK2 für die Differenzierung der L1 mitverantwortlich sind, wird dieser Effekt jedoch nur in *clv1*-Mutanten sichtbar. Da diese Verstärkung nicht in *clv2*- oder *clv3*-Pflanzen zu beobachten ist, könnte CLV1 zusätzliche Funktionen im SAM haben, die bisher noch nicht bekannt sind.

#### **4.8 Regulation der Rezeptorkinasen durch die Phosphatasen POL und KAPP.**

Für eine Vervollständigung des SAM-regulierenden Netzwerkes ist die Identifizierung von intrazellulären, den Rezeptorkomplexen nachgeschalteten Komponenten unverzichtbar. Bisher konnten in diesem Bereich jedoch nur zwei Phosphatasen identifiziert werden. Für

KAPP, eine kinase-assoziierte Proteinphosphatase, wurde in einem *In-vitro*-Bindungsexperiment die Bindung an ein phosphoryliertes CLV1 und eine daraus resultierende negative Regulation gezeigt (Williams *et al.*, 1997). Diese Bindung von KAPP an CLV1 konnte in APB-Experimenten nicht bestätigt werden. Es ist davon auszugehen, dass CLV1 im Blattgewebe inaktiv, also im nicht-phosphorylierten Zustand vorliegt. Die Behandlung von Blättern mit CLV3 sollte theoretisch zu einer Aktivierung von CLV1 führen und dadurch die Bindung von KAPP an die Kinasedomäne induzieren. Dies sollte einen erhöhten Energietransfer zwischen den gekoppelten Fluorophoren zur Folge haben. Experimentell konnte ein solcher Anstieg des Energietransfers zwar gemessen werden, jedoch bewegte er sich noch immer im Bereich der Hintergrundfluktuation dieses Interaktionssystems. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die sehr geringe Konzentration der interagierenden Proteine, sowie die kurze Dauer ihrer Interaktion.

Erst durch die kürzlich veröffentlichte Analyse der subzellulären Proteinlokalisierung von POL, kam POL als negativer Regulator der Rezeptorkinase in Betracht. Die Bindung von POL an Rezeptorkinasen verhält sich ähnlich wie die von KAPP. Jedoch steigt hier der messbare Energietransfer signifikant über den Hintergrund des Messsystems an. Auch diese Interaktion wird durch CLV3-Behandlung verstärkt. Es fehlen jedoch weitere Kontrollexperimente, um diese Interaktion zu bestätigen. Um eine Regulation der Kinasedomänen durch POL zu belegen sollte z.B. eine Interaktionsstudie zwischen POL und CRAK1 bzw. C1AK1 durchgeführt werden. Ferner sollte die CLE-Peptid-Induzierbarkeit der Proteininteraktion durch Verwendung eines inaktiven CLE-Peptids untersucht werden. Nach derzeitiger Datenlage scheint es jedoch, dass POL als weiterer negativer Regulator des CLV-Signalweges in das Signalnetzwerk eingefügt werden kann. Eine genauere Analyse der interagierenden Proteinpopulationen und der Auswirkungen der Ligandenbehandlung wird erst in FLIM-Experimenten möglich sein. Sollte sich POL als negativer Regulator der Rezeptorkinase bestätigen, könnte man diese Interaktion zur Quantifizierung der CLE-Peptidbindung an unterschiedliche Rezeptoren verwenden.

## 4.9 Ausblick

Das *Arabidopsis*-Genom kodiert 610 Mitglieder der rezeptor-ähnlichen Kinasen (RLKs) und 57 Mitglieder der rezeptor-ähnlichen Proteine (RLPs), von denen bislang nur für einige wenige eine Funktion identifiziert werden konnte (Shiu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer Proteinstruktur können die RLKs in 21 RLK-Klassen und zwei rezeptor-ähnliche cytoplasmatische Kinase (RLCK)-Klassen unterteilt werden. Die RLCKs

unterscheiden sich von den RLKs durch die Abwesenheit einer extrazellulären Domäne. Unter den RLKs bilden die LRR-enthaltenden RLKs mit 216 Mitgliedern die größte Klasse, zu der auch CLV1 gehört. Trotz der auf reverser Genetik basierenden Untersuchungen einzelner RLKs, RLCKs und RLPs konnte für nur wenige eine Funktion beschrieben werden, da sie ihre Funktion meist in Redundanz zu anderen Proteinen ausführen (Wang *et al.*, 2008; Gou *et al.*, 2010).

Durch die verschiedensten Methoden (wie gewebespezifische „Cellsortierung“ oder „Lasermikrodisektion“ mit anschließender Transkriptomanalyse) wächst das Wissen über gewebespezifische Genexpression immer weiter. So konnte von Yadav *et al.*, 2009 ein Expressionsprofil des SAMs erstellt werden, das zur Identifizierung unbekannter L1-, L2- oder L3-spezifischer Gene in der ZZ führte. Basierend auf solchen Expressionsprofilen ist es möglich, potentiell interagierende oder redundant wirkende Proteine aufgrund überlappender Expressionsmuster zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

In dieser Arbeit führen die Studie zur Expression von BAM1 und CLV1 zur Identifizierung einer möglichen Funktion dieser Proteine im WAM und in der Epidermisentwicklung. Eine gezielte Suche nach schwachen oder induzierbaren Phänotypen kann nun folgen. Die *ACR4* überlappenden Expressionsdomänen von *CLV1* und *BAM1* deuten auf eine mögliche gemeinsame Funktion dieser Proteine in der CLE40/ACR4-abhängigen Regulation des distalen WAMs hin (siehe Abschnitt 3.3.2; De Smet *et al.*, 2008; Stahl *et al.*, 2009). Die Bestätigung der Expressionsdomänen mittels RNA-*In-situ*-Hybridisierung steht jedoch noch aus.

Bisher konnte von Yvonne Stahl und Adrian Hülsewede eine potentielle Interaktion zwischen ACR4 und CLV1 bestätigt werden. Der Funktionsverlust von *ACR4* bewirkt eine reduzierte Sensitivität des distalen WAMs gegenüber einer CLE-Peptidbehandlung (siehe Abschnitt 1.1.4 und 1.2.2). Eine Analyse der *clv1*- und *bam1*-Allele auf einem *acr4*-ähnlichen Phänotyp steht noch aus. Da CLV1 im Spross durch BAM1 ersetzt werden kann, lässt die überlappende Expression eine potentielle Redundanz beider RLKs in der WAM-Entwicklung vermuten. Dies wäre auch eine Erklärung für den nicht sichtbaren Phänotyp im WAM der Mutanten. Eine mögliche Expression von BAM2 und BAM3 in der Wurzel ist bisher noch nicht beschrieben, beide Proteine agieren im Spross jedoch redundant zu BAM1, was durchaus auch in der Wurzel möglich ist. Transkriptomanalysen von Wurzelzellen deuten ebenfalls auf eine potentielle Expression von BAM2 und BAM3 in der Wurzel (Brady *et al.*, 2007). Aufgrund der breiten Expression von BAM1 im WAM ist eine Funktion im proximalen WAM nicht ausgeschlossen.

Die in dieser Arbeit gelungene Etablierung der *In-planta*-Interaktionsstudie mittels APB-Experimenten erwies sich als schnelle und zuverlässige Methode zur Studie der konstitutiven Interaktion zweier Proteine. Diese Technik stößt bei der Studie von Proteininteraktionen zwischen Proteinsubpopulationen, die sehr kurzlebig sind, jedoch an ihre Grenzen. So lassen die APB-Experimente mit den Phosphatasen KAPP und POL eine mögliche Regulation der Rezeptorkinasen als wahrscheinlich erscheinen. Eine räumliche, detailliertere Auflösung der Proteininteraktionen gelang durch die Etablierung der Proteininteraktionsstudien mittels FLIM. Durch die Messung der verschiedensten Parameter von Fluorophoren und die Anwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmesstechniken können Informationen über die Proteine und deren Rezeptorkomplexe gesammelt werden, die Auskunft über die Größe und Verhalten dieser Komplexe in der Zelle liefern. Hierfür ist die Proteinkonzentration von entscheidender Bedeutung, da Techniken wie FCS, FCCS oder FIDA die besten Daten bei Messungen von möglichst wenigen Molekülen idealerweise eines einzelnen Moleküls ergeben. Mit dem induzierbaren Expressionssystem könnte es bald gelingen, diese Messtechniken, die bisher meist nur in Lösungen angewendet werden, auf die lebende Zelle zu übertragen. Natürlich verändert sich in einer Zelle das Signal-zu-Rausch-Verhältnis negativ, weshalb erst noch Algorithmen etabliert werden müssen, die dieses zellspezifische Rauschen aus den Datensätzen entfernen.

## 5 Zusammenfassungen

### 5.1 Zusammenfassung

Postembryonales Pflanzenwachstum basiert auf der Teilungsaktivität von Stammzellen, die in Meristemen an den apikalen Polen der Pflanze lokalisiert sind. Im Sprossapikalmeristem (SAM) von *Arabidopsis* wird der Stammzellerhalt durch eine negative Rückkopplungsschleife zwischen *CLAVATA3 (CLV3)* und *WUSCHEL (WUS)* reguliert. Die Stammzellen sekretieren CLV3, ein 13 Aminosäuren großes Peptid, das zur Aktivierung des CLV-Signalweges führt. Dieser bewirkt die Repression des Transkriptionsfaktor *WUS* in den Zellen des Organisierenden Zentrum (OZ). *WUS* ist essentiell für den Stammzellerhalt und damit indirekt für die *CLV3*-Expression. Die Perzeption von CLV3 in die Zelle erfolgt über drei integrale Membranproteine: die rezeptor-ähnliche Kinase CLV1, das rezeptor-ähnliche Protein CLV2 und die Membrankinase CORYNE (CRN).

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Analyse der genetischen und molekularen Interaktion von Komponenten des CLV-Signalweges. Andere Signalwege innerhalb des SAM beeinflussen und stabilisieren den Stammzellerhalt ebenfalls. Für eine bessere Integration wurde eine potentielle Interaktion dieser Komponenten mit dem CLV-Signalweg auf genetischer, molekularer und expressioneller Ebene untersucht.

Die Plasmamembran (PM)-Lokalisation von CLV2 und CRN ist abhängig von deren Interaktion. Nur in einem heteromeren Rezeptorkomplex erfolgt dessen Translokation an die PM. Proteine, die nicht Teil eines solchen Komplexes sind, über einen bisher unbekanntem Mechanismus werden im ER zurückgehalten. Basierend auf der Proteininteraktionsstudie besteht der einfachste heteromere Rezeptorkomplex aus einem CRN-Homodimer, der zwei CLV2-Moleküle gebunden hat. Dieser heteromere und funktionell unabhängige Rezeptorkomplex kann, vermittelt durch CRN, mit einem homomeren CLV1-Komplex interagieren. Somit findet, trotz funktioneller Unabhängigkeit dieser Rezeptorkomplexe eine Interaktion und damit eine potentielle Kommunikation zwischen ihnen statt.

Durch eine Proteininteraktionsstudie konnte gezeigt werden, dass die Kinasedomänen von CLV1 und CRN einer negativen Regulation durch die Proteinphosphatase POLTERGEIST (POL) unterliegen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die positive Regulation des Stammzellerhalts durch die CLV1-Homologen BARELY ANY MERISTEM (BAM) 1-3 nicht auf einer direkten Proteininteraktion mit den Komponenten des CLV-Signalweges basiert.

## 5.2 Abstract

Post-embryonic plant growth is based on the proliferative activity of stem cells that are localized in meristems at the apical poles of plants. In the shoot apical meristem (SAM) of *Arabidopsis*, stem cell maintenance is regulated by a negative feedback loop between *CLAVATA3* (*CLV3*) and *WUSCHEL* (*WUS*). The stem cells secrete *CLV3*, a peptide that activates the *CLV*-signaling pathway which represses the transcription factor *WUS* in the cells of the Organizing Center (OC). *WUS* is essential for stem cell maintenance, and thus indirectly for the expression of *CLV3*. In cells of the meristem the perception of *CLV3* is mediated by the three integral membrane proteins *CLV1*, a receptor-like kinase, *CLV2*, a receptor-like protein and *CORYNE* (*CRN*), a membrane kinase protein.

This work focuses on the analyses of the genetic and molecular interaction between components of the *CLV*-signaling pathway. Several other signaling pathways within the SAM influence and stabilize stem cell maintenance. For a better integration, a potential interaction of these components with the components of the *CLV*-signaling pathway was carried out on a genetic, molecular and expressional level.

The plasma membrane (PM) localization of *CLV2* and *CRN* depends on their interaction. Only the heteromeric *CLV2/CRN* receptor complex is transported to the PM. Proteins that are not part of such a complex are retained in the ER, via an unknown mechanism. Based on the protein interaction study presented in this work, the simplest heteromeric receptor complex consists of a *CRN* homodimer that is bound to two *CLV2* molecules. This functionally independent heteromeric complex can interact with a homomeric *CLV1* complex mediated by *CRN*. In spite of the functional independence of these receptor complexes, they have the potential to interact which therefore allows communication of these complexes.

In a protein interaction study a possible negative regulation of the kinase domains of *CLV1* and *CRN* by the protein phosphatase *POLTERGEIST* (*POL*). Additionally it was shown that the positive regulation of stem cell maintenance through the *CLV1* homologs *BARELY ANY MERISTEM* (*BAM*) 1-3 is not based on a direct protein interaction with the components of the *CLV* signaling pathway.

## 6 Literatur

- Albertazzi, L., Arosio, D., Marchetti, L., Ricci, F., and Beltram, F.** (2009). Quantitative FRET analysis with the EGFP-mCherry fluorescent protein pair. *Photochem Photobiol* **85**, 287-297.
- Ausubel, F.M.** (1996). *Current protocols in molecular biology*. (New York: Wiley).
- Benghezal, M., Wasteneys, G.O., and Jones, D.A.** (2000). The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. *Plant Cell* **12**, 1179-1201.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemssen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.-Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U., and Benfey, P.N.** (2007). A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science* **318**, 801-806.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**, 617-619.
- Byrne, M.E.** (2006). Shoot meristem function and leaf polarity: the role of class III HD-ZIP genes. *PLoS Genet* **2**, e89.
- Casamitjana-Martinez, E., Hofhuis, H.F., Xu, J., Liu, C.M., Heidstra, R., and Scheres, B.** (2003). Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Curr Biol* **13**, 1435-1441.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development* **121**, 2057-2067.
- Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- 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.
- Cock, J.M., and McCormick, S.** (2001). A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiol* **126**, 939-942.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**, 462-469.
- Däubner, T., Fink, A., Seitz, A., Tenzer, S., Muller, J., Strand, D., Seckert, C.K., Janssen, C., Renzaho, A., Grzimek, N.K., Simon, C.O., Ebert, S., Reddehase, M., Oehrlein-Karpi, S.A., and Lemmermann, N.A.** (2010). Identification of a novel transmembrane domain mediating retention of a highly motile herpesviral glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol*.
- De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M.P., Grunewald, W., Van Damme, D., Van Noorden, G., Naudts, M., Van Isterdael, G., De Clercq, R., Wang, J.Y., Meuli, N., Vanneste, S., Friml, J., Hilson, P., Jurgens, G., Ingram, G.C., Inze, D., Benfey, P.N., and Beckman, T.** (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science* **322**, 594-597.
- Dellaporta, S.W., J; Hicks, JB** (1983). A plant DNA miniprep preparation version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19 - 21.
- DeYoung, B.J., and Clark, S.E.** (2008). BAM receptors regulate stem cell specification and organ development through complex interactions with CLAVATA signaling. *Genetics* **180**, 895-904.
- DeYoung, B.J., Bickle, K.L., Schrage, K.J., Muskett, P., Patel, K., and Clark, S.E.** (2006). The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in *Arabidopsis*. *Plant J* **45**, 1-16.
- Dievart, A., and Clark, S.E.** (2003a). Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 507-516.
- Dievart, A., Dalal, M., Tax, F.E., Lacey, A.D., Huttly, A., Li, J., and Clark, S.E.** (2003b). CLAVATA1 dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development. *Plant Cell* **15**, 1198-1211.
- Ding, Z., and Friml, J.** (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71-84.
- Ethells, J.P., and Turner, S.R.** (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development* **137**, 767-774.
- Fiers, M., Golemic, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., and Liu, C.M.** (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* **17**, 2542-2553.
- Fisher, K., and Turner, S.** (2007). PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr Biol* **17**, 1061-1066.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Förster, T.** (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55-75.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jurgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 147-153.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G., and Palme, K.** (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 661-673.
- Gagne, J.M., and Clark, S.E.** (2010). The *Arabidopsis* Stem Cell Factor POLTERGEIST Is Membrane Localized and Phospholipid Stimulated. *Plant Cell*.
- Gallois, J.L., Nora, F.R., Mizukami, Y., and Sablowski, R.** (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev* **18**, 375-380.
- Geier, F., Lohmann, J.U., Gerstung, M., Maier, A.T., Timmer, J., and Fleck, C.** (2008). A quantitative and dynamic model for plant stem cell regulation. *PLoS One* **3**, e3553.
- Geldner, N., Hyman, D.L., Wang, X., Schumacher, K., and Chory, J.** (2007). Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* **21**, 1598-1602.
- Goldshmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., and Eshed, Y.** (2008). Signals derived from YABBY gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. *Plant Cell* **20**, 1217-1230.
- Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C., and Meyerowitz, E.M.** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16529-16534.
- Gordon, S.P., Heisler, M.G., Reddy, G.V., Ohno, C., Das, P., and Meyerowitz, E.M.** (2007). Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* **134**, 3539-3548.
- Gou, X., He, K., Yang, H., Yuan, T., Lin, H., Clouse, S.D., and Li, J.** (2010). Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **11**, 19.
- Guilfoyle, T.J., and Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 453-460.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y.** (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H.** (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15208-15213.
- Hobe, M., Muller, R., Grunewald, M., Brand, U., and Simon, R.** (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Dev Genes Evol* **213**, 371-381.
- Hwang, I., and Robinson, D.G.** (2009). Transport vesicle formation in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 660-669.
- Itin, C., Kappeler, F., Linstedt, A.D., and Hauri, H.P.** (1995). A novel endocytosis signal related to the KKXX ER-retrieval signal. *EMBO J* **14**, 2250-2256.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., and Fukuda, H.** (2006). Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**, 842-845.
- Iyer-Pascuzzi, A.S., and Benfey, P.N.** (2009). Transcriptional networks in root cell fate specification. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 315-325.
- Izhaki, A., and Bowman, J.L.** (2007). KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 495-508.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P., and Tsiantis, M.** (2005). KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* **15**, 1560-1565.
- Jeong, S., and Clark, S.E.** (2005). Photoperiod regulates flower meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **169**, 907-915.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E.** (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1934.

- Jin, H., Yan, Z., Nam, K.H., and Li, J. (2007). Allele-specific suppression of a defective brassinosteroid receptor reveals a physiological role of UGGT in ER quality control. *Mol Cell* **26**, 821-830.
- Karpova, T.S., Baumann, C.T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G.L., and McNally, J.G. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc* **209**, 56-70.
- Kayes, J.M., and Clark, S.E. (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* **125**, 3843-3851.
- Kim, J., Jung, J.H., Reyes, J.L., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Chung, K.S., Kim, J.A., Lee, M., Lee, Y., Narry Kim, V., Chua, N.H., and Park, C.M. (2005). microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J* **42**, 84-94.
- Kinoshita, A., Nakamura, Y., Sasaki, E., Kyojuka, J., Fukuda, H., and Sawa, S. (2007). Gain-of-function phenotypes of chemically synthetic CLAVATA3/ESR-related (CLE) peptides in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *Plant Cell Physiol* **48**, 1821-1825.
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 343-349.
- Koncz, C.a.S., Jeff (1986). The promoter of T<sub>1</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, 383 - 396.
- Koornneef, M., van Eden, J., Hanhart, C.J., Stam, P., Braaksma, F.J., and Feenstra, W.J. (1983). Linkage map of Arabidopsis thaliana. *J Hered* **74**, 265-272.
- Kudryavtsev, V., Felekyan, S., Wozniak, A.K., Konig, M., Sandhagen, C., Kuhnemuth, R., Seidel, C.A., and Oesterheld, F. (2007). Monitoring dynamic systems with multiparameter fluorescence imaging. *Anal Bioanal Chem* **387**, 71-82.
- Kumaran, M.K., Bowman, J.L., and Sundaresan, V. (2002). YABBY polarity genes mediate the repression of KNOX homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 2761-2770.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., and Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kieu, K., and Traas, J. (1998b). Cellular parameters of the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1375-1390.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.
- Leibfried, A., To, J.P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., and Lohmann, J.U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.
- Lindsay, D.L., Sawhney, V.K., and Bonham-Smith, P.C. (2006). Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development in Arabidopsis. *Plant Science* **170**, 1111-1117.
- Liu, Q., Yao, X., Pi, L., Wang, H., Cui, X., and Huang, H. (2008). The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and leaf polarity establishment by repressing miR165/166 in Arabidopsis. *Plant J*.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-69.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., Sedbrook, J., Tasaka, M., Masson, P., and Barton, M.K. (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* **126**, 469-481.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J* **23**, 3356-3364.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* **132**, 291-298.
- Meng, L., Ruth, K.C., Fletcher, J.C., and Feldman, L. (2010). The Roles of Different CLE Domains in Arabidopsis CLE Polypeptide Activity and Functional Specificity. *Mol Plant*.
- Mikosch, M., and Homann, U. (2009). How do ER export motifs work on ion channel trafficking? *Curr Opin Plant Biol* **12**, 685-689.
- Mizuno, S., Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **50**, 751-766.
- Moussian, B., Haecker, A., and Laux, T. (2003). ZWILLE buffers meristem stability in Arabidopsis thaliana. *Dev Genes Evol* **213**, 534-540.
- Muller, B., and Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science* **318**, 68-69.

- Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R. (2008). The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* **20**, 934-946.
- Müller, R., Borghi, L., Kwiatkowska, D., Laufs, P., and Simon, R. (2006). Dynamic and compensatory responses of Arabidopsis shoot and floral meristems to CLV3 signaling. *Plant Cell* **18**, 1188-1198.
- Nadeau, J.A., and Sack, F.D. (2002). Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science* **296**, 1697-1700.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenfuhr, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for colocalization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* **51**, 1126-1136.
- Nodine, M.D., and Tax, F.E. (2008). Two receptor-like kinases required together for the establishment of Arabidopsis cotyledon primordia. *Dev Biol* **314**, 161-170.
- Nodine, M.D., Yadegari, R., and Tax, F.E. (2007). RPK1 and TOAD2 are two receptor-like kinases redundantly required for Arabidopsis embryonic pattern formation. *Dev Cell* **12**, 943-956.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., and Matsubayashi, Y. (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294.
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M., and Matsubayashi, Y. (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. *Nat Chem Biol* **5**, 578-580.
- Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prezeau, L., Blahos, J., Pin, J., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K., and Bettler, B. (2001). C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* **21**, 1189-1202.
- Pattison, R.J., and Amtmann, A. (2009). N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. *Trends Plant Sci* **14**, 92-99.
- Pelham, H.R. (1995). Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 530-535.
- Piedras, P., Rivas, S., Droge, S., Hillmer, S., and Jones, J.D. (2000). Functional, c-myc-tagged Cf-9 resistance gene products are plasma-membrane localized and glycosylated. *Plant J* **21**, 529-536.
- Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2005). Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. *Plant Cell* **17**, 61-76.
- Rèdei, J.P. (1992). A note on Columbia wild type and Landsberg *erecta*. In *Methods in Arabidopsis Research*, C. Koncz, N.H. Chua and J. Schell. (Singapore: World Scientific).
- Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development* **130**, 4073-4083.
- Rinne, P.L., and van der Schoot, C. (1998). Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* **125**, 1477-1485.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**, 445-449.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**, 537-542.
- Ruzicka, K., Simaskova, M., Duclercq, J., Petrasek, J., Zazimalova, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M.C., and Benkova, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4284-4289.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811-814.
- Schaffer, J., Volkmer, A., Eggeling, C., Subramaniam, V., Striker, G., and Seidel, C.A.M. (1998). Identification of Single Molecules in Aqueous Solution by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy. *The Journal of Physical Chemistry A* **103**, 331-336.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Sessions, A., Nemhauser, J.L., McColl, A., Roe, J.L., Feldmann, K.A., and Zambryski, P.C. (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**, 4481-4491.
- Seward, H.E., and Bagshaw, C.R. (2009). The photochemistry of fluorescent proteins: implications for their biological applications. *Chem Soc Rev* **38**, 2842-2851.

- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y.** (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572.
- Sharma, V.K., Ramirez, J., and Fletcher, J.C.** (2003). The Arabidopsis CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. *Plant Mol Biol* **51**, 415-425.
- Shiu, S.H., and Bleeker, A.B.** (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10763-10768.
- Sieburth, L.E., and Meyerowitz, E.M.** (1997). Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-365.
- Skoog, F., and Miller, C.O.** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **54**, 118-130.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Song, S.K., and Clark, S.E.** (2005). POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in Arabidopsis. *Dev Biol* **285**, 272-284.
- Song, S.K., Lee, M.M., and Clark, S.E.** (2006). POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells. *Development* **133**, 4691-4698.
- Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R.** (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Curr Biol* **19**, 909-914.
- Steeves, T.A., and Sussex, I.M.** (1989). Pattern in plant development. (Cambridge University Press).
- Stone, J.M., Trotochaud, A.E., Walker, J.C., and Clark, S.E.** (1998). Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol* **117**, 1217-1225.
- Stornaiuolo, M., Lotti, L.V., Borgese, N., Torrisi, M.R., Mottola, G., Martire, G., and Bonatti, S.** (2003). KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Mol Biol Cell* **14**, 889-902.
- Swedlow, J., Goldman, R., and Spector, D.** (2009). Live Cell Imaging: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-645.
- Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Comomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R., Young, K., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Comai, L., and Henikoff, S.** (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res* **13**, 524-530.
- Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R.F., and Komeda, Y.** (1996). The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**, 735-746.
- Townsley, F.M., and Pelham, H.R.** (1994). The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur J Cell Biol* **64**, 211-216.
- Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z., and Clark, S.E.** (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-406.
- Tucker, M.R., Hinze, A., Tucker, E.J., Takada, S., Jurgens, G., and Laux, T.** (2008). Vascular signalling mediated by ZWILLE potentiates WUSCHEL function during shoot meristem stem cell development in the Arabidopsis embryo. *Development* **135**, 2839-2843.
- Vanneste, S., and Friml, J.** (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**, 1005-1016.
- Vernoux, T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Laufs, P., and Traas, J.** (2000). PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* **127**, 5157-5165.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Wang, G., Long, Y., Thomma, B.P., de Wit, P.J., Angenent, G.C., and Fiers, M.** (2010). Functional analyses of the CLAVATA2-like proteins and their domains that contribute to CLAVATA2 specificity. *Plant Physiol* **152**, 320-331.
- Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J.W., Forsyth, A., Mitchell, K., Bastas, K., Liu, C.M., Woods-Tor, A., Zipfel, C., de Wit, P.J., Jones, J.D., Tor, M., and Thomma, B.P.** (2008). A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **147**, 503-517.
- Wang, Z.Y., Wang, Q., Chong, K., Wang, F., Wang, L., Bai, M., and Jia, C.** (2006). The brassinosteroid signal transduction pathway. *Cell Res* **16**, 427-434.

- 
- Weidtkamp-Peters, S., Felekyan, S., Bleckmann, A., Simon, R., Becker, W., Kuhnemuth, R., and Seidel, C.A.** (2009). Multiparameter fluorescence image spectroscopy to study molecular interactions. *Photochem Photobiol Sci* **8**, 470-480.
- Williams, L., Grigg, S.P., Xie, M., Christensen, S., and Fletcher, J.C.** (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development* **132**, 3657-3668.
- Williams, R.W., Wilson, J.M., and Meyerowitz, E.M.** (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10467-10472.
- Wu, X., Dabi, T., and Weigel, D.** (2005). Requirement of homeobox gene STIMPY/WOX9 for Arabidopsis meristem growth and maintenance. *Curr Biol* **15**, 436-440.
- Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G.V.** (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4941-4946.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A., and Ori, N.** (2005). Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* **15**, 1566-1571.
- Yu, L.P., Miller, A.K., and Clark, S.E.** (2003). POLTERGEIST encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at Arabidopsis shoot and flower meristems. *Curr Biol* **13**, 179-188.
- Yu, L.P., Simon, E.J., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E.** (2000). POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the CLAVATA loci. *Development* **127**, 1661-1670.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., and Jan, L.Y.** (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**, 537-548.
- Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H.** (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**, 265-273.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FLIM	'Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy'
Abb.	Abbildung		
AM	Apikal Meristem	FP	Fluoreszenz Protein
APB	Fotozerstörung des Akzeptors „Akzeptor Photobleach“	FRAP	'Fluorescence Recovery after Photobleaching'
AS	Aminosäure	FRET	Fluoreszenz-Resonance-Energie-Transfer
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>		
ATP	Adenosintriphosphat	Gent	Gentamycin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
bp	Basenpaar	h	Stunde
BSA	Rinderserumalbumin	HRP	Meerrettich Peroxidase
CAPS	„Cleaved Amplified Polymorphic Sequence“	IM	Infiltrationsmedium
cDNA	komplementäre DNA	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
CDS	kodierende Sequenz	Kan	Kanamycin
Col	Columbia (Ökotyp von <i>A. thaliana</i> )	kb	Kilobasenpaare
Da	Dalton	kDa	Kilo Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat	L	Liter
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser	LB	Luria Bertoni
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i> (Ökotyp von <i>A. thaliana</i> )
DNA	Desoxiribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)	M	Molar
dsDNA	doppelsträngige DNA	mA	Milliampere
dNTP	Desoxyribonukleoside 5'-triphosphate	mg	Milligramm
DTT	Dithiothreitol	min	Minute
DYT	doppeltes Hefe Trypton (Medium)	ml	Milliliter
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	mM	Millimolar
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure	mRNA	Boten-RNA
FCCS	'Fluorescence cross correlation Spectroscopy'	MW	Molekulargewicht
FCS	'Fluorescence correlation Spectroscopy'	NA	Numerische Apparatur
		NBT	Nitrobluetetrazolium
		ng	Nanogramm
		nm	Nanometer
		nmol	Nanomolar
		OC	Organisierendes Zentrum
		OD <sub>x nm</sub>	Optische Dichte (bei einer Wellenlänge von x nm)

---

PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
pg	Picogramm
pI	Isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
px	Pixel
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raum Temperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAM	Sproßapikalmeristem
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
SnI	Stunden nach Induktion
$\tau$	tau (Fluoreszenzlebenszeit)
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMEDN, N, N', N'-Tetramethyl-	ethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TnK	Tage nach Keimung
Tris	2-Amino-2-hydroxy- methylpropan-1,3-diol
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WAM	Wurzelapikalmeristem
WnK	Wochen nach Keimung
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

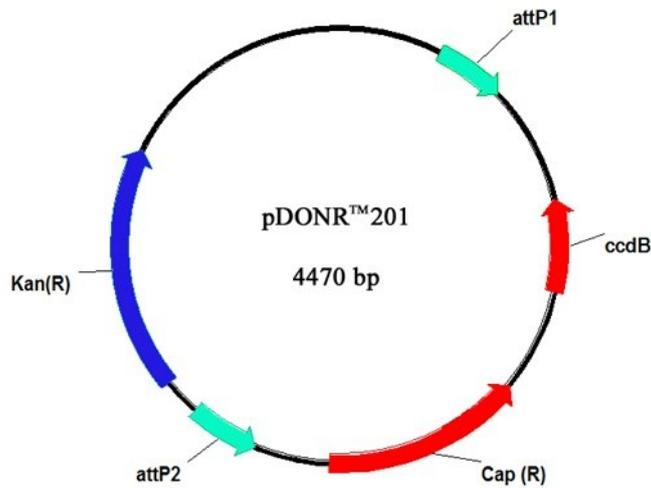
Abb. 1 Aufbau und Regulation des Sprossapikalmeristems.	- 3 -
Abb. 2 Aufbau des Wurzelapikalmeristems (WAMs)	- 12 -
Abb. 3 Vereinfachtes Jablonski-Diagramm	- 34 -
Abb. 4 Absorption und Emissionsspektren des FRET-Paars GFP/mCherry	- 35 -
Abb. 5 FRET-Quantifizierung in einem APB-Experiment	- 36 -
Abb. 6 Karpellanzahl von <i>clv/crn</i> -Allelen im Ökotyp <i>Ler</i> .	- 42 -
Abb. 7 Analyse von <i>clv/crn</i> -Allelen im Col-Hintergrund.	- 45 -
Abb. 8 Phänotypische Analyse von <i>rpk2/clv</i> - bzw. <i>rpk2/crn</i> - Doppelmutanten.	- 48 -
Abb. 9 Expressionsanalyse von <i>CRN</i>	- 50 -
Abb. 10 Expressionsanalyse von <i>CLV2</i>	- 51 -
Abb. 11 Expressionsanalyse von <i>BAM1</i> .	- 52 -
Abb. 12 Komplementation von <i>clv/crn</i> -Mutanten mittels Rezeptor-FP-Fusionsproteinen.	- 55 -
Abb. 13 Lokalisation von <i>CLV1</i> -GFP, <i>CLV2</i> -GFP und <i>CRN</i> -GFP in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	- 57 -
Abb. 14 Vergleich der Lokalisation von Rezeptor-GFP-Fusionsproteinen unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors.	- 59 -
Abb. 15 Zelluläre Lokalisationsstudie von <i>CLV1</i> , <i>CLV2</i> und <i>CRN</i> .	- 62 -
Abb. 16 PM Lokalisationsabhängigkeit von <i>CRN</i> und <i>CLV2</i> ist nicht $\beta$ -Estradiol-induziert.	- 62 -
Abb. 17 Der Mechanismus der PM-Translokation von <i>CRN</i> und <i>CLV2</i> wird beeinflusst durch die TMD und der EZD von <i>CRN</i> .	- 65 -
Abb. 18 <i>CRN</i> -Lokalisationsabhängigkeit von <i>CLV2</i> -Proteindomänen	- 66 -
Abb. 19 <i>CLV1</i> und <i>CRN</i> bilden Homomere.	- 68 -
Abb. 20 Die Interaktion zwischen <i>CRN</i> und <i>CLV2</i> wird über die TMD vermittelt.	- 70 -
Abb. 21 Der heteromere <i>CRN/CLV2</i> -Rezeptorkomplex interagiert mit <i>CLV1</i> .	- 72 -
Abb. 22 Lokalisations- und Interaktionsstudie von <i>CLV2</i> -Homologen mit <i>CRN</i> .	- 74 -
Abb. 23 Lokalisations- und Interaktionsstudie potentieller Interaktionspartner.	- 76 -
Abb. 24 Proteininteraktionsstudie durch FLIM.	- 79 -
Abb. 25 Verkürzte Lebenszeit von <i>CLV1</i> -GFP-mCherry in Vesikeln.	- 80 -
Abb. 26 Modell des <i>CLV</i> -Signalwegs im SAM, basierend auf Proteininteraktionsstudien.	- 90 -
Abb. 27 Vektorkarten der verwendeten Eingangsvektoren.	- 110 -
Abb. 28 Vektorkarten der verwendeten Zielvektoren.	- 111 -
Abb. 29 Vektorkarten der in dieser Arbeit hergestellten Zielvektoren.	- 112 -

### 7.3 Tabellenverzeichnis

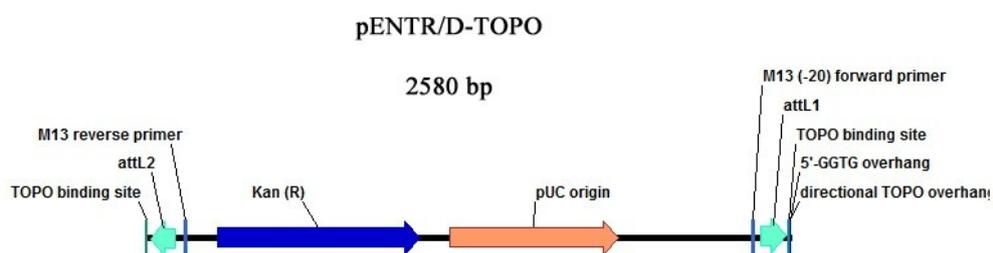
Tab. 1 Auflistung der molekularen Größenstandards.	- 18 -
Tab. 2 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung von CRN und dessen Derivaten.	- 18 -
Tab. 3 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung von CLV2 und dessen Derivaten.	- 19 -
Tab. 4 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung von CLV1 und dessen Derivaten.	- 19 -
Tab. 5 Liste der Oligonukleotide zur Klonierung potentieller Interaktionspartner und deren Derivaten.	- 19 -
Tab. 6 Oligonukleotide zur Klonierung neuer Destination Vektoren.	- 20 -
Tab. 7 Liste der Oligonukleotide, die für Sequenzierungen verwendet wurden.	- 20 -
Tab. 8 Liste der Oligonukleotide, die zur Genotypisierung von Pflanzenlinien verwendet wurden	- 21 -
Tab. 9 Methode zur Genotypisierung von Pflanzenlinien.	- 21 -
Tab. 10 Liste von Ausgangsvektoren.	- 22 -
Tab. 11 Genotyp der verwendeten Bakterienstämme.	- 22 -
Tab. 12 Liste der in dieser Arbeit verwendeten mutanten Pflanzenlinien.	- 23 -
Tab. 13 Liste der in dieser Arbeit hergestellten transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linien.	- 24 -
Tab. 14 Gen-Annotationsliste	- 24 -
Tab. 15 Liste von CRN Eingangsvektoren.	- 29 -
Tab. 16 Liste Eingangsvektoren die CLV1 und dessen Derivate oder CLV2 und des Derivate enthalten.	- 30 -
Tab. 17 Liste zusätzlicher Eingangvektoren.	- 30 -
Tab. 18 Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung der induzierbaren Expressionsvektoren von CRN, CLV2 und CLV1 Derivaten.	- 31 -
Tab. 19 Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung von weiteren induzierbaren Expressionsvektoren.	- 32 -
Tab. 20 Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung konstitutiver Expressionsvektoren.	- 32 -
Tab. 21 Liste der Gateway®-Rekombinationen zur Erzeugung der Vektoren für die Proteinexpressions- und Proteinlokalisationsanalyse.	- 32 -
Tab. 22 Exzitations- und Emissionseinstellungen für die konfokale Mikroskopie	- 33 -

## 7.4 Plasmidkarten

A

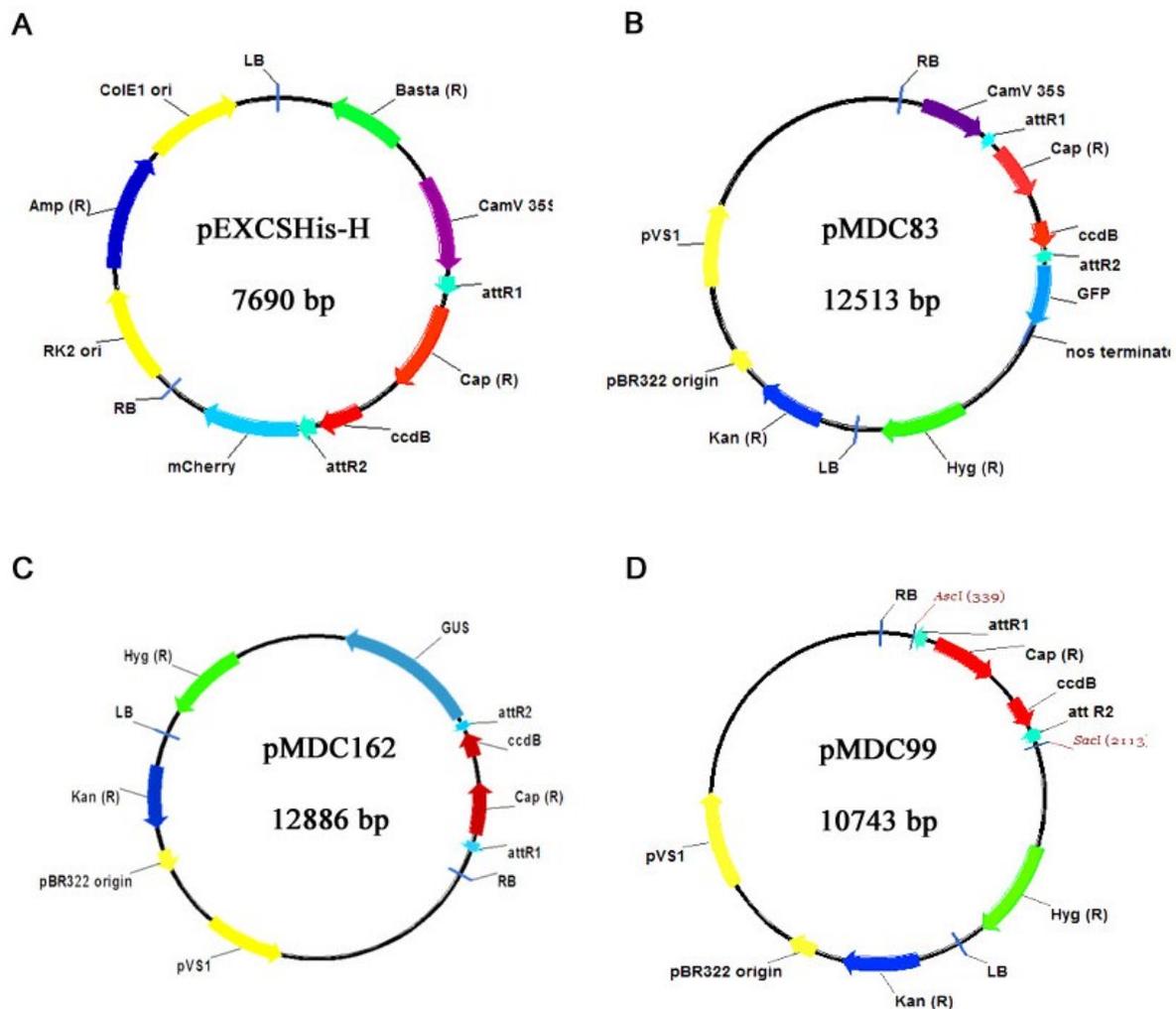


B



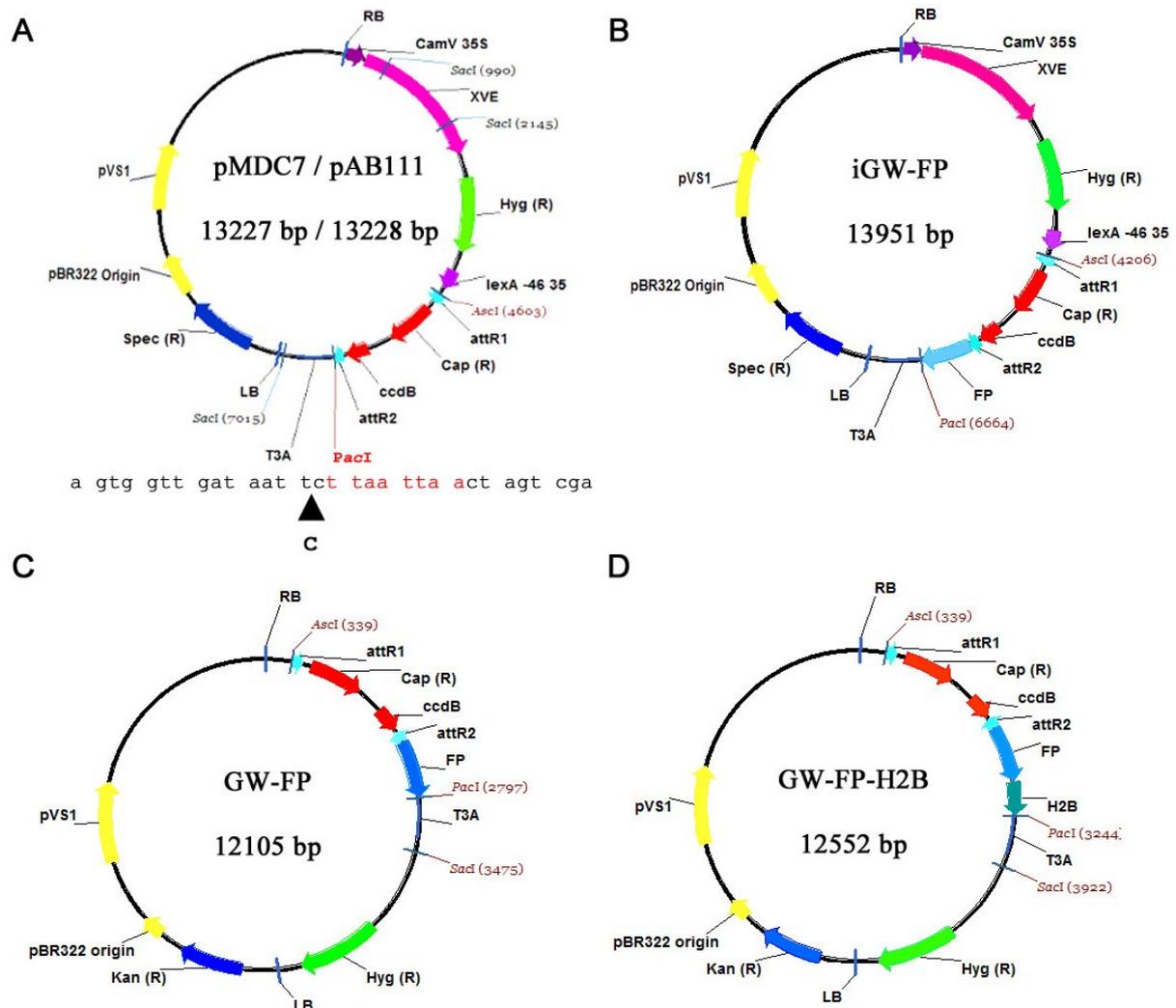
**Abb. 27** Vektorkarten der verwendeten Eingangsvektoren.

Türkisfarbene Pfeile kennzeichnen die Rekombinationsstellen für eine Gateway-Reaktion. Blaue Pfeile kennzeichnen die CDS des Selektionsmarkers, für die DNA-Amplifikation in *E. coli*. Rote Pfeile kennzeichnen die CDS (Cap(R) und ccdB) in der Gatewaykassette. ccdB: CDS eines Toxins, das die DNA-Amplifikation in den meisten *E. coli*-Stämmen blockiert. Cap (R): CDS der *Chloramphenicolacetyltransferase* (*cat*), vermittelt Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Kan (R) CDS der *Aminoglycosidephosphotransferase* (*nptII*), vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin.



**Abb. 28 Vektorkarten der verwendeten Zielvektoren.**

(A-D) Vektorkarten von verwendetet Zielvektoren. Blaue Pfeile kennzeichnen die CDS des Selektionsmarkers, für die DNA-Amplifikation in *E. coli*. Rote Pfeile kennzeichnen die CDS (Cap(R) und ccdB) in der Gatewaykassette. Grüne Pfeile kennzeichnen die CDS des Selektionsmarker zur Isolation transgener Pflanzen. Gelbe Pfeile kennzeichnen die Origins für die DNA-Amplifikation in *E. coli* (pVs1) und in *A. tumefaciens* (pBR322oder RK2). Die Linke- und Rechte-T-DNA-Rekombinationssequenzen (LB und RB) sind eingezeichnet. ccdB: CDS eines Toxins, das die DNA-Amplifikation in den meisten *E. coli*-Stämmen blockiert. Cap (R): CDS der *Chloramphenicolacetyltransferase* (*cat*), vermittelt Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Kan (R) CDS der *Aminoglycosidephosphotransferase* (*nptII*), vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin. Hyg (R) CDS der *Hygromycinphosphotransferase* (*hpt*), vermittelt Resistenz gegenüber Hygromycin B. BASTA (R) CDS der Phosphinothricinacetyltransferase (*pat*), vermittelt Resistenz gegenüber Glufosinate (BASTA®). Amp (R) CDS der  $\beta$ -Lactamase (*bla*), vermittelt Resistenz gegenüber Aminopenicillin.



**Abb. 29** Vektorkarten der in dieser Arbeit hergestellten Zielvektoren.

(A-D) Vektorkarten der in dieser Arbeit erzeugten Zielvektoren. (A) Zur Erzeugung eines offenen Leserasters der Kassette B für C-terminale Proteinfusionen wurde vor die unikale *PacI*-Restriktionsstelle ein C eingefügt. Türkisfarbene Pfeile kennzeichnen die Rekombinationsstellen für eine Gateway-Reaktion. (B)  $\beta$ -Estradiol induzierbare Expression von C-Terminal markierten Fusionsproteinen. (pAB114, pAB116; pAB117; pAB118; pAB119) (C) Plasmid zur Expression von Genen-FP-Fusionsproteinen unter der Kontrolle des endogenen Promoters (pAB130; pAB131; pAB132; pAB133). (D) Plasmid zur Analyse von gewebsspezifischer Promoteraktivität durch Expression eines FP-H2B-Fusionsproteins (pAB146; pAB147; pAB149). Türkisfarbene Pfeile kennzeichnen die Rekombinationsstellen für eine Gateway-Reaktion. Blaue Pfeile kennzeichnen die CDS des Selektionsmarkers, für die DNA-Amplifikation in *E. coli*. Rote Pfeile kennzeichnen die CDS (Cap(R) und *ccdB*) in der Gatewaykassette. Grüne Pfeile kennzeichnen die CDS des Selektionsmarker zur Isolation transgener Pflanzen. Gelbe Pfeile kennzeichnen die Origins für die DNA-Amplifikation in *E. coli* (pVS1) und in *A. tumefaciens* (pBR322 oder RK2). Die Linke- und Rechte-T-DNA-Rekombinationssequenzen (LB und RB) sind eingezeichnet. *ccdB*: CDS eines Toxins, das die DNA-Amplifikation in den meisten *E. coli*-Stämmen blockiert. Cap (R): CDS der *Chloramphenicolacetyltransferase* (*cat*), vermittelt Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Kan (R) CDS der *Aminoglycosidephosphotransferase* (*nptII*), vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin. Hyg (R) CDS der *Hygromycinphosphotransferase* (*hpt*), vermittelt Resistenz gegenüber Hygromycin B. Spe (R) CDS der *Aminoglycosideresistenzprotein* (*aadA*), vermittelt Resistenz gegenüber Spectinomycin.

---

## Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation  
mit dem Titel:

**„Untersuchungen zur Stammzellregulation im Sprossapikalmeristem  
von *Arabidopsis thaliana*“**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich diese Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren kein gescheitertes Promotionsverfahren vorausgegangen ist.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

## **Danksagung**

Es ist vollbracht. Nach den Jahren des bangens habe ich die Dissertation geschrieben. Während dieser Zeit musste ich viele Tiefen durchstehen und konnte mich über einige Höhepunkte freuen. Um dies zu meistern waren meine Arbeitskollegen, meine Eltern und meine Freunde an meiner Seite. Ich möchte nun die Gelegenheit ergreifen ihnen meinen Dank auszusprechen.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rüdiger Simon bedanken, der es mir ermöglicht hat an diesem Projekt zu arbeiten. Danke für die andauernde Unterstützung sei es durch Ratschläge oder durch Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Georg Groth möchte ich für die Kobetreuung meiner Arbeit bedanken sowie für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank, da ohne sie ein Studium und eine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären. Danke dass ich mich in jeder Lebenslage auf euch verlassen kann.

Meinen Arbeitskollegen gilt ebenfalls ein großer Dank, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor. Ihr alle habt es ermöglicht eine Gemeinschaft zu bilden, in der ich mich immer sehr wohl gefühlt habe.

Liebe Madlen und liebe Nicole wir habe zusammen unsere Doktorarbeit begonnen und ich könnte nicht glücklicher sein solche Arbeitskollegen und auch Freunde in euch gefunden zu haben. Ich konnte mich immer auf die gegenseitige Unterstützung verlassen, wodurch die Arbeit leichter wurde. Vielen Dank dafür.

Liebe Yvonne als deine Diplomandin habe ich angefangen und auch in meiner Zeit als Doktorandin standes du mir mit Rat und Tat zur Seite, dafür möchte ich mich bei dir bedanken.

Auch den jüngern Mitglieder der Arbeitsgruppe gilt mein Dank. Lieber Helge, lieber Marc und lieber René ihr habt die Arbeitsgruppe bereichert und ich möchte mich für eure Freundschaft und Hilfsbereitschaft bedanken.

Liebe Cornelia, Carin und Silke eure stetige Unterstützung im Labor ist unersetzbar. Vielen Dank, dass ihr mir bei meiner Arbeit immer geholfen habt.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schubert insbesondere Daniel, Mareike, Marcel und Nora möchte ich mich ebenfalls bedanken, für ihre ständige Hilfe und Unterstützung.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Dr. Stefanie Weitkamp-Peters und Prof. Dr. Claus Seidel vom Institut für Physikalische Chemie II für ihre Unterstützung aussprechen.