Zur Rolle der Signaltransduktion

in der meristematischen Entwicklung

von Arabidopsis thaliana

Inaugural-Dissertation

zur

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

> vorgelegt von Ralf Müller aus Remscheid

> > Mai 2007

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. SimonKoreferent:Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2007

Meiner Großmutter

Hedwig Fasel

Inhaltsverzeichnis

1. E	inleitung	.5
1.1	Organisation und Funktion des Spross- und Wurzelapikalmeristems	5
1.2	WUSCHEL und die CLAVATA-Gene	7
1.2.1	WUSCHEL	7
1.2.2	Komponenten des CLAVATA-Signalweges	8
1.2.3	WUS und die CLV-Gene sind Komponenten eines Regelkreises, der das Stammzellschicksal	
	reguliert	. 10
1.2.4	Weitere Komponenten des CLV-Signalweges	. 12
1.2.5	Die Karpellenanzahl ist ein Indikator für die Größe der Stammzellpopulation in den Blüten.	. 13
1.2.6	Die Tageslänge modifiziert den <i>clv</i> -Phänotyp	. 13
1.2.7	Die Rolle des CLV-Signalweges in der Entwicklung lateraler Organe	. 14
1.2.8	CLV3-verwandte Gene	. 14
1.2.9	ERECTA und CLV1-verwandte LRR-Rezeptorkinasen	. 15
1.2.10	WUS-Homologe	. 16
1.3	Weitere Regulatoren der Meristementwicklung	16
1.3.1	SHOOT MERISTEMLESS	. 16
1.3.2	CUP SHAPED COTYLEDON	. 17
1.3.3	DORNRÖSCHEN und DRN-LIKE	. 17
1.3.4	CURLY LEAF	. 19
1.4	Der Jasmonsäure-Signalweg	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2. N	Iaterial und Methoden 2	21
2.1	Verwendete Materialien	21
2.1.1	Chemikalien	. 21
2.1.2	Enzyme	. 21
2.1.3	Verwendete Puffer und Medien	. 21
2.1.4	Bakterienstämme	. 21
2.1.5	Vektoren	. 22

2.1	1.6 Oligonukleotide	
2.1	1.7 Verwendete Pflanzenlinien	
2.1	1.8 Programme zur elektronischen Datenverarbeitung	
2.2	Genetische Methoden	
2.2	2.1 Pflanzenanzucht	
2.2	2.2 In planta-Transformation von Arabidopsis thaliana	
2.2	2.3 Kreuzung von Arabidopsis thaliana	
2.3	Molekularbiologische Methoden	
2.3	3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	
2	2.3.1.1 Präparation von Plasmid DNA	
2	2.3.1.2 Präparation genomischer DNA	
2	2.3.1.3 Präparation von Gesamt-RNA	
2	2.3.1.4 cDNA-Synthese	
2	2.3.1.5 Gelelution von DNA-Fragmenten	
2.3	3.2 Molekularbiologische Standardmethoden	
2.3	3.3 Quantitative <i>real time</i> -RT-PCR	
2.3	3.4 <i>Affymetrix</i> -Genchip-Hybridisierung	
2.3	8.5 Konstruktion und Herstellung der verschiedenen Plasmide	
2.4	Zytologische und Histologische Techniken	
2.4	4.1 Präparation von Keimlingen für die Mikroskopie	
2.4	4.2 Nicht-radioaktive-RNA- <i>in situ</i> Hybridisierung	
2.4	4.3 <i>In situ</i> -β-Glukuronidase Färbereaktionen (GUS-Färbung)	
2.5	Mikroskopische Techniken	
2.5	5.1 Nomarsky-Mikroskopie	
2.5	5.2 Konfokale-Mikroskopie	
2.5	5.3 Rasterelektronen-Mikroskopie	
3.	Ergebnisse	

3.1	Die Rolle von DORNRÖSCHEN in der Meristementwicklung	33
3.1.1	Konsequenzen der induzierten DRN-Expression für das Pflanzenwachstum	33
3.1.2	Konsequenzen der Missexpression von DRN für die CLV3-Expression	37
3.1.3	DRN aktiviert die Expression von CUC- und einigen ERF-Transkriptionsfaktoren, aber	
	inhibiert die Synthese des Phytohormons Jasmonsäure	39

3.2	Konsequenzen der Erhöhung der CLV3-Expression während der Entwicklung	15			
3.2.1	3.2.1 Zusammenfassung der in Müller et al. (2006) veröffentlichten Ergebnisse				
	Dynamic and Compensatory Responses of Arabidopsis Shoot and Floral Meristems to CLV3				
	Signaling (Müller et al., 2006)	48			
3.2.2	Die Suche nach direkten und indirekten Zielgenen des CLV3-Signalweges	59			
3.3	Isolierung von Suppressormutanten der CLV3-Überexpression in Arabidosis				
	thaliana	51			
3.3.1	Durchführung der Suppressormutagenese	61			
3.3.2	Neue <i>clv1-</i> und <i>clv2-</i> Allele	63			
3.3.3	CORYNE, ein neue Komponente des CLV3-Signalweges	65			
3.3	.3.1 <i>crn</i> -Mutanten supprimieren die <i>CLV3</i> -Überexpression	65			
3.3	.3.2 <i>crn</i> -Mutanten haben vergrößerte Spross- und Blütenmeristeme	68			
3.3	.3.3 Der Phänotyp von <i>crn</i> -Mutanten wird von der Umwelt beeinflusst	71			
3.3	.3.4 <i>crn</i> -Mutanten zeigen Defekte in der Organentwicklung	78			
3.3	.3.5 <i>CLV3-</i> und <i>WUS-</i> Expression in <i>crn</i>	80			
3.3	.3.6 Wurzelphänotyp von <i>crn</i>	82			
3.3	.3.7 Kartierung und Klonierung von <i>CRN</i>	84			
3.3	.3.8 Komplementation von <i>crn</i> -Mutanten und Überexpression von <i>CRN</i>	87			
3.3	.3.9 Expressionsmuster von <i>CRN</i>	90			
3.3	.3.10 <i>crn/clv</i> -Doppelmutanten: Die Einordnung <i>CRN</i> s in den <i>CLV</i> -Signalweg	93			
3.3	.3.11 <i>crn/krf</i> -Doppelmutanten und <i>crn/krf/clv</i> -Dreifachmutanten	97			
3.3	.3.12 <i>crn/wus-</i> und <i>crn/pol-</i> Doppelmutanten und <i>crn</i> im LER+-Hintergrund1	01			
3.3.4	Eine weitere Suppressormutante, <i>curly leaf</i> 1	03			
4. Г)iskussion	6			
. L		v			
4.1	Die Rolle DRNs in der Organisation des Sprossmeristems10)6			
4.2	Die Kompensation von Störungen in der wechselseitigen Regulation von CLV3				
	und WUS	10			
4.3	Suppressormutanten der CLV3-Überexpression11	3			
4.3.1	CRN kontrolliert über die Repression von WUS das Stammzellschicksal 1	13			
4.3.2	CRN könnte mit CLV2 eine heterodimere LRR-Rezeptorkinase bilden 1	14			
4.3.3	Genetische Interaktionen von <i>crn</i> : Einordnung in den <i>CLV3</i> -Signalweg	15			
4.3.4	4 <i>krf</i> als Enhancer des <i>crn</i> -Phänotyps 110				
4.3.5	CLF, ein clv-unabhängiger Suppressor der CLV3-Überexpression?	18			

5.	Zusammenfassungen119
5.1	Zusammenfassung119
5.2	Summary
6.	Literatur
7.	Anhang128
7.1	Abkürzungsverzeichnis128
7.2	Anlagen zu 3.2: Konsequenzen der CLV3-Induktion für die Expression von DRN
7.3	Anlagen zu 3.3: Suppessormutagenese der CLV3-Überexpression
7.3	3.1 Suppressormutanten mit keulenförmigen Schoten 129
7.3	3.2 Genomische Sequenz von CRN (At5g13290, Col)
7.3	B.3 Stärke der CRN-Expression in den 35S::CRN-Pflanzen
7.3	8.4 Ergänzung zur statistischen Auswertung der <i>crn/clv</i> -Doppelmutanten
Er	klärung133
Da	nksagung134

1. Einleitung

1.1 Organisation und Funktion des Spross- und Wurzelapikalmeristems

Die Entwicklung der höheren Pflanzen unterscheidet sich grundlegend von der mehrzelliger Tiere. Während bei Tieren bereits in der Embryogenese der Grundbauplan festgelegt wird, dient die Embryogenese bei Pflanzen vorwiegend der Anlage der beiden apikalen Meristeme, dem Spross-(SAM) und dem Wurzelapikalmeristem (WAM), die beide ein Reservoir von pluripotenten Stammzellen beinhalten. Alle adulten Strukturen der Pflanze entstehen aus diesen embryonal angelegten Meristemen und deren Derivaten.

Die Wurzel besteht aus konzentrisch angeordneten senkrechten Zellreihen. Jede dieser Zellreihen hat ihren klonalen Ursprung in einer spezifischen Initiale, wie die Stammzellen des WAM bezeichnet werden. Die sich asymmetrisch teilenden Initialen stehen im direkten Kontakt zu dem ruhenden Zentrum (QC = quiescent centre), in dem keine Zellteilung stattfindet. Nach der ersten antiklinen Teilung der Initialen behält die Tochterzelle mit Kontakt zum QC ihre Identität, aus der anderen geht durch weitere antikline Teilungen eine senkrechte Zellreihe hervor oder es kommt nach der ersten antiklinen zunächst zur periklinen Zellteilung, so dass von einer Initiale zwei oder mehrere klonale Zellreihen abstammen. Nach dem Kontaktverlust zum QC beginnen sich die Zellen der Zellreihen zu differenzieren. Zunächst kommt es zur Zellstreckung in der Streckungszone. Das erste deutlich sichtbare Differenzierungsmerkmal ist die Ausbildung der Wurzelhaare, die daher auch den Beginn der Differenzierungszone markiert, die sich unmittelbar an die Streckungszone anschließt.

Das stereotypische Zellteilungsmuster in der Wurzel erweckt den Eindruck, dass die Zellidentität einer Zellreihe auf ihrem klonalen Ursprung beruht. Durch Laserablation zerstörte Meristemzellen können jedoch durch ein kurzfristig verändertes Zellteilungsmuster ersetzt werden. Dies erfordert jedoch eine Koordination mittels Zell-Zell-Kommunikation. Ähnliche Experimente zeigen darüber hinaus, dass für den Identitätserhalt der Initialen vermutlich Signale der QC-Zellen erforderlich sind (van den Berg et al. 1997). Somit spielt in der Wurzel die Signaltransduktion zwischen und innerhalb von Zellverbänden eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion des WAMs.

Das SAM besteht aus einem Dom von Zellen, an dessen Flanken die Organprimordien angelegt werden. In den tieferen Zellschichten des SAM liegt die Rippenzone, die das innere Sprossgewebe bildet. Das vegetative SAM produziert zunächst Rosettenblätter. Nach der Blühinduktion bringt das Infloreszenzmeristem eine Reihe von Blütenprimordien hervor, die wiederum ein Blütenmeristem ausbilden. Die *Arabidopsis*-Blüte trägt vier verschiedenen Blütenorgane, die in vier konzentrischen Wirteln angeordnet sind: je vier Sepalen und Petalen, sechs Stamen und zwei fusionierte Karpelle werden von einem Blütenmeristem gebildet. Die Zellen des meristematischen Doms wirken homogen, lassen sich jedoch räumlich und funktional in verschiedene Regionen unterteilen.

Zum einem untergliedert sich das SAM in die äußeren Tunika-Schichten und eine innere Korpus-Schicht (Satina et al., 1940; Satina und Blakeslee, 1941; Tilney-Bassett, 1986). Die Tunika besteht aus zwei klonal distinkten Schichten, L1 und L2, in denen sich die Zellen nur antiklin teilen. Aus den Zellen der L1 geht die Epidermis hervor, wogegen die L2 das subepidermale Gewebe und die Gameten bildet. Aus den Zellen der L3 bzw. dem Korpus entwickelt sich das parenchymatische und vaskuläre Gewebe. Die frühe Anordnung von Zellen in klonal separaten Zellschichten legt einen zelllinienabhängigen Steuerungsmechanismus in der Pflanzenentwicklung nahe. Studien mit genetischen Mosaiken zeigen dagegen, dass das Zellschicksal positionsabhängig ist und nicht auf dem klonalen Ursprung einer Zelle beruht (Poethig, 1989; Irish, 1991).

Eine weitere Unterteilung des SAMs beruht auf der Beobachtung unterschiedlicher Zellteilungsraten. In der zentralen Zone des SAMs, die die Stammzellen enthält, finden Zellteilungen seltener statt als in der sie umgebenden peripheren Zone (Vaughn, 1952; Vaughn, 1955; Steeves und Sussex, 1989). Ausschließlich aus den durch Zellteilung aus der zentralen Zone in die periphere Zone verdrängten Zellen können sich Organprimordien bilden. Da alle drei klonalen Schichten bei der Organbildung und dem Stammwachstum beteiligt sind, ist eine Koordination der Zellteilung und der Festlegung des Zellschicksals während der Entwicklung erforderlich. Koordination erfordert interzelluläre Kommunikation. Einer der Mechanismen basiert auf dem Transfer von Proteinen oder RNA durch Organellen, den Plasmodesmen (Lucas et al., 1995a; Lucas et al., 1995b; Mezitt et al., 1996). Die durch Plasmodesmen verbundenen Zellen der zentralen Zone bilden einen von der peripheren Zone abgegrenzten Symplasten. Zytoplasmatische Verbindungen zwischen Zellen der Zentralen und der peripheren Zone erscheinen nur kurzzeitig während der Initiation von Primordien (Rinne und van der Schoot, 1998; Gisel et al., 1999). Das SAM stellt somit eine hoch organisierte Struktur dar, in welcher Signale innerhalb und zwischen symplastischen Feldern dazu dienen, morphogenetische Ereignisse und den Meristemerhalt zu koordinieren.

Eine weitere Ebene der SAM-Organisation basiert auf den Expressionsmustern der Gene, welche die Etablierung und den Erhalt des SAM kontrollieren (Brand et al., 2001). Diese komplexen Genexpressionsmuster entwickeln sich stufenweise während der Embryogenese und sind im Keimling voll ausgeprägt. Viele dieser Gene kodieren putative Transkriptionsfaktoren, so dass Subdomänen innerhalb des SAM jeweils durch eine Kombination der Expression dieser Transkriptionsfaktoren definiert sind. Die Anordnung dieser Expressionsdomänen scheint statisch zu sein und wird während der gesamten Entwicklung aufrechterhalten, obwohl sich die zelluläre Zusammensetzung der Domänen ständig verändert. Zellen, die aus der zentralen Zone durch Zellteilung verdrängt werden, verändern ihr Expressionsprofil entsprechend der Subdomäne, in der sie sich nun befinden. Gelangen sie durch die fortlaufende Verdrängung in eine andere Subdomäne, ändern sie ihr Expressionsprofil erneut. Dass das Expressionsprofil einer Zelle mit ihrer Position während des Wachstums korrespondiert, weist ebenfalls darauf hin, dass das Zellschicksal in Pflanzen positions- und nicht abstammungsabhängig ist.

Wie können diese Domänen erhalten werden, wenn sich die zelluläre Zusammensetzung der Expressionsdomänen im SAM ständig ändert? Durch die Analyse von Entwicklungsmutanten in *Arabidopsis thaliana* und die Isolierung der korrespondierenden Gene konnte in den letzten Jahren ein erster Zugang zum Verständnis der molekularen Grundlagen der Organisation des SAM und der damit eng verbundenen Regulation des Stammzellschicksals erreicht werden.

1.2 WUSCHEL und die CLAVATA-Gene

1.2.1 WUSCHEL

Das Gen WUSCHEL (WUS) kodiert einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor (Mayer et al., 1998). In Wildtyp-Pflanzen wird es im organisierenden Zentrum in der Mitte des SAMs, unterhalb der drei äußersten Zelllagen, exprimiert (Mayer et al., 1998; Schoof et al., 2000). Amorphe wus-Mutanten zeigen eine starke Entwicklungsstörung des SAMs (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Bereits in wus-mutanten Keimlingen sind, anstelle der für Meristeme charakteristischen cytoplasmareichen, vakuolisierte Zellen zwischen den Kotyledonen zu beobachten, was auf einen fortgeschrittenen Differenzierungsstatus hinweist. Die stark reduzierten Adventivmeristeme, die sich fortlaufend am abgeflachten Apex bilden, stellen bereits nach der Bildung einiger Blätter ihre Aktivität ein. Daraus resultiert eine Anhäufung von Rosettenblättern, die den Pflanzen ein "wuscheliges" Aussehen verleiht. Auch die Infloreszenzmeristeme und die wenigen aus ihnen hervorgehenden Blütenmeristeme, die in der späteren Entwicklung gebildet werden, verlieren frühzeitig ihre Aktivität. Die Blüten zeichnen sich durch eine reduzierte Organanzahl - vor allem in den beiden inneren Wirteln - aus. Die frühzeitige Termination von Sprossmeristemen in wus-Mutanten kann als eine Folge vorzeitiger Differenzierung von meristematischen Zellen interpretiert werden. Die Wurzelmeristeme sind dagegen nicht betroffen. WUS scheint somit für die Etablierung und Aufrechterhaltung undifferenzierter Stammzellen in der zentralen Zone der Spross- und Blütenmeristeme verantwortlich zu sein. Da WUS unterhalb der zentralen Zone exprimiert wird, muss dessen Funktion nicht-zellautonom sein (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998).

WUS reprimiert direkt die Expression einiger ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) Gene, die in der negativen Rückkopplung der Cytokinin-Signaltransduktion involviert sind. Obwohl die Überexpression von ARR7 WUS reprimiert, wird WUS in arr3 arr4 arr5 arr6 arr7 arr8 arr9 Siebenfachmutanten schwächer exprimiert. Diese legt nahe, dass WUS und die ARR-Gene einen negativ regulierten Rückkopplungskreislauf bilden könnten (Leibfried et al., 2005). Ein weiterer in der Expressionskontrolle von *WUS*-involvierter Rückkopplungsmechanismus mit dem *CLV3*-Signalweg (siehe 1.2.3) steht im Zentrum der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente.

1.2.2 Komponenten des CLAVATA-Signalweges

Einen dem *wus*-Phänotyp entgegengesetzten Effekt zeigen Pflanzen mit Mutationen in den drei *CLAVATA* (*CLV*) Genen. Bei *clv*-Mutanten ist das SAM durch die Akkumulation undifferenzierter Zellen bereits während der Embryogenese vergrößert (Leyser und Furner, 1992; Crone et al., 1993; Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Kayes und Clark, 1998). Die Vergrößerung des SAM bei *clv*-Mutanten ist progressiv, schreitet also mit zunehmendem Pflanzenwachstum fort und hat eine Fasziierung ("Verbänderung"; von lat. *fascia*: Band) der Sprossachse zur Folge. Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation undifferenzierter Zellen in *clv3*-mutanten Sprossmeristemen nicht von einer erhöhten Zellteilungsrate in der zentralen Zone, sondern durch eine verzögerte Differenzierter Zellen zur Bildung zusätzlicher Blütenorgane, insbesondere bei den Karpellen und zur verzögerten Termination des Meristems, die zur Bildung eines zusätzlichen fünften Wirtels führt (siehe 1.2.5). Daraus resultiert eine Keulenform der Schoten (lat. *clavata*: Keule). Wie in *wus*-Mutanten ist die Entwicklung des Wurzelmeristems in *clv*-Mutanten nicht beeinträchtigt. Die wildtypische Funktion der *CLV*-Gene scheint also die negative Regulation der Anzahl undifferenzierter Zellen in Spross- und Blütenmeristemen zu sein.

CLV1 kodiert eine Transmembran-Rezeptorkinase mit sich wiederholenden, Leucin-reichen Motiven (LRR = leucine rich repeats) in der extrazellulären Domäne (Clark et al., 1997) und *CLV2* einen LRR-Transmembran-Rezeptor, dem im Gegensatz zu CLV1 eine intrazelluläre Kinasedomäne fehlt (Jeong et al., 1999). *CLV3* kodiert ein 96 Aminosäuren (AS) großes Protein mit einer N-terminalen Signalsequenz (Fletscher et al., 1999) und einer 14 AS großen konservierten Region, der CLE-Domäne, die die Verwandtschaft mit weiteren CLV3-artigen Proteinen begründet (siehe 1.2.8; Cock und McCormick, 2001). Bei CLV3 könnte es sich um einen sekretierten Liganden handeln, der an den Rezeptoren CLV1 und CLV2 bindet. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass das CLV3-Protein prozessiert wird: *in vivo* liegt CLV3 durch das Abschneiden des N-Terminus nach den ersten zwei AS der CLE-Domäne und des C-Terminus genau hinter der CLE-Domäne als ein Dodecapeptid vor, bei dem zwei der drei Proline hydroxyliert wurden (Kondo et al., 2006).

Die *CLV3*-mRNA wird in der zentralen Zone des Sprossapikalmeristems exprimiert. Es wird vermutet, dass die *CLV3*-exprimierenden Zellen größtenteils identisch mit den Stammzellen des Meristems sind (Fletcher et al., 1999). Dagegen wird die mRNA von *CLV1* vorwiegend in einer darunter liegenden Domäne in der L3-Schicht exprimiert (Clark et al., 1997). Für die mRNA von

CLV2 fehlen bisher Detailstudien, es konnte jedoch durch eine Northernblot-Hybridisierung gezeigt werden, dass sie im Apex stark exprimiert wird (Jeong et al., 1999).

In *clv*-Mutanten akkumulieren die *CLV3*-exprimierenden Stammzellen überproportional zur Gröβenzunahme des Gesamtmeristems (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Wird *CLV3* unter der Kontrolle des *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* Promotors exprimiert, der in der peripheren Zone aktiv ist, führt das zum Verlust der endogenen *CLV3*-Expression in der zentralen Zone (Brand et al., 2000). Das legt nahe, dass *CLV3* seine eigene Expression durch einen indirekten negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert (siehe 1.2.3).

Die Stärke des *clv*-Phänotyps variiert stark zwischen den drei Genen und ihren Allelen. Bei dem *clv3-2*-Allel ist die größte Zunahme von undifferenziertem Gewebe in den Spross- und Blütenmeristemen zu beobachten. In *clv3-2*-Mutanten fehlen dem *CLV3*-Gen durch eine Inversion sowohl die 3'-gelegenen Enhancerelemente, wie auch die für die Funktion des prozessierten CLV3-Peptides essenziellen Histidine der CLE-Domäne (Fletcher et al., 1999; Kondo et al., 2006; Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung; Ralf Müller Diplomarbeit, 2002). Der Verlust der 3'-Enhancerelemente führt zur starken Reduktion der *CLV3*-Expression (Ulrike Brand und Lorenzo Borghi, persönliche Mitteilung). Das macht einen dominant-negativen Effekt eines am C-Terminus eventuell nicht prozessierten CLV3-2-Peptides unwahrscheinlich. Daher handelt es sich bei *clv3-2* vermutlich um ein Null-Allel. *clv1-* und *clv2-*Null-Allele sind deutlich schwächer als *clv3-2*. Dominant-negative *clv1-*Allele erreichen teilweise annähernd die Stärke von *clv3-2*, was damit erklärt wird, dass diese mutanten CLV1-Rezeptoren vermutlich die Funktion weiterer bisher unbekannter CLV3-bindender Rezeptoren stören (Diévart et al., 2003).

Die genetische Analyse von *clv*-Doppelmutanten legt nahe, dass die CLV-Genprodukte im selben Signaltransduktionsweg agieren. So sind starke *clv1/clv3*-Doppelmutanten kaum von den jeweiligen Einzelmutanten zu unterscheiden (Clark et al., 1995). Zudem ist *clv3-2* annähernd epistatisch über die *clv2*-Null-Allele bzw. diese supprimieren den *clv3-2*-Phänotyp leicht (Kayes und Clark, 1998).

Das CLV1-Protein scheint *in vivo* in zwei verschiedenen Transmembran-Rezeptor-Komplexen vorzuliegen, von dem einer ca. 185 kDa und der andere ca. 450 kDa groß ist. Der größere CLV1-Proteinkomplex enthält zudem eine Kinase-assoziierte Proteinphosphatase (KAPP) und ein Rho-GTPase-verwandtes Protein (ROP) (Williams et al., 1997; Stone et al., 1998; Trotochaud et al., 1999). Es wird spekuliert, dass in beiden Komplexen ebenfalls CLV2, durch Disulfidbrücken verbunden mit CLV1, vorliegt. Des Weiteren wird angenommen, dass der größere CLV1-Komplex durch die Bindung des putativen Liganden CLV3 entsteht. Bisher konnte jedoch CLV2 weder direkt in den beiden CLV1-Proteinkomplexen nachgewiesen werden, noch wurde eine direkte Bindung des modifizierten CLV3-Peptids an die Rezeptoren CLV1 oder CLV2 gezeigt. Basierend auf diesen Daten, der vorhergesagten bzw. nachgewiesenen Struktur der von den *CLV*-Genen kodierten Proteine

und genetischen Studien (s.o. und 1.2.3), wurde ein molekulares Modell der *CLV3*-Signaltransduktion via des putativen CLV1/CLV2-Rezeptorkomplex entwickelt: In den Pflanzen bilden die Rezeptoren CLV1 und CLV2 einen durch Disulfid-Brücken verbundenen membranständigen Rezeptorkomplex. Durch die Bindung des CLV3-Peptides kommt es vermutlich zur Transphosphorylierung mit einem anderen durch die CLV3-Bindung aktivierten CLV1/CLV2-Rezeptorkomplex. Daraufhin assoziieren weitere Proteine mit dem Rezeptorkomplex. Darunter befindet sich das kleine G-Protein ROP, das vermutlich das *CLV3*-Signal weiterleitet und KAPP, das den Rezeptorkomplex wieder durch Dephosphorylierung deaktiviert (Abb.1; Waites and Simon, 2000; Brand et al., 2001; Clark, 2001). Weitere Komponenten des *CLV3*-Signalweges werden im Kapitel 1.2.4 vorgestellt.

1.2.3 WUS und die CLV-Gene sind Komponenten eines Regelkreises, der das Stammzellschicksal reguliert

Beruhend auf dem Phänotyp ihrer Mutanten (1.2.1 und 1.2.2) scheinen WUS und die CLV-Gene antagonistisch auf das Stammzellschicksal in den Spross- und Blütenmeristemen zu wirken. In *clv/wus*-Doppelmutanten verhält sich *wus* epistatisch über *clv* (Laux et al., 1996). Daher scheinen die CLV-Gene über die Repression von WUS die Stammzellpopulation zu limitieren. Dennoch lässt der beobachtete Phänotyp auch eine andere Interpretation zu, in der WUS und die CLV-Gene auf unterschiedlichen Ebenen wirken. WUS würde demnach die Identität der Stammzellen fördern und die CLV-Gene dagegen ihre Proliferation negativ regulieren (Laux et al., 1996).

In *clv*-mutanten Meristemen ist die *WUS*-Expression lateral vergrößert und bleibt im Gynözium länger erhalten (Schoof et al., 2000). Die Überexpression von *CLV3* sorgt dagegen für den Verlust der *WUS*-Expression in den Meristemen, woraus ein *wus*-artiger Phänotyp resultiert (Brand et al., 2000). *clv1*- und *clv2*-Mutanten supprimieren diesen Phänotyp, was der einzige direkte Hinweis darauf ist, dass CLV3 der Ligand der Rezeptoren CLV1 und CLV2 in einem gemeinsamen Signalweg ist (siehe 1.2.2). Somit scheint *WUS* tatsächlich einer negativen Regulation auf transkriptioneller Ebene durch den *CLV*-Signalweg zu unterliegen. Zudem bewirkt die ektopische Expression von *WUS* in transgenen Pflanzen, vergleichbar mit der Beobachtung in *clv*-Mutanten, das Akkumulieren der Stammzellen (Schoof et al., 2000).

Aus diesen Daten und dem Befund der indirekten Selbstrepression von *CLV3* (siehe 1.2.2) wurde ein Modell entwickelt, in dem sich die Expressionen von *CLV3* und *WUS* in einem negativ regulierten Regelkreis gegenseitig kontrollieren: Akkumulieren viele Stammzellen, wird mehr CLV3 sekretiert, was zu einer stärkeren Repression von *WUS* über den CLV1/CLV2-Rezeptorkomplex führt. Verminderte *WUS*-Expression bewirkt wiederum eine verringerte Stammzellanzahl, so dass im Ergebnis die Anzahl der Stammzellen konstant gehalten wird (Abb.1; Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000; Waites und Simon, 2000; Clark, 2001).



Abb.1: Modelle der CLV/WUS-Interaktion. (A) Die gegenseitige Regulation der CLV3- (rot) und der WUS-Expression (grün) in Spross- und Blütenmeristemen (Abb.1A von Rüdiger Simon, mod.). (B) Molekulares Modell des CLV3- und WUS-Signalweges: 1. und 2.: CLV3 wird in den Stammzellen exprimiert (rot). Nach der Translation im ER wird das CLV3-Protein modifiziert. Das Protein wird am Anfang und hinter der konservierten CLE-Domäne geschnitten, so dass ein Dodecapeptide entsteht, von dem zwei Proline hydroxyliert werden. Die Reihenfolge dieser Modifikationen ist bisher nicht geklärt. 3. und 4.: Nach der Sekretion des CLV3-Peptides in den Apoplast kann es an den putativen CLV1/CLV2-Rezeptorkomplex in der Plasmamembran der Zellen des organisierenden Zentrums (grün) binden. 5.: Die Bindung von CLV3 führt zu Phosphorylierung der CLV1-Kinasedomäne und somit zur Aktivierung des Rezeptorkomplexes, in deren Folge weitere Proteine, wie KAPP und ROP, an den Komplex binden. 6.: KAPP dephosphoryliert die Kinasedomäne wieder und schaltet das Signal wieder aus. 7.: Zuvor wird jedoch ROP gebunden, das durch den Austausch von GDP durch GTP in seine aktive Form übergeht. 8.: Die Aktivierung des CLV-Rezeptorkomplexes führt zur Repression der Aktivität der Phosphortasen POL und PLL1. 9.: POL und PLL1 aktivieren die WUS-Expression durch einen unbekannten Mechanismus. 10.: Der im organisierenden Zentrum exprimierte Transkriptionsfaktor WUS fördert nicht-zellautonom das Stammzellschicksal und somit die CLV3-Expression. (C) Schematische Darstellung des CLV/WUS-Regelkreises.

Dieses Modell suggeriert eine hohe Sensibilität und eine schnelle Reaktion auf die Schwankungen von *CLV3* und *WUS*, um die Homöostase der Stammzellpopulation zu erreichen. Zu Beginn meiner Arbeit gab es jedoch keine Erkenntnisse darüber, ob die vorhergesagte hohe Dynamik des Systems tatsächlich besteht. In einer aktuellen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *CLV3* während der Entwicklung mittels einer RNA interference (RNAi) Methode zur Aktivierung der *CLV3*-Expression in der peripheren Zone innerhalb von 24 Stunden führt (Reddy und Meyerowitz, 2005). Die von mir vorgestellten Daten zeigen dagegen die Auswirkungen der induzierten Erhöhung von *CLV3* auf die eigene Expression und die von *WUS*. Dabei wurden auch kürzere Zeitintervalle als in zuvor publizierten Arbeiten untersucht.

1.2.4 Weitere Komponenten des CLV-Signalweges

Für die Etablierung des *CLV3*-Signalkomplexes wird das Chaperon SHEPHERD (SHD) benötigt. *shd*-Mutanten zeigen einen *clv*-artigen Phänotyp und supprimieren, wie *clv1*- und *clv2*-Mutanten, die *CLV3*-Überexpression (Ishiguro et al., 2002).

Das dominant-negative poltergeist-1 (pol-1) Allel supprimiert den Phänotyp von starken clv1- und clv3-Mutanten partiell und von clv2-Null-Allelen annähernd vollständig (Yu et al., 2000). POLTERGEIST kodiert eine aktive Protein-Phosphatase-2C, die in den Spross- und Blütenmeristemen, aber auch in anderen Geweben exprimiert wird. Die dominant-negative Wirkung des pol-1-Allels beruht vermutlich darauf, dass neben dem Verlust der eigenen Funktion auch die der homologen und redundanten Phosphatase POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1) und evtl. der drei weiteren PLL-Proteine gestört wird (Yu et al., 2003). pol/pll1-Doppelmutanten sind auf Grund von Defekten in der Vaskulatur keimlingsletal. Mittels Pfropfexperimenten ("grafting") konnte jedoch gezeigt werden, dass pol/pll1-Doppelmutanten die Expression von WUS nicht aufrechterhalten können und dementsprechend den Phänotyp von wus-Mutanten kopieren. Zudem verhalten sich pol/pll1-Doppelmutanten, wie wus, epistatisch über clv3-Mutanten. Die Überexpression von PLL1 fördert dagegen das Stammzellschicksal abhängig von WUS und kann den Phänotyp von clv-Mutanten sogar verstärken. Die Akkumulation von undifferenziertem und karpelloidem Gewebe durch die Missexpression von WUS unter dem APETALA1-Promotor ist dagegen unabhängig von POL und PLL1 (Song und Clark, 2005; Song et al., 2006). Demnach kann POL und PLL1 in das Modell des CLV-Signalweges zwischen den CLV-Rezeptoren und WUS eingeordnet werden: Die Aktivierung von CLV1 und CLV2 reprimiert die Aktivität von POL und PLL1, die die WUS-Expression auf transkritioneller Ebene positiv reguliert (Abb.1).

In dieser Arbeit wurde das *pol-1*-Allel verwendet, weil es sich weitgehend wie eine schwache *pol/pll1*-Doppelmutante verhält ohne keimlingsletal zu sein.

1.2.5 Die Karpellenanzahl ist ein Indikator für die Größe der Stammzellpopulation in den Blüten

Bei *clv*-Mutanten ist die Blütenorgananzahl aufgrund der Vergrößerung des Meristems erhöht. Durch den verspäteten Arrest des Blütenmeristems ist der vierte Wirtel besonders stark betroffen und es entsteht teilweise ein fünfter Wirtel, durch den die Schoten keulenförmig erscheinen (Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Kayes und Clark, 1998). Da sich in *clv*-Mutanten die Stammzelldomäne überproportional zur Gesamtmeristemgröße ausdehnt (Fletcher et al., 1999), scheint ein direkter Zusammenhang mit der unterschiedlich starken Organzunahme in den Blütenwirteln zu bestehen. Diese Annahme, dass das Verhältnis der Organzunahme auch Schlüsse über die Subdomänen des Meristems, insbesondere über das Größenverhältnis der zentralen Zone zur peripheren Zone, zulässt, wird durch Blütenmutanten bestätigt, die vor allem in den äußeren Wirteln mehr Organe tragen. Bei *ultrapetala (ult)* z.B. scheint ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Organanzahl und der Vergrößerung der Blütenmeristeme zu bestehen (Fletcher, 2000). Hier kommt es aber im Gegensatz zu *clv*-Mutanten zu keiner Vergrößerung der *CLV3*-Domäne und dementsprechend erhöht sich die Anzahl der Karpellen weit weniger als die Organanzahl der äußeren Wirtel. Das legt nahe, dass die Anzahl der Karpellen nicht nur ein Indikator für die Meristemgröße ist, sondern vorwiegend die Größe der Stammzelldomäne widerspiegelt.

1.2.6 Die Tageslänge modifiziert den clv-Phänotyp

Der Phänotyp von *clv*-Mutanten wird unter Kurztag (KT) supprimiert. Die bei *clv3-2* schwächer als bei Null-Allelen von *clv1* und *clv2* ausgeprägte Suppression ist eine Antwort auf die Inaktivierung eines Langtag (LT) Signalweges, der die Blühinduktion fördert (Kayes und Clark, 1998; Jeong und Clark, 2004). Bekannte Komponenten dieses LT-Signalweges sind z.B. die Gene *CRYPTOCHROME2* (*CRY2*), *CONSTANS* (*CO*) und *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Reeves und Coupland, 2000). Die Überexpression von *CO* verstärkt den Phänotyp von *clv3-2*-Mutanten. Das legt nahe, dass der LT-Signalweg unabhängig von den *clv*-Genen arbeitet. Dominant-negative *clv1*-Allele unterliegen ebenfalls einer geringern Suppression, die in der Störung von in den LT-Signalweg involvierten Rezeptoren begründet sein könnte (Jeong und Clark, 2004). Diese Annahme liefert jedoch keine Erklärung für die verminderte Suppression von *clv3-2*. Unabhängig von ihrer Ausprägung ist die Suppression des *clv*-Phänotyps unter KT ein gemeinsames Merkmal aller *clv*-Mutanten.

1.2.7 Die Rolle des CLV-Signalweges in der Entwicklung lateraler Organe

Neben den vergrößerten Meristemen sind bei *clv*-Mutanten Defekte in einigen lateralen Organen zu beobachten (Kayes und Clark, 1998). In den *clv*-Blüten tragen einige Stamen keine Antheren und einige der Karpelle werden verspätet oder nicht angelegt. Der letztere Phänotyp wird in der englischsprachigen Literatur "valveless" genannt. Er könnte teilweise die durch die vergrößerten Blütenmeristeme verursachte Zunahme der Karpellenanzahl überdecken. Die Defekte der Stamen und Karpellen sind in den unterschiedlichen *clv*-Allelen unterschiedlich stark ausgeprägt. In starken *clv1*-Mutanten treten diese Phänotypen nur selten auf, für *clv1*-Null-Allele liegen bisher keine Daten vor. Da die Organdefekte wie die Stammzellakkumulation unter KT supprimiert werden, könnten diese abhängig von der Veränderung der *clv*-Blütenmeristeme sein (Kayes und Clark, 1998). Die Defekte der lateralen Organe scheinen neben der Tageslänge von weiteren Faktoren abgängig zu sein, da bei *clv3-2* der "valveless"-Phänotyp unter Dauerlicht (DL) teilweise nicht auftritt (Widerspruch zwischen Kayes und Clark, 1998 und Diévart et al., 2003).

Ein weiterer von der Tageslänge unabhängiger Effekt betrifft die in Landesberg *erecta* (Ler) zu beobachtende Stauchung der Pedicels (1.2.8), die durch einige *clv*-Allele partiell supprimiert wird (Kayes und Clark, 1998).

1.2.8 CLV3-verwandte Gene

Eine Reihe von kleinen sekretierten Proteinen teilen mit CLV3 eine 14 Aminosäuren große Region in der Nähe des C-Terminus, der CLE-Box (von <u>CLV3/EMBRYO-SURROUNDING REGION</u>-verwandt) (Cock und McCormick, 2001). Diese CLE-Proteine werden vermutlich alle wie CLV3 prozessiert und liegen als Dodecapeptide in der Pflanze vor (siehe 1.2.2; Ito et al., 2006; Kondo et al., 2006). Von den 31 CLE-Proteinen in *Arabidopsis* sind erst wenige genauer untersucht worden.

Die Überexpression oder die Behandlung mit synthetischen Peptiden von CLV3, CLE19 und CLE40 führt zur Ausdifferenzierung des Wurzelmeristems (Casamitjana-Martinez et al., 2003; Hobe et al., 2003; Fiers et al., 2005). Interessanterweise wird der Arrest des Wurzelmeristems in *clv2*-Mutanten inhibiert (Fiers et al., 2005). Das legt die Existenz eines *CLE*-Signalwegs nahe, der analog zum *CLV*-Signalweg im Spross das Stammzellschicksal der Initialen in der Wurzel reprimiert. In diesen können *CLV3* und *CLV1* nicht involviert sein, da diese nicht in der Wurzel exprimiert werden. Am Beispiel *CLE40* zeigte sich, dass sich aus dem Überexpressionsphänotyp nicht die unmittelbare Funktion der einzelnen *CLE*-Gene ermitteln lässt (Hobe et al., 2003). *cle40*-mutante Wurzeln terminieren jedoch ebenfalls, was nahe legt, dass *CLE40* im Kontrast zu *CLV3* die Differenzierung von Stammzellen verhindert (Hobe et al., 2003; Yvonne Stahl, persönliche Mitteilung). Mit TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR (TIDF) ist ein weiteres

CLE-Peptid bekannt, das Differenzierung supprimiert (Ito et al., 2006). CLE-Peptide sind daher sowohl in die Förderung wie auch die Inhibition von Zelldifferenzierung im Spross und in der Wurzel involviert. In der transgenen Situation der ubiquitären Überexpression kann *CLE40* vermutlich an einen Rezeptorkomplex binden, der Teil eines zu *CLE40* antagonistisch wirkenden Signalweges ist. Da zudem die Expression von *CLE40* in den Stammzellen der Blüten- und Sprossmeristeme die Funktion von *CLV3* ersetzen kann, wird die Spezifität der CLE-Peptide vermutlich weitgehend durch ihre Expressionsmustern kontrolliert (Hobe et al., 2003). Dennoch beruht ein Teil der spezifischen Wirkung der CLE-Peptide auch auf ihrer Struktur. Nicht alle CLE-Peptide können die Funktion von *CLV3* ersetzen, wenn sie in der zentralen Zone von *clv3-1* Mutanten exprimiert werden (Ni et al., 2006).

1.2.9 ERECTA und CLV1-verwandte LRR-Rezeptorkinasen

Die CLV1-verwandten Rezeptorkinasen BAM1, BAM2 und BAM3 (abgeleitet von <u>barely any</u> <u>meristem</u>) scheinen eine dem *CLV*-Signalweg entgegen gesetzte Rolle in der Entwicklung zu spielen. Die Spross- und Blütenmeristeme von *bam*-Dreifachmutanten verlieren frühzeitig ihre Stammzellen. Im Gegensatz zu *CLV1* werden die *BAMs* nicht im Zentrum des Meristems exprimiert, sondern an seinen Flanken. Darüber hinaus werden die BAM-Rezeptoren für die Entwicklung einer Reihe nichtmeristematischer Gewebe benötigt und dort exprimiert: *bam*-Dreifachmutanten zeigen Defekte in der peripheren Vaskulatur, in der Form, Größe und Symmetrie der Blätter, wie auch in den männlichen und weiblichen Gametophyten. Wie bei den *CLE*-Genen scheint die Spezifität in der Funktion von *CLV1* und den *BAM*-Genen weitgehend auf ihren räumlich unterschiedlichen Expressionsmustern zu beruhen, da in Kreuzkomplementationsstudien *CLV1* sowohl *BAM1* als auch *BAM2* in den sich entwickelnden Organen vollständig ersetzen kann und umgekehrt *BAM1* und *BAM2* teilweise den Funktionsverlust von *CLV1* im Meristem komplementieren (DeYoung et al., 2006).

Der häufig als Wildtyp verwendete Ökotyp Landesberg *erecta* (*Ler*) trägt eine Mutation in der LRR-Rezeptorkinase ERECTA (ER) (Torii et al., 1996; Lease et al., 2001), die die Organform und die Infloreszenzarchitektur reguliert. *er*-Mutanten haben kompaktere Infloreszenzen mit kurzen Internodien, kurze Pedicels und kürzere, an dem distalen Ende abgeflachte Schoten (Bowman, 1993; Torii et al., 1996). Diese Phänotypen werden anscheinend durch eine veränderte Zellgröße und Anzahl verursacht (Yokoyama et al., 1998). Interessanterweise können *er*-Mutanten die Akkumulation von Stammzellen in *clv1*-Mutanten leicht verstärken, *clv3*-Null-Allele sind dagegen anscheinend nicht von diesem Effekt betroffen (Diévart et al., 2003). Somit könnte die ER-Rezeptorkinase eine untergeordnete Rolle bei der Weiterleitung des *CLV3*-Signals spielen.

1.2.10 WUS-Homologe

WUS ist das Gründungsmitglied der <u>WUS</u>-verwandten Homöob<u>ox</u> (WOX) Genfamilie, die in *Arabidopsis* einschlieβlich WUS 15 Mitglieder umfasst. Die WOX-Gene haben unterschiedliche Expressionsmuster und Funktionen in der Entwicklung (Haecker et al., 2004). WOX9 (auch *STIMPY* genannt) ist ein positiver Regulator von WUS (Wu et al., 2005). Das im QC des Wurzelmeristems exprimierte WOX5 fördert, analog zu WUS im Spross, das Stammzellschicksal der Initialen (Sarkar et al., 2007). Da die Überexpression einiger CLE-Gene das Stammzellschicksal der Initialen reprimiert (1.2.8), könnte WOX5 mit einem oder mehreren CLE-Genen einen negativ regulierten Rückkopplungskreis in der Wurzel entsprechend zu CLV3 und WUS im Spross bilden.

1.3 Weitere Regulatoren der Meristementwicklung

In den letzten Jahren ist eine große Anzahl neuer Regulatoren der meristematischen Entwicklung beschrieben worden. Daher können hier nur die wichtigsten der für diese Arbeit relevanten Gene vorgestellt werden.

1.3.1 SHOOT MERISTEMLESS

Wie WUS ist auch das Gen SHOOT MERISTEMLESS (STM) notwendig für die Etablierung des embryonalen SAM und dessen Aufrechterhaltung in der späteren Entwicklung. In homozygoten stmmutanten Embryonen kann die Meristemorganisation in Tunica und Korpus nicht etabliert werden, was zur Meristem-Termination führt (Barton und Poethig, 1993; Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). STM kodiert einen Homöoboxdomäne-Transkriptionsfaktor, der mit dem KNOTTED1-Gen aus Mais verwandt ist und im ganzen Meristem, jedoch nicht in den Organprimordien, exprimiert wird (Long et al., 1996). Im Gegensatz zu *clv/wus*-Doppelmutanten (1.2.3) ist der Phänotyp von *clv/stm*-Doppelmutanten additiv: *clv/stm*-Sprossmeristeme sind wie in *clv*-Mutanten vergrößert, terminiert jedoch wie in *stm*-Mutanten in der weiteren Entwicklung (Clark et al., 1996). Somit scheint *STM* unabhängig von WUS zur Aufrechterhaltung des meristematischen Schicksals beizutragen.

1.3.2 CUP SHAPED COTYLEDON

Doppel- und Dreifachmutanten der drei *CUP SHAPE COTELYDON (CUC)* Gene verursachen sowohl Defekte bei der Etablierung des SAMs, als auch in der Organseparierung; so sind z.B. die Kotyledonen tassenförmig verwachsen. Die *CUC*-Gene sind teilweise redundant, da der Phänotyp in den *cuc*-Einzelmutanten weit schwächer ausgeprägt ist. Die drei korrespondierenden Gene kodieren für Homologe des Transkriptionsfaktors *NO APICAL MERISTEM (NAM)* aus *Petunia* und werden in der frühen Embryogenese an der Position des zukünftigen SAM exprimiert. Später verschiebt sich die Expression an die Grenze zwischen Meristem und Organprimordien (Aida et al., 1997; Aida et al., 1999; Vroemen et al., 2004).

Die *CUC*-Gene sind in *stm*-Mutanten exprimiert, *STM* jedoch nicht in *cuc*-Doppelmutanten (Aida et al., 1999; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2004). Die Überexpression von *CUC1* unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors führt zur ektopischen Expression von *STM* in den Kotyledonen. In der Folge werden adventive Meristeme gebildet, die nach einer Weile auch *WUS* exprimieren (Hibara et al., 2003). Somit scheinen die *CUC*-Gene über die Aktivierung von *STM* meristematisches Schicksal zu fördern, und dieses erst indirekt die *WUS*-Expression. Obwohl die drei *CUC*-Gene partiell redundant sind und annähernd in den gleichen Domänen exprimiert werden, unterliegen sie teilweise unterschiedlicher Regulation. So werden die mRNAs von *CUC2* und *CUC3*, jedoch nicht die von *CUC1* durch die *miRNA164* negativ reguliert (Laufs et al. 2004; Mallory et al., 2004). In dieser Arbeit wird ein weiterer spezifischer Regulator zweier *CUC*-Gene vorgestellt (3.1.3).

1.3.3 DORNRÖSCHEN und DRN-LIKE

DORNRÖSCHEN (DRN; auch bekannt als ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1, ESR1) und DRN-LIKE (DRNL bzw. ESR2) sind nahverwandte Homologe, die Transkriptionsfaktoren mit einer AP2-Domäne kodieren (Kirch et al., 2003). DRN scheint ein Aktivator zu sein, da es sich durch die Fusion mit der EAR-Suppressordomäne in eine dominant-negative Form überführen lässt (Otha et al., 2001; Lorenzo Borghi, Dissertation, 2005). drn- und drnl-Einzelmutanten zeigen vereinzelt Defekte in der Embryo- und Kotelydonenentwicklung, einschlieβlich fusionierter oder tassenförmiger Kotyledonen, wie sie von cuc-Doppelmutanten bekannt sind. In drn/drnl-Doppelmutanten erhöht sich die Rate und die Stärke der Defekte (Chandler et al., 2007). Eine Funktion von DRN scheint die Kontrolle des Auxin-Transports oder der Auxin-Signaltransduktion zu sein, da die Expression von PIN1 und DR5::GFP in drn-Mutanten verändert ist. DRN und DRNL können im Hefe-2-System mit den Mitgliedern der Klasse III HD-ZIP-Familie, einschlieβlich PHAVOLUTA (PHV), interagieren. Diese sind bekannte Regulatoren der Embryo- und Kotelydonenentwicklung (Talbert et al., 1995;

Prigge et al., 2005). Die Verstärkung der Zellteilungsdefekte in *drn/phv*-doppelmutanten Embryonen bestätigt die biologische Relevanz der *in vivo* gefundenen Interaktionen (Chandler et al., 2007).

Das DRN auch eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Sprossmeristems spielt, wurde in früheren Veröffentlichungen gezeigt, deren Daten überwiegend auf der Missexpression von DRN beruhen. So induziert die DRN-Überexpression die Initiation der Sprossregeneration in Wurzelexplantaten, unabhängig von Cytokinin (Banno et al., 2002). In drn-D-Mutanten, in denen DRN ebenfalls überexprimiert wird, variiert die Regulation von CLV3, WUS, STM und möglicherweise anderer Zielgene, was zur frühzeitigen Termination des SAM führt. Diese Termination unterscheidet sich jedoch deutlich von der in wus-Mutanten (Laux et al., 1996; Kirch et al., 2003). DRN und DRNL werden im Wildtyp in der zentralen Zone der Spross- und Blütenmeristeme und in den Anlagen lateraler Organe exprimiert, wo die Expression eine kurze Zeit an der Spitze der Primordien erhalten bleibt (Kirch et al., 2003; Ikeda et al., 2006). Durch die Überexpression von DRN kommt es zur Umorganisation des Meristems und der Verschiebung der endogenen DRN-Expression, zusammen mit der von CLV3 und WUS, in tiefere Regionen. Alle drei Gene werden schließlich zusammen in undiffenzierten Zellen exprimiert, die sich unterhalb differenzierter Zellschichten befinden (Kirch et al., 2003). Somit hat sich die Polarität des Meristems gewissermaßen umgedreht. Eine mögliche Aufgabe von DRN könnte daher die Markierung der apikalen Position bei allen Meristemen und Organen sein (Stahl und Simon, 2006). Die Missexpression von DRN in den Stammzellen unter der Kontrolle des CLV3-Promotors (CLV3::DRN) führt darüber hinaus zu Defekten in der Polarität und dem Auswachsen der Organe in der peripheren Zone (Kirch et al., 2003).

Die Überexpression von *DRNL* in Keimlingen erhöht die Expression der Meristemregulatoren *WUS*, *STM* und *CUC1* (Ikeda et al., 2006). Die Expression von *ARR5* und *ARR6* wird dagegen reprimiert und könnte daher indirekt die *WUS* Expression fördern (siehe 1.2.1; Leibfried et al., 2005; Ikeda et al., 2006). Die Abregulation von *DRNL* durch *RNAi* reduziert die Expressionsrate von *CUC1*, aber nicht von *CUC2*. Darüber hinaus legt die induzierte *DRNL*-Überexpression bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid nahe, das *DRNL CUC1* direkt aktiviert. Zudem ist die Aktivierung von *STM* durch DRNL abhängig von *CUC1*. Somit scheint *DRNL* die Expression von *STM* indirekt über *CUC1* zu regulieren (Ikeda et al., 2006).

In dieser Arbeit sollte durch die induzierte Überexpression von *DRN* während der Entwicklung überprüft werden, ob die Verschiebung der *CLV3-* und *WUS-*Expression einer direkten Kontrolle von *DRN* unterliegt, oder eine indirekte Folge der Umorganisation des Meristems ist. Außerdem sollten weitere Zielgene von *DRN* identifiziert werden.

1.3.4 CURLY LEAF

Die Polycomb-Gruppen (Pc-G) Gene bewirken die mitotisch stabile Repression von Zielgenen antagonistisch zu den Aktivatoren der Thrithorax-Gruppe (Trx-G). Beide Genklassen bewirken epigenetische Veränderungen der Chromatinstruktur und dienen unter anderem dem Erhalt der Expressionsmuster in der Entwicklung involvierter Gene. In Komplexen mit weiteren Pc-G-Proteinen kontrolliert CURLY LEAF (CLF) die Blütenentwicklung. In *clf*-2-Mutanten sind die ABC Gene *APETALA3 (AP3)* und *AGAMOUS (AG)* verstärkt exprimiert, was die homöotische Transformationen der Blütenorgane bewirkt (Goodrich et al., 1997; Chanvivattana et al., 2004). In einer aktuellen Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass *AG* und *STM* direkte Zielgene der Repression durch *CLF* sind (Schubert et al., 2006). Darüber hinaus scheint *CLF* auch die Expression von *WUS* direkt zu regulieren (Daniel Schubert und Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung).

1.4 Der Jasmonsäure-Signalweg

Das Phytohormon Jasmonsäure (JA) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von metabolischen Prozessen, der Pathogenabwehr und der Entwicklung, einschließlich Seneszenz und Fertilität. Weitere Phytohormonsignalwege wie die von Ethylen, Salicylsäure und Auxin beeinflussen die lokal wirkende Antwort des JA-Signals (Devoto et al., 2003). JA induziert die Expression seiner eigenen Syntheseenzyme, so dass das JA-Signal vermutlich durch diese positive Rückkopplung mit seiner Biosynthese verstärkt wird. Zudem erhöht die Behandlung mit JA die Expression einiger Komponenten anderer Phytohormonsignalwege (Sasaki et al., 2001). Die JA-Behandlung von *Solanum tuberosum* Pflanzen (Kartoffel) mit niedrigen Konzentrationen bewirkt die Verstärkung der Zellstreckung und der Elongation von Sprossachse und Blättern. Hohe nichtphysiologische Konzentrationen haben dagegen den gegenteiligen Effekt (Ulleo et al., 2002).

Über die Rolle der Jasmonsäure für die meristematische Entwicklung ist sehr wenig bekannt. Die Behandlung von Ausläufersprossen von *Solanum tuberosum* mit 3 x 10^{-10} mol L⁻¹ JA verstärkt die Zellstreckung auch im Meristem, was zu seiner Vergrößerung führt. Die Länge der Blattprimordien wird dagegen reduziert (Cenzano et al., 2003). Da Jasmonsäure positiv auf die Zellstreckung im Meristem wirken kann, könnte es eine Rolle in der Differenzierung meristematischer Zellen spielen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung verschiedener Aspekte der *CLV3*-Signaltransduktion bei der Regulation des Stammzellschicksals in den Spross- und Blütenmeristemen von *Arabidopsis thaliana*. Die Arbeit gliedert sich dabei in drei Teile:

Im ersten Teil sollte untersucht werden, ob der Transkriptionsfaktor *DORNRÖSCHEN (DRN)* die Expression von *CLV3* und *WUS* kontrolliert. Zudem sollte nach weiteren putativen Zielgenen von *DRN* gesucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Dynamik des *CLV3/WUS*-Regelkreises untersucht werden, da das Modell der gegenseitigen Regulation von *CLV3* und *WUS* bisher nur auf der Untersuchung weitgehend statischer Zustände in Mutanten und transgenen Pflanzen beruht. Daher wurde die Reaktion der *WUS*-Expression und der Stammzellen auf die induzierte Erhöhung der *CLV3*-Expression untersucht. Schlussendlich sollte geklärt werden, ob die Anzahl der Stammzellen in einem direkten Zusammenhang mit der Menge der *CLV3*-Transkripte steht.

Im dritten Teil wurden putative Suppressormutanten der *CLV3*-Überexpression darauf untersucht, ob sie Bestandteil des *CLV3*-Signalweges sind. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die *coryne*-Mutante, bei der, wie bei *clv*-Mutanten, Spross- und Blütenmeristeme vergrößert sind.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Life Science (Braunschweig), Biomol (Hamburg), Biozym (Oldendorf), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck-Eurolab (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), Clontech (Heidelberg).

2.1.2 Enzyme

Es wurden, falls nicht anders angegeben, die Enzyme der Firmen *Biolabs* (Schwalbach) und *Invitrogen* (Karlsruhe) verwendet. Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit den beigefügten Puffern verwendet.

2.1.3 Verwendete Puffer und Medien

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

2.1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierungen und Plasmidamplifikationen wurden die *E.coli* Stämme XL1-blue (*Stratagene*), DH5 α^{TM} (*Invitrogen*) und DH10BTM (*Invitrogen*) verwendet. Die Genotypen der Bakterienstämme sind den Firmenangaben zu entnehmen. Für die Pflanzentransformationen wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) verwendet.

2.1.5 Vektoren

pACN_SalI (Klon 20)

Der Vektor pACN_Sall (Rüdiger Simon, Müller et al., 2006) ist ein Derivat von pACN1 (Salter et al., 1998), in den eine Ω_{CLV3} _NOS-Terminator-Kassette des pBU6 (Brand et al., 2000) über die *PstI*-Schnittstelle kloniert wurde. Die so entstandene Expressionskassette *alcA*-Promotor_ Ω_{CLV3} _NOS-Terminator wurde für die Erzeugung des Pflanzenexpressionsvektors pRM_ALCL1 verwendet.

pBluescriptKS+

Der Vektor pBluescriptKS+ (Alting-Mees et al., 1992; *Invitrogen*, Karlsruhe) wurde für Zwischenklonierungen und als Vektor für die *in vitro*-Transkription verwendet.

pBU5

In dem pflanzlichen Expressionsvektor pBU5 (Ulrike Brand) wird die *CLV3*-cDNA unter der Kontrolle des *HistonH4*-Promotors exprimiert (*HIS::CLV3*). Der Vektor ist ein pGREEN*nos-BAR*-Derivat und trägt eine bakterielle Kanamycin- und eine pflanzliche BASTA[®]-Resistenz. Der Nachweis von pBU5 in den transgenen Pflanzen erfolgte mittels BASTA[®]-Selektion.

pBU6

In dem pflanzlichen Expressionsvektor pBU6 (Brand et al., 2000) wird die *CLV3*-cDNA unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors exprimiert (*CaMV35S*::*CLV3*). Der Vektor ist ein pGREEN*nos-BAR* Derivat und trägt eine bakterielle Kanamycin- und eine pflanzliche BASTA[®]-Resistenz. Der Nachweis von pBU6 in den transgenen Pflanzen erfolgte mittels BASTA[®]-Selektion oder PCR, bei der das BASTA[®]-Resistenzgen mit den Oligonukleodiden RM_BAR_I und RM_BAR_II nachgewiesen wurde. Zudem wurde das pBU6-Transgen teilweise durch die PCR-Amplifikation des *CLV3*-Gens mit den Oligonukleotiden Flor1 und Flor2 nachgewiesen. Bei den transgenen Pflanzen wird neben der Bande des endogenen *CLV3*-Gens (540 bp) auch die kleinere Bande der *CLV3*-cDNA (240 bp) des Transgens nachgewiesen.

pBU16

Der pBU16 Vektor (Brand et al., 2002) trägt ein *CLV3*::*GUS*-Reportergen (*CLV3*::*GUS*), bestehend aus dem 1487 bp großen 5'-Promotorfragment und dem 1256 bp großen 3'-Fragment des *CLV3*-Gens mit putativen Enhancersequenzen. Das *GUS*-Gens (*uidA*) ist zwischen die beiden Regulationselemente kloniert. Dieses pGREEN*nos-BAR*-Derivat fand in dieser Arbeit nur in Form von bereits zuvor erzeugten transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen Verwendung.

pCR[®]II-TOPO[®]

Der Vektor pCR[®]II-TOPO[®] (*Invitrogen*, Karlsruhe) wurde für Zwischenklonierungen verwendet.

pENTRTM-D/TOPO[®]

Der pENTRTM-D/TOPO[®] (*Invitrogen*, Karlsruhe) Vektor wurde für die Erzeugung von Entry-Vektoren für die homologe Rekombination (Gateway[®]-System: *Invitrogen*, Karlsruhe) mit anderen Vektoren benutzt.

pGPTV-HPT-Asc

Der Vektor pGPTV-HPT-*Asc* (zur Verfügung gestellt von Wolfgang Werr) ist ein pflanzlicher Expressionsvektor und liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz sowie eine Hygromycin-Resistenz in der transgenen Pflanze. Weitere Informationen finden sich bei Überlacker und Werr (1996).

pGREENnos-BAR und pGREENnos-KAN

Die Vektoren pGREEN*nos-BAR* und pGREEN*nos-KAN* (Margit Grünewald) wurden als pflanzliche Expressionsvektoren verwendet. Der Vektor enthält den Polylinker von pBluescriptSK und liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz und eine BASTA[®]- bzw. Kanamycin-Resistenz in der transgenen Pflanze. Als Helferplasmid wurde pJIC-Sa-Rep (pSoap) verwendet, der eine Plasmidreplikation in *Agrobacterium* ermöglicht. Dieses binäre Vektorensystem wurde vom John Innes Centre, Großbritannien zur Verfügung gestellt. Weitere Informationen sind unter http://www.pgreen.ac.uk sowie in Hellens et al., 2000 zu finden.

pGUS/Bam

Der Vektor pGUS/Bam (Thomas Kirch) wurde als Matrize für die *in vitro*-Transkription einer *GUS-antisense*-RNA-Sonde in der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS+ und einer *GUS*-cDNA, die über die *BamHI*- und *XbaI*-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen. Für die Herstellung einer *GUS-antisense*-RNA-Sonde wurde die *GUS*-cDNA einschließlich der T3-Bindestelle mit den Reverse und Forward (M13) Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und das PCR-Amplifikat als Matrize für die Transkription mit der T3-Polymerase benutzt.

pGWB2

Der pflanzliche Expressionsvektor GWB2 (zu Verfügung gestellt von Tsuyoshi Nakagawa) enthält zwischen einem *CaMV35S*-Promoter und dem Terminator eine Gateway[®]-Kassette (*Invitrogen*, Karlsruhe) und liefert eine bakterielle Kanamycin-Resistenz sowie eine Kanamycin- und Hygromycin-Resistenz in der transgenen Pflanze. Weitere Informationen sind unter tnakagaw@life.shimaneu.ac.jp. zu erhalten. Der pGWB2 wurde verwendet um mittels homologer Rekombination (LR- Reaktion; *Invitrogen*, Karlsruhe) und den Plasmiden pRM_GT_x_51329 die Vektoren 35S::x_CRN (pRM_35S_xC) zu erzeugen.

pMHWUS16

Der Vektor pMHWUS16 (Martin Hobe, Dissertation, 2003) wurde als Matrize für die *in vitro*-Transkription einer *WUS-antisense*-RNA-Sonde in der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS+ und einer 933 bp umfassenden *WUS*-cDNA, die über die *BamHI*- und *EcoRV*-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen. Für die Herstellung der *WUS-Antisense* RNA-Sonde wurde die *WUS*-cDNA einschließlich der T3-Bindestelle mit den Reverse und Forward (M13) Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und das PCR-Amplifikat als Matrize für die Transkription mit der T3-Polymerase benutzt.

pNB3.25

Der Vektor pNB3.25 (Nicole Beinert) wurde als Matrize für die *in vitro*-Transkription einer *CLV3antisense*-RNA-Sonde in der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Er setzt sich aus pBluescriptKS+ und der *CLV3*-cDNA, die über die *BamHI*- und *XbaI*-Schnittstellen des Polylinkers kloniert wurde, zusammen. Für die Herstellung einer *CLV3-antisense*-RNA-Sonde wurde die *CLV3*-cDNA einschließlich der T3-Bindestelle mit den Reverse und Forward (M13) Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und das PCR-Amplifikat als Matrize für die Transkription mit der T3-Polymerase benutzt.

2.1.6 Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Sequenz- und PCR-Reaktionen verschiedene Oligonukleotide synthetisiert bzw. verwendet, die in Tab. 1-5 nach Verwendungszweck untergliedert zusammengefasst sind. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen *Invitrogen*, Karlsruhe und *Sigma*, Darmstadt bezogen.

Tab. 1: Liste der für Klonierungen verwendeten Oligonukleotide

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)	Kommentar	
CRN	RM_C_GT_5	CACCTATGTAAGCTTTGAACAGCTTCA		
CRN	RM_C_3	ATATATTGATGCAACTGCAGATGT	Kionierung der CRN-CDNA	
CRN	RM_C_1B	CCCCGGATCCTAAAGATGCATAGGCTTGCGGACA	Klonierung der genomischen	
CRN	RM_C_2S	CCCCACTAGTCTCGACAAGCTTATTGCTTGATCTGTG	CRN-Region	

Genotyp	Bezeichnung	Sequenz (5´ $ ightarrow$ 3´)	Typ (REnzym)	Mutante (bp)	Wildtyp (bp)
crn	RM_C_5	TATGTAAGCTTTGAACAGCTTCA	CAPS	251 +	337 +
	RM_C_4	TAGGAGAAAACACCACTGGACC	(Hyp188I)	219 + 86	219
clv1-1	RM_CAPS_clv1-1_5	TCCGCCACCGTCACATAG	CAPS	ca. 380	ca. 350
	RM_CAPS_clv1-1_3	AACTAACCTGGGGCGATGTATCCATAAGGG	(Sau96I)		+ 30
clv1-11	RM_CLV1-11w_5_1	TCAAGAACTTAAGAGAAATGTATATTGGCT	PCR		
	RM_CLV1-11w_3	GGCCAAGATTCGCCGGTAAT		-	ca. 430
	RM_RTP-GUS_r	CGAAGCGGGTAGATATCACACTCTGTCTGG		ca. 1300	-
clv2-1	RM_CAPS_clv2-1_5	GATTGCAGATTTCACTCTCTT	CAPS	88 + 31	129
	RM_CAPS_clv2-1_3	CTCTGAATATCAATAAAGAAGCTTTGTCAT	(Ndel)		
c/v3-2	Flor2	CTCACTCAAGCTCATGCTCACG	PCR		
	Flor3	GGGAGCTGAAAGTTGTTTCTTGG		ca. 390	-
	c32x	TATGCGAGGATTATAAATGCC		-	ca. 360
pol-1	RM_CAPS_pol-1_5	TGGAGGGTTAAGTTGGATGC	CAPS	180 + 82	117 + 82
	RM_CAPS_pol-1_3	CTTCATAATCCCAAAGAAGACCT	(Mboll)	(27 + 19)	+ 63 (27 + 19)

Tab.2: Liste der Oligonukleotide bzw. Marker für die Bestimmung von Genotypen

Tab. 3: Liste der Oligonukleotide bzw. Marker die Kartierung

Position in Kb (AGI)	Marker Sequenz $(5' \rightarrow 3')$		Typ (REnzym)	Ler (bp)	Col (bp)
(2) 6400	ciw3	TGAACTTGTTGTGAGCTTTGA	SSLP	200	230
		GAAACTCAATGAAATCCACTT			
(2) 11700	nga1126	GCACAGTCCAAGTCACAACC	SSLP	199	190
		CGCTACGCTTTTCGGTAAAG			
(5) 980	CTR1	CCATTGTTTCTCTCTCTAG	SSLP	143	159
		TATCAACAGAAACGCACCGAG			
(5) 1507	nga225	TCTCCCCACTAGTTTTGTGTCC	SSLP	119	97
		GAAATCCAAATCCCAGAGAGG			
(5) 2770	nga249	GGATCCCTAACTGTAAAATCCC	SSLP	125	115
	-	TACCGTCAATTTCATCGCC			
(5) 4074	T24H18b	TGATAAGTGGGAAAAGAGAAA	SSLP	ungleich	115
		CCCTGTTTTCACTCCTGTAA		-	
(5) 4231	T31B5d	CACCAATGTGATTGGGATAT	CAPS	107 + 74	183
		GACTCTGGCTAGCTGATCAA	(Munl)		
(5) 4255	CA72	CCCAGTCTAACCACGACCAC	SSLP	110	124
		AATCCCAGTAACCAAACACACA			
(5) 4305	T22N19f	TTGGCTTTTGTGTGTCAAAC	CAPS	101 + 50	151
		TATTCGTAAGACATCCCGTG	(Hinfl)		
(5) 4670	nga151	GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG	SSLP	150	120
		CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG			
(5) 5397	nga106	TGCCCCATTTTGTTCTTCTC	SSLP	157	123
		GTTATGGAGTTTCTAGGGCACG			
(5) 5957	PAT1	AGCTGAAGCTCTGCCACC	SSLP	606	706
		CATGCTTCATCATTGCCC			
(5) 7485	ciw8	TAGTGAAACCTTTCTCAGAT	SSLP	135	100
. ,		TTATGTTTTCTTCAATCAATCAGTT			
(5) 14025	PHYC	CTCAGAGAATTCCCAGAAAAATCT	SSLP	207	222
		AAACTCGAGAGTTTTTGTCTAGATC			

Die Marker wurden für die Kartierung von *clf*-18/3 auf Chromosom (2) und von *crn* auf Chromosom (5) verwendet. Die PCR mit den SSLP-Marker wurden nach dem Protokoll von Lukowitz et al. (2000) durchgeführt. Weitere Marker wurden Koizumi et al. (2005) und der TAIR-Datenbank entnommen.

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)
CLV3	RM_RTP-CLV3_f	GTTCAAGGACTTTCCAACCGCAAGATGAT
	RM_RTP-CLV3_r	CCTTCTCTGCTTCTCCATTTGCTCCAACC
endogenes CLV3	RM_C3_5UTR_1	TCTCTCTCACTCAGTCACTTTCTCTCTAA
	RM_C3_5UTR_2	AACAAGAAGCAGAAGAGTAGTAGTAGTAGCA
induziertes (transgenes)	RM_C3_NOS_1a	TGTGAACCCACCAAGACAGC
CLV3	RM_C3_NOS_2a	GAGACTGGTGATTTTTGCGGAC
CRN	RM_RTP-COR_f	GAGTCCTCTCAAAGTAACAGATACACAGA
	RM_RTP-COR_r	TCCGGTTAAAAGAACACCCAAT
CYTb5	RM_RTP-CYTb5_f	CGACACTGCAAGGGACATGA
	RM_RTP-CYTb5_r	ACGTATGTCCTAGTTGCTGGAACA
DRN	RM_DRN f	GACATTGGCTTGGAACGTTTG
	RM_RTP_DRN_r	CTTTGATACCCCCACTCGTTTGATCCC
GUS	RM_RTP_GUS_f	CTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGA
	RM_RTP_GUS_r	CGAAGCGGGTAGATATCACACTCTGTCTGG
WUS	RM_RTP-WUS_f	CCAGCTTCAATAACGGGAATTTAAATCATGCA
	RM_RTP-WUS_r	TCATGTAGCCATTAGAAGCATTAACAACACCACAT

Tab.4: Liste der Oligonukleotide für die quantitative real time-RT-PCR

Tab. 5: Liste der Oligonukleotide für Sequenzierung und Transgennachweis

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)
CLV3	Flor2	CTCACTCAAGCTCATGCTCACG
	Flor3	GGGAGCTGAAAGTTGTTTCTTGG
CRN	RM_C_1	TAAAGATGCATAGGCTTGCGGACA
	RM_C_2	CTCGACAAGCTTATTGCTTGATCTGTG
	RM_C_3	ATATATTGATGCAACTGCAGATGT
	RM_C_4	TAGGAGAAAACACCACTGGACC
	RM_C_5	TATGTAAGCTTTGAACAGCTTCA
	RM_C_6	CGGTAATGCAAATCCTTGTGAC
	RM_C_7	TGATGAATAAAGTTAGAACGAAAGAGGT
	RM_C_8	TCATGAAACAGACGCCAATTCT
	RM_C_9	TTACCTTCCCTCAAGCTCGGT
	RM_C_10	TCATGAGTGGCCGAAAGCA
	RM_C_11	TGCTGCTTCTACGAATAAAAGGTT
	RM_C_12	AATGGAATTCAACTCAAAAATCTTC
	RM_C_13	AGTTGAATTCCATTTTCCTTTTTGTC
	RM_C_14	AGAATTGGCGTCTGTTTCATG
	RM_C_15	TAAGAATCTATGAGCCAATGATATTC
Plasmid	Forward (M13)	GTAAAACGACGGCCAGT
	Reverse (M13)	GGAAACAGCTATGACCATG
BAR	BAR I	CGGTACCGGCAGGCTGAAGTCCA
	BAR II	CCGGGGATCTACCATGAGCCCAGA
T-DNA (SAIL)	RM_SAIL_LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
T-DNA (SALK)	BLLBB1V2	AAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCT

2.1.7 Verwendete Pflanzenlinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ökotypen Columbia (Col), Landsberg *ERECTA*+ (L*ER*+) und Landsberg *erecta* (L*er*) als Wildtypen verwendet. Die mutanten und transgenen *Arabidopsis*-Genotypen sind in Tab.6 bzw. 7 zusammenfassend dargestellt.

Genotyp	Bezugsquelle	Literaturhinweis	Kommentar
clv1-1	Steven E. Clark	Clark et al., 1997	Punktmutation, dominant-negativ
clv1-4	NASC, GB	Clark et al., 1997	Punktmutation, dominant-negativ (nicht identisch)
clv1-11	Steven E. Clark	Diévart et al., 2003	T-DNA Insertion in den LRRs, putatives Null-Allel
clv2-1	NASC, GB	Trotochaud et al., 1999	Stopcodon in den LRRs, putatives Null-Allel
clv3-2	NASC, GB	Fletcher et el., 1999	Inversion, Verlust Teile der CLE Box, putatives Null-Allel
pol-1	Steven E. Clark	Yu et al., 2000	Punktmutation, dominant-negativ
wus-1	Thomas Laux	Mayer et al., 1998	Punktmutation, amorph
wus-4	Martin Hobe	unpubliziert	Punktmutation, amorph

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Mutanten

Tab. 7: Auflistung der verwendeten transgenen Pflanzen

Transgen	Bezugsquelle	Literaturhinweis
35S:: <i>DRN-GR</i> <i>CLV3</i> :: <i>GU</i> S (pBU16)	Thomas Kirch	Kirch et al., 2003
CLV3::ALCR alcA::GUS	Patrick Laufs	Deveaux et al., 2003
CLV3::DRN	Margit Grünewald, Labor intern	Brand et al., 2002
SALK 056806	SALK	-

2.1.8 Programme zur elektronischen Datenverarbeitung

Zur elektronischen Datenverarbeitung wurden die Programme Microsoft Word und Microsoft Excel verwendet. Für die Varianzanalyse der statistischen Daten wurden der Student T-Test bzw. der ANOVA-Test und/oder der parameterfreie Kruskal-Wallis H-Test angewendet. Bei signifikanten Abweichungen zwischen N>2 Gruppen wurde der LSD (Least Significant Difference) Test verwendet, der anzeigt, durch welches Zusammenfassen in neue Untermengen Gruppierungen entstehen, die keine signifikanten Unterschiede mehr aufweisen. Segregationsraten wurden mittels des X²-Tests auf signifikante Abweichungen von der Null-Hypothese untersucht. Für diese Analysen wurde neben Microsoft Excel das Statistikprogramm WINSTAT benutzt. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop bearbeitet. Für Datenbanksuchen wurden die Internet-Ressourcen von *TAIR* (<u>The A</u>rabidopsis <u>Information <u>R</u>essource, http://www.arabidopsis.org), *NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), *TIGR* (http://www.tigr.org/tdb) verwendet. Die Proteinstrukturvorhersagen für die Signalsequenz von *CRN* wurde mit dem Programm SignalP 3.0 (http://www.cb.embnet.org/software/TMPRED form.html) vorgenommen.</u>

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztag (KT; 8 h Licht), Langtag (LT; 16 h Licht) oder Dauerlichtbedingungen (DL; 24 h Licht) in Phytokammern bei einer Temperatur von 22°C angezogen. Teilweise wurden die Pflanzen zur Blühinduktion nach vier, sechs oder acht Wochen von KT nach LT überführt. Des Weiteren wurden einige Pflanzen bei 29°C, LT gehalten. Für die Wurzeluntersuchungen wurden die Samen auf senkrechtstehenden Plant-Agarplatten zum Keimen und nach drei Tagen in einen 45°-Winkel gebracht. Pflanzenschutzmaßnahmen wurden nach Bedarf getroffen.

2.2.2 In planta-Transformation von Arabidopsis thaliana

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte nach einer Standardmethode von Bechtold et al., 1998. Adulte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit einer *Agrobakterium tumefaciens* Suspensionskultur infiltriert. Die abgereiften Samen wurden dann geerntet, zur Keimung gebracht und die transgenen Pflanzen selektioniert.

2.2.3 Kreuzung von Arabidopsis thaliana

Zur Kreuzung wurden die Stamen unreifer Blüten der Pollen-Empfänger-Pflanzen mit einer Pinzette entfernt. Pollen der Donor-Pflanzen wurden auf die Narben der auf die beschriebene Weise zuvor emaskulierten Blüten der Empfänger-Pflanzen gebracht.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Präparation von Plasmid DNA

Plasmid-DNA wurde durch eine alkalische Lyse und anschließende Reinigung über Ionenaustauschchromatographiesäulen präpariert. Hierzu wurden die DNA Mini- und Midi-Kits der Firmen *Qiagen* (Hilden) verwendet. Die Herstellerangaben wurden befolgt.

2.3.1.2 Präparation genomischer DNA

Die Präparation von pflanzlicher genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Delaporta et al., 1983.

2.3.1.3 Präparation von Gesamt-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für cDNA-Klonierungen, RT-PCR-Experimente und *Affymetrix*-Gen-Chip-Hybridisierungen Gesamt-RNA aus Pflanzen isoliert. Die RNA wurde aus in N₂ eingefrorenem Pflanzenmaterial mit Hilfe des RNeasy-Kits präpariert. Bei der Präparation wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die RNA-Qualität wurde mit einem Bioanalyzer 2100 von der Firma *Agilent* analysiert.

2.3.1.4 cDNA-Synthese

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA wurde aus Gesamt-RNA mit Hilfe der *Superscript*™II Reversentranskriptase und Random-Primern von *Invitrogen* synthetisiert. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt.

2.3.1.5 Gelelution von DNA-Fragmenten

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA Fragmenten für die verschiedenen Klonierungen erfolgte über die präparative Gelelektrophorese mit Hilfe des *GFX DNA Purification* Kits der Firma *Amersham* (Braunschweig). PCR-Produkte wurden bei Bedarf ebenfalls mit diesem Kit aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

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

2.3.3 Quantitative *real time* -RT-PCR

Für die RNA-Quantifikation wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA in der cDNA Synthese eingesetzt (siehe auch 2.3.1.3 und 2.3.1.4). Die 20 μ l cDNA-Reaktion wurde 1:75 mit dH₂O verdünnt. Anschließend wurden jeweils 5 μ l für jede RT-PCR-Amplifikation eingesetzt. Die Amplifikationen erfolgten als Triplikate in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l auf einer 96er PCR-Platte. Es wurde der zweifach Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG mit 0,5 μ l ROX dye von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Reaktionen wurden mit dem GeneAmp 5700 Sequenz Detektion System von *Applied Biosystems* durchgeführt. Für alle Proben wurden die cDNAs mit dem Haushaltsgen *Cytochrome B5* Isoform 1 (AT5g53560) normalisiert. Die Berechnung der gemittelten normalisierten

Expression (MNE = mean normalized expression) und deren Standardfehler erfolgte nach Muller et al. (2002).

2.3.4 Affymetrix-Genchip-Hybridisierung

Für die *Affymetrix*-Genchip-Hybridisierung (GeneChip[®] Arabidopsis ATH1) wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA eingesetzt (siehe auch 2.3.1.3 und 2.3.1.4). Die Erststrang- und Zweitstrang-cDNA-Synthese, die *in vitro*-Transkription und die Genchip-Hybridisierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die CEL-Files wurden mit dem Programm RMAexpress (http://rmaexpress.bmbolstad.com) normalisiert. Die Verhältnisse (x) der gemittelten Expressionsrate eines Gens zwischen zwei Zeitpunkten wurden berechnet und anschließend in logarithmierte Werte umgewandelt (-ld (1/x)). Die statistische Auswertung erfolgte mit Exel. Weitere Analysen wurden mit dem Programm MapMan durchgeführt (http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/).

2.3.5 Konstruktion und Herstellung der verschiedenen Plasmide

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

pRMALCL1 (alcA::CLV3)

Um *CLV3* unter Kontrolle des *alcA*-Promotors in der Pflanze zu exprimieren, wurde zunächst aus dem Plasmid pACN_SalI (Rüdiger Simon) die Expressionskassette *alcA*-Promotor_ Ω_{CLV3} _NOS-Terminator mit Hilfe des Enzyms *PstI* in einem Partial-Verdau ausgeschnitten. Die DNA-Bande mit der richtigen Größe wurde nach der Auftrennung im Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (2.3.1.5). Daraufhin wurde die Expressionskassette in den geöffneten pGPTV-HPT-*Asc* kloniert. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pRMALCL1 (*alcA*::*CLV3*) und wurde dann in die transgenen *CLV3*::*ALCR/alcA*::*GUS*-Pflanzen transformiert um die *iCLV3*-Pflanzen zu erhalten.

pRM_GT_L_51329, pRM_GT_C_51329 und pRM_GT_m_51329

Als Matrize für die RT-PCR-Amplifikation der *CRN*-cDNA mit den Oligonukleotiden RM_C_GT_5 und RM_C_3 diente die in cDNA umgeschriebene Gesamt-RNA aus L*er*, Col und *crn*-Pflanzen. Nach der Amplifikation wurden die verschiedenen *CRN*-cDNAs in den pENTRTM-D/TOPO[®] kloniert und die entstandenen Vektoren pRM_GT_x_51329 (**x**: L = L*er*, C = Col, m = mutant) genannt. Der Plasmid pRM_GT_L_51329 wurde für die Herstellung einer *CRN-antisense*-RNA-Sonde verwendet, wobei die *CRN*-cDNA einschließlich der T7-Bindestelle mit den Reverse und Forward (M13) Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und das PCR-Amplifikat als Matrize für die Transkription mit der T7-Polymerase benutzt wurde.

35S::L_CRN, 35S::C_CRN und 35S::m_CRN

Um die zuvor in die Plasmide pRM_GT_x_51329 (x: L = Ler, C = Col, m = mutant) zwischenklonierten *CRN*-cDNAs unter der Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors in Pflanzen zu exprimieren, wurden diese mittels homologer Rekombination (LR-Reaktion; *Invitrogen*, Karlsruhe) in den Vektor pGWB2 überführt. Die entstandenen Plasmide wurden 35S::x_CRN (auch: pRM_35S_xC; x: L = Ler, C = Col, m = mutant) genannt. Mit diesen wurden anschließend *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert.

pCRN (pRM_GII_gCC)

Um *crn*-Mutanten mit der *CRN*-Wildtypkopie zu retten wurde aus dem BAC T31T5 die genomische Region von *CRN* (3,2 Kb) mittels PCR mit den Oligonukleotiden RM_C_1B und RM_C_2S amplifiziert und in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] zwischen kloniert. Durch die Oligonukleotide RM_C_1B und RM_C_2S wurden eine *BamHI*- bzw. eine *SpeI*-Schnittstelle eingeführt. Anschließend wurde aus den entstandenen Plasmid (pRM_gCC) das Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in einen geöffneten pGREEN*nos-BAR* ligiert. Der so entstandene Plasmid wurde p*CRN* (pRM_GII_gCC) genannt. Mit diesem wurden anschließend *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Der Nachweis des Transgens in den Pflanzen erfolgte mittels PCR mit den Oligonukleotiden BAR I und BAR II (BASTA[®]-Resistenzgen).

2.4 Zytologische und Histologische Techniken

2.4.1 Präparation von Keimlingen für die Mikroskopie

Die Keimlinge wurden in einer Ethanolreihe (50%, 70%, 85%, 100%) entfärbt und über Ethanol /Rotihistol (1:1) und Rotihistol in Immersionsöl überführt.

2.4.2 Nicht-radioaktive-RNA-in situ Hybridisierung

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

des *InSituPro VS* Roboters (*Intavis*, Köln) durchgeführt. Für die *in vitro*-Transkription der Sonden wurden folgende Plasmide verwendet: *CLV3*-Sonde: pNB3.25 (N. Beinert); *WUS*-Sonde: pMHwus (M. Hobe); *GUS*-Sonde: pGUS/Bam (T. Kirch). Alle genannten Vektoren sind Derivate von pBluescriptKS+. Für die *CRN*-Sonde wurde der Entry-Vektor pRM_GT_L_51329 verwendet.

2.4.3 In situ-β-Glukuronidase Färbereaktionen (GUS-Färbung)

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

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

2.5 Mikroskopische Techniken

2.5.1 Nomarsky-Mikroskopie

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

2.5.2 Konfokale-Mikroskopie

Für die Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop wurden die *Arabidopsis*-Wurzeln einer Propidiumjodid-Färbung unterzogen. Die Färbung wurde nach dem Protokoll von Running et al., 1995 durchgeführt. Propidiumjodid lagert sich im Zellkern und in den Zellwänden der Pflanzen an und fluoresziert nach Anregung durch geeignete Laser, so dass die zellulären Strukturen gut visualisiert werden können. Die Aufnahmen wurden an einem *Laser Scan* Mikroskop (LSM 510 META^{MK4}) der Firma Zeiss (*Carl Zeiss*, Jena) mit Hilfe der zugehörigen Software angefertigt.

2.5.3 Rasterelektronen-Mikroskopie

Um Meristeme mit dem Rasterelektronen-Mikroskop zu untersuchen wurden nach dem Protokoll von Kwiatkowska (2004) Meristemabdrücke genommen. Die Aufnahmen wurden mit dem Rasterelektronen-Mikroskop LEO der Firma Zeiss (*Carl Zeiss*, Jena) mit Hilfe der zugehörigen Software angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle von DORNRÖSCHEN in der Meristementwicklung

Die induzierte Überexpression des putativen Transkriptionsfaktors *DORNRÖSCHEN (DRN)* bewirkt eine radikale Umorganisation des Sprossmeristems, die schließlich zum Arrest des Meristem führt. Diese Umorganisation betrifft sowohl die Morphologie der Zellen, wie auch die Expression von Genen, die in der Aufrechterhaltung der Stammzellenpopulation involviert sind (Kirch et al., 2003). Bisher ist jedoch die Dynamik der durch die *DRN*-Fehlexpression hervorgerufenen Umgestaltung des Meristems unverstanden. So sind die direkten Zielgene von *DRN* nicht bekannt. Ferner ist ungeklärt, ob die Verschiebung der Expressionsdomänen eine Folge der veränderten Morphologie ist, oder diese bewirkt.

Ziel der hier vorgestellten Experimente war es, einen möglicherweise direkten Zusammenhang zwischen *DRN* und den Regulatoren des Stammzellschicksals *CLV3* und *WUS* zu untersuchen und weitere direkte und indirekte *DRN*-Zielgene zu identifizieren.

3.1.1 Konsequenzen der induzierten DRN-Expression für das Pflanzenwachstum

Für die induzierbare Überexpression von *DRN* wurde das in Kirch et al. (2003) beschriebene *CaMV35S::DRN-GR (DRN-GR)* Transgen verwendet. Das durch den *CaMV35S*-Promotor ubiquitär exprimierte DRN-Protein, das mit der Hormonbindungsdomäne des Glucocorticoidrezeptors (GR) aus Ratte fusioniert ist, wird von der GR-Domäne im Cytosol festgehalten (Lloyd et al., 1994). Nach der Induktion mit Dexamethason (DEX) kann das Fusionsprotein in den Zellkern gelangen und an die Promotoren der *DRN*-Zielgene binden.

Die *DRN-GR*-Pflanzen wurden sieben bis zehn Tage nach Keimung (TnK) mit DEX behandelt (Abb.2A). Bei der einmaligen Induktion konnte in der weiteren Entwicklung, bis auf eine leichte aber signifikante (p = 0,002) Reduzierung der Rosettenblattanzahl, keine Defekte beobachtet werden (Abb.2E und ohne Abb.). Die Reduktion der Blattanzahl könnte auf einer kurzfristigen Störung bei der Anlage neuer Organprimordien an den Flanken des Meristems beruhen. Nach einer Woche kontinuierlicher DEX-Induktion sind die *DRN-GR*-Pflanzen deutlich kleiner als die Kontrollpflanzen, da weniger Blätter ausgewachsen sind (Abb.2B-D). Zudem zeigen die angelegten Blätter ebenfalls reduziertes Wachstum und sind wie die Kotyledonen dicker und versteifter. Das Fehlen der jüngeren Blätter lässt sich entweder dadurch erklären, dass sie nicht angelegt und/oder dass sie stark im Wachstum gehemmt wurden. Die Hauptursache ist vermutlich in der starken Hemmung des
Wachstums begründet, die ebenfalls bei den in *CLV3::DRN*-Pflanzen weitgehend normal angelegten Organprimordien zu beobachten ist (Kirch et al., 2003).

Nach drei Wochen kontinuierlicher Induktion sind bei den *DRN-GR*-Pflanzen nur wenige weitere Blätter ausgewachsen. Im Gegensatz zu gleich alten Kontrollpflanzen (ohne Abb.) haben sich bei den *DRN-GR*-Pflanzen keine Infloreszenzen ausgebildet (Abb.2M,Q). Wird die Induktion unterbrochen, können bereits angelegte Blüten innerhalb einer Woche auswachsen (Abb.2N,O). Neue Blüten entstehen dagegen nicht (Abb.2S). Auch vor der Induktion angelegte Internodien können sich verlängern (Abb.2P). Die Sprossmeristeme bleiben dagegen terminiert (Abb.2P,R,S). Sie unterscheiden sich deutlich von den terminierten Sprossmeristemen in *iCLV3*-Pflanzen, bei denen es durch die induzierte Erhöhung der *CLV3*-Expression zum Verlust der *WUS*-Expression kommt, die zur Ausdifferenzierung und somit auch zur Zellstreckung der Meristemzellen führt (3.2.1; Fig.1I, Müller et al., 2006). Bei den terminierten *DRN-GR*-Meristemen kommt es dagegen zu keiner Zellsteckung, so dass sich keine Lücke zwischen den an ihren Flanken ausgewachsenen Blüten bildet (Abb.2R). In soweit wirken die Induktion von *CLV3* und *DRN* antagonistisch auf die Zellstreckung meristematischer Zellen.

Auch die Morphologie der Blätter ist stark durch die *DRN*-Induktion verändert. Bei einigen Rosettenblättern hat sich die Adaxial/Abaxial-Polarität umgedreht (Abb.2S). Nach der Unterbrechung der Induktion wachsen die Petiolen der Rosettenblätter blattartig aus (Abb.2T). Ebenso kommt es zum Auswachsen der Stipeln, die normalerweise bei *Arabidopsis* stark reduziert sind (Abb.2T). Ein Vergleich mit der durch die *DRN*-Überexpression veränderten Morphologie der *drn-D*-Sprossmeristeme, in denen viele kleine Zellen akkumulieren (Kirch et al., 2003), könnte eine mögliche Erklärung liefern. Demnach würde *DRN* unabhängig vom meristematischen Kontext die Zellstreckung inhibieren, jedoch nicht die Zellteilung. Da die sich weiterteilenden Zellen nicht ausdifferenzieren können, akkumulieren diese. Somit könnten in den Petiolen und Stipeln der induzierten *DRN-GR*-Pflanzen ebenfalls Zellen akkumulieren, die sich erst nach dem Wegfall des *DRN*-Signals strecken können. Bei längerer Induktionsunterbrechung können sich jedoch wieder normale Sprosse bilden (Abb.2U,V). Dabei ist jedoch unklar, ob sich dabei die terminierten Sprossmeristeme restauriert haben oder Adventivmeristeme angelegt wurden.

Wird *DRN* erst nach der Sichtbarwerdung der ersten Blüten induziert, kommt es ebenfalls zur Inhibition der Zellstreckung, die sich in der reduzierten Internodienstreckung manifestiert (Abb.2W). Darüber hinaus bewirkt *DRN*-Induktion die Sterilität der Blüten und verminderte Abszission der äuβeren Blütenorgane (Abb.2W).

DRN wird im Wildtyp nicht in den adulten Organen exprimiert. Dennoch gibt es große Gemeinsamkeiten zwischen den durch die ubiquitär induzierte *DRN*-Expression innerhalb und außerhalb des Meristems hervorgerufenen Defekten. Zusammengefasst lassen sich die meisten Defekte mit der Inhibition von Zellstreckung erklären, durch die sich weiterteilende Zellen in einen undiffenzierten Zustand gehalten werden und dadurch akkumulieren.

Zellstreckung unterliegt normalerweise der Kontrolle durch Phytohormone. In *drn-D*-Mutanten sind *WUS* und *STM* in den veränderten Sprossmeristemen verstärkt exprimiert (Kirch et al., 2003). Beide Gene stehen mit Phytohormon-Signalwegen in Verbindung. So bildet *WUS* mit einigen *ARR*-Genen, Bestandteilen des Cytokinin (CK) Signalwegs, einen negativen Rückkopplungskreis (1.2.1; Leibfried et al., 2005). Dagegen aktiviert STM indirekt die Expression von *ARR5*, über die Akkumulation von CK im Meristem und wirkt negativ auf den Gibberellin-Signalweg (Hay et al., 2002; Janai et al., 2005; Jasiniki et al., 2005). Da *WUS* und *STM* weitgehend nur im Meristem fehlreguliert werden (Kirch et al., 2003), kann dies nicht die Effekte in den nicht-meristematischen Geweben erklären, zumal sich die induzierte Überexpression von *DRN*, *STM* und *WUS*, trotz einiger Gemeinsamkeiten wie nach unten oder seitlich verdrehte Blätter, in unterschiedlichen Phänotypen manifestiert (Abb.2B,C,F,G). Somit verwunderte es nicht, dass in induzierten *DRN-GR*-Pflanzen die Komponenten weiterer Phytohormon-Signalwege missreguliert sind (3.1.3).

3. Ergebnisse



Abb.2: Konsequenzen der Fehlexpression von *DRN* für die Pflanzenmorphologie und die *CLV3*-Expression. (A) Uninduzierte transgene *CaMV35S*::*DRN-GR*-Pflanze (*DRN-GR*), 1 WnK. (B) Nach einer Woche kontinuierlicher Induktion (2 WnK, 1 WnI) haben die *DRN-GR*-Pflanzen weniger und deutlich kleinere und dunklere Blätter ausgebildet (C) Induzierte *DRN-GR*-Pflanzen mit leicht nach unten (Pfeilspitze) oder seitlich verdrehten Blättern, 2 WnK, 1 WnI. (D) Uninduzierte *DRN-GR*-Kontrollpflanze, 2 WnK. (E) Die einmalige Induktion von *DRN-GR* (1 WnK) bewirkt eine signifikante (p = 0,002) Verringerung der durchschnittlichen Rosettenblattanzahl. (F,G) *WUS-GR*- und *STM-GR*-

Pflanzen, 2 WnK, 1 WnI. Pfeilspitze: Nach unten verdrehte Blätter. (H) CLV3-Expression in den stark vergrößerten und umgeformten Infloreszenzmeristem von CLV3::DRN-Pflanzen, 4 WnK. (I) CLV3-Expression (CLV3::GUS) in uninduzierten DRN-GR-Pflanzen, 2 WnK. (J) Nach einer Woche kontinuierlicher DRN-Induktion ist die CLV3-Domäne vergrößert, 2 WnK 1 WnI. (K) CLV3-Expression im uninduziertem DRN-GR-Infloreszenzmeristem, 5 WnK. (L) Ein Tag nach der DRN-Induktion ist keine Veränderung der CLV3-Expressionsdomäne zu erkennen. (M) 4 WnK, 3 WnI. Im Gegensatz zu gleich alten Kontrollpflanzen (ohne Abb.) hat sich keine Infloreszenz ausgebildet. Bei den folgenden Pflanzen (N-V) wurde die Induktion nach drei Wochen beendet: (N,O) Eine Woche nach Induktionsende können bereits angelegte Blüten auswachsen. Das Infloreszenzmeristem bleibt jedoch häufig terminiert, 5 WnK, 4 WnI. (P) 6 WnK 5 WnI, teilweise wachsen Infloreszenzen aus, die jedoch in filamentösen Strukturen terminieren (Peilspitze, Kasten). (Q) Nahaufnahme von M. (R) Nahaufnahme von (N). Zwischen den an den Flanken des terminierten Infloreszenzmeristems gebildeten Pedicels besteht keine Lücke (Pfeilspitze). (S) Im Rosettenstadium terminiertes SAM (Pfeilspitze), 5 WnK, 4 WnI. Einige an seinen Flanken gebildeten Blätter haben eine umgekehrte adaxial/abaxial Polarität (*). (T) Viele Petiolen sind blattartig verbreitert. An ihrer Basis sind die Stipeln fingerartig ausgewachsen. (U) DRN-GR-Pflanze mit einer in einem tassenförmigen Hochblatt terminierten Sprossachse, 5 Wnl. 4 Wnl. (V) Drei Wochen nach der letzten Induktion wuchs ein normaler Spross an der Position des temporär terminierten Meristems aus, 8 WnK, 7 Wnl. (W) Die Induktion von DRN nach der Bildung der ersten Blüten inhibiert die Internodienstreckung der Sprossachse und bewirkt Sterilität, 5 WnK, 2 WnI. (X) Seneszenzexperiment: Nach einer Woche im Dunkeln sind die Blätter von induzierten DRN-GR-Pflanzen (ind) grüner als die der uninduzierten Kontrollen (uni). Maßstab: A-D,F,G,M-X = 5 mm; H-L = 50 μ m.

3.1.2 Konsequenzen der Missexpression von DRN für die CLV3-Expression

Durch die kontinuierliche *DRN*-Überexpression in *drn-D*-Mutanten ist *CLV3* verstärkt exprimiert, jedoch hat sich seine Expressionsdomäne durch die morphologische Umgestaltung des Meristems in tiefere Schichten verlagert (Kirch et al., 2003). Daher könnte die Veränderung der *CLV3*-Expression auch indirekt auf dem Umbau des Meristems beruhen. Im Wildtyp überdecken sich die Expressionsmuster von *CLV3* und *DRN* weitgehend und somit ist *DRN* einer der wenigen bekannten Transkriptionsfaktoren, die durch ihr eigenes Expressionsmuster das von *CLV3* festlegen könnten. Interessanterweise werden *DRN* und *CLV3* auch in den *drn-D*-Mutanten in der gleichen verschobenen Domäne exprimiert (Kirch et al., 2003). Dennoch wurde bisher nicht untersucht, ob *DRN* schon vor den morphologischen Veränderungen eine positive Wirkung auf die *CLV3*-Expression hat.

Nach einer Woche kontinuierlicher *DRN*-Induktion in Keimlingen ist die durch das *CLV3::GUS*-Transgen ermittelte *CLV3*-Expression im Vergleich zu den uninduzierten Kontrollen um das zwei- bis dreifache verstärkt (n > 10; Abb.2I,J). Mittels der RT-PCR lässt sich bereits nach sechs Stunden nach Induktionsbeginn (HnI) eine Versiebenfachung der *CLV3::GUS*-Expression nachweisen (Abb.3C). Dass im gleichen Zeitraum beim endogenen *CLV3* nur eine Verdreifachung zu beobachten ist, könnte sich aus der geringeren Stabilität der *CLV3*-mRNA erklären. Entgegen dem Modell der negativen Rückkopplung von *CLV3* und *WUS* wird auch *WUS* nach sechs Stunden stärker exprimiert, obwohl es durch die erhöhte *CLV3*-Expression reprimiert werden sollte (Abb2.C). Das zeigt, dass *WUS* auch wider die Repression durch den *CLV3*-Signalweg aktiviert werden kann (siehe hier zu auch 3.2.1 und 3.2.2). Einen Tag nach Induktionsbeginn (TnI) hat sich das Expressionsmuster von *CLV3* im Sprossmeristem auf zellulärer Ebene nicht verändert (Abb.2K,L). Das zeigt, dass die ubiquitär induzierte *DRN*-Überexpression die *CLV3*-Expression nur in den Stammzellen aktivieren kann, was eine Erklärung für die nur geringe Erhöhung der *CLV3*-Expression ist. Daher benötigt *DRN* vermutlich weitere, stammzellenspezifische Faktoren für die Kontrolle von *CLV3*. Die funktionelle Dimerbildung mit den Mitgliedern der Klasse III HD-ZIP-Familie (Chandler et al., 2007) kann nicht der limitierende Faktor sein, da diese auch außerhalb der Stammzellen exprimiert werden (Williams et al., 2005). Die kontinuierliche Missexpression von *DRN* in den Stammzellen (*CLV3::DRN*) bewirkt einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die ubiquitäre Überexpression. In *CLV3::DRN*-Sprossmeristemen kommt es ebenfalls zu einer Verlagerung der vergrößerten *CLV3*-Expressionsdomäne in tiefere Regionen, wie sie in *drn-D*-Mutanten zu beobachten ist (Abb.2H). Vermutlich verschiebt sich die endogene *DRN*-Domäne ebenfalls vergleichbar. Sollte dies zutreffen, würde das die Annahme der Abhängigkeit des *CLV3*-Expressionsmusters von dem Expressionsmuster von *DRN* unterstützen.



Abb.3: Bildlegende nächste Seite.

Abb.3: Konsequenzen der Induktion von *DRN* für die Phytohormon-Signalwege und die Expression von *CLV3*, *WUS* und den *CUC*-Genen. (A,B) Genchip-Daten. Der prozentuale Anteil der fehlexprimierten Komponenten ist bei der Jasmonsäure deutlich höher als bei den anderen Phytohormon-Signalwegen. Nur bei dem Jasmonsäure-Signalweg sind mehrere in die Synthese involvierte Enzyme schwächer exprimiert (B). Anmerkung: Die Farbskalen von (A) und (B) unterscheiden sich. Analyseprogramm: MapMan. (C) Die Induktion von *DRN* bewirkt innerhalb von sechs Stunden einen leichten Anstieg der Expression von *CLV3* und *WUS*. (D) Die Fehlexpression von *DRN* bewirkt einen starken und raschen Anstieg der Expression von *CUC1* und *CUC3*, jedoch nicht von *CUC2*. Die Zunahme der Expression von dem *NAM-like* (At1g02220) erfolgt langsamer. Die Expression von *NAP* schwankt ohne ein erkennbares Muster und könnte daher unabhängig von *DRN* sein. (C,D): *real time*-RT-PCR. MNE %: Normalisierte gemittelte Expression in Prozent. Normalisiert wurde mit dem Haushaltsgen *Cytochrom b5*.

3.1.3 *DRN* aktiviert die Expression von CUC- und einigen ERF-Transkriptionsfaktoren, aber inhibiert die Synthese des Phytohormons Jasmonsäure

Die durch die Überexpression von *DRN* verursachte Inhibition von Zellstreckung könnte ihre Ursache in der Missregulation von Phytohormonen haben (3.1.1; Kirch et al., 2003). Andererseits könnten die von *DRN-GR* bewirkten Defekte auch von der Missregulation Phytohormon-unabhängiger Gene verursacht werden. Daher sollten durch die Verwendung von *Affymetrix* Gen-Chips die Zielgene von *DRN* ermittelt werden. Dazu wurden unter Langtag (LT) aufgezogene *DRN-GR*-Pflanzen zehn TnK einmalig mit DEX induziert.

Das vor der Induktion und ein und drei Tage danach geerntete Pflanzenmaterial wurde weitgehend von den Blättern und dem Hypocotyl einschließlich der Wurzel befreit. Es wurden jeweils zwei Genchips pro Zeitpunkt hybridisiert. Die Chipdaten (CEL-Files) wurden mit dem Programm RNAexpress normalisiert und die Verhältnisse (x) der gemittelten Expressionsrate eines Gens zwischen zwei Zeitpunkten berechnet und anschließend in logarithmierte Werte umgewandelt (-ld (1/x)). Ab einer Verdopplung der Expressionsrate ($\geq 1,0$) zwischen zwei Zeitpunkten spricht man von einer robusten Hochregulation eines Gens, ab einer Halbierung ($\leq -1,0$) von einer robusten Abregulation. In dieser Arbeit wird zudem ab $\geq 0,5$ bzw. $\leq -0,5$ von semirobust regulierten Genen geredet.

Ein TnI waren 31 Gene robust hochreguliert und 44 robust abreguliert. Diese Gene wurden nach Kategorien geordnet und gegebenenfalls durch semirobust regulierte Gene ergänzt, wenn diese durch Homologie oder anderen Kriterien (z.B. gleicher Phytohormon-Signalweg) in die gleiche Kategorie gehören (Liste1). Von den 51 direkten Zielgenen von *DRNL* (Ikeda et al., 2006), wurden von *DRN* nur vier robust und sieben semirobust hochreguliert (Liste1a, At-Nummer fettgedruckt). Das spricht für eine nur partielle Überschneidung der Zielgene von *DRN* und DRNL. Andererseits wurden verschiedene Pflanzenmaterialen in beiden Versuchen verwendet (*DRNL*: Wurzelexplantate; *DRN*; Spross- und Blütenmeristeme), so dass ein Großteil der Unterschiede vermutlich auf die An- bzw. Abwesendheit von benötigten Co-Faktoren beruht (Chandler et al., 2007).

Die Konzentrationen der cRNAs von *CLV3* und *WUS* waren im *DRN-GR*-Genchip-Experiment unterhalb der Nachweisgrenze. Unabhängig davon wäre der durch die RT-PCR ermittelte leichte Anstieg der Expression der beiden Gene (3.2.1; Abb.3C) vermutlich nicht mittels der Genchip detektierbar. Auch die Expression von *STM* zeigte keine Veränderung (Daten nicht gezeigt).

Unter den 31 nach einem TnI hochregulierten Genen befinden sich fünf Transkriptionsfaktoren. Unter diesen befand sich CUC3, einem bekannten Regulator meristematischer Entwicklung und ein weiterer mit NO APICAL MERISTEM (NAM) verwandter Transkriptionsfaktor At1g02220 (Liste1a; 1.3.2). Um die Genchip-Daten zu überprüfen, wurden die Effekte der DRN-Induktion auf die Expression der drei CUC Gene, At1g02220 (NAM-like) und NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI (NAP), einen weiteren zuvor semirobust erhöhten NAM, mittels RT-PCR untersucht (Abb.3D). In diesem Experiment wurden die cDNAs verwendet, mit denen zuvor die Auswirkungen der DRN-Induktion auf die Expression von CLV3 und WUS untersucht wurden. Bereits sechs Stunden nach DRN-Induktion sind CUC1 und CUC3 stark hochreguliert, jedoch nicht CUC2 (Abb.3D). Die Erhöhung der CUCI-Expression steht im Widerspruch zu den Genchip-Daten und zeigt erneut, dass diese nicht alle Veränderungen der Genexpression erfassen konnten. Die Induktion von DRNL führt ebenfalls zur raschen und direkten Erhöhung der CUCI-Expression, aber nicht der von CUC2 (Ikeda et al., 2006). drn/drnl- und cuc-Doppelmutanten haben ähnliche Phänotypen, zu denen auch die Fusion von Kotyledonen und das Fehlen des Sprossmeristems gehört (Aida et al., 1997; Vroemen et al., 2004; Chandler et al., 2007). Somit könnte die CUC1- und vermutlich auch die CUC3-Expression abhängig von DRN und DRNL sein. Da drn- bzw. drnl-Einzelmutanten schwächere Defekte in der Embryonalentwicklung zeigen, wirken beide Gene partiell redundant (Chandler et al., 2007). Das wird nun dadurch bestätigt, dass die alleinige Überexpression von DRN oder DRNL CUC1 aktivieren kann (s.o. und Ikeda et al., 2006). Auch die Expression von At1g02220 (NAM), dessen Funktion unbekannt ist, wird durch die DRN-Induktion stark erhöht (Abb.3D). Für die NAP-Expression konnte dagegen keine Korrelation mit der erhöhten DRN-Expression festgestellt werden (Abb.3D).

Mit 44 Genen überwiegt der Anteil der robust abregulierten gegenüber 31 robust hochregulierten Gene (Liste1). Das überrascht, da es sich bei *DRN* vermutlich um einen Aktivator handelt (1.3.3; Lorenzo Borghi, Dissertation, 2005). Eine mögliche Erklärung für die Abregulation so vieler Gene könnte in der Hochregulation dreier <u>E</u>THYLENE <u>R</u>ESPONSIVE ELEMENT BINDING <u>F</u>ACTOR (ERF) Klasse II Transkriptionsfaktoren sein (ein Gen robust und zwei semirobust; Liste1a), die eine EAR-Repessordomäne besitzen (Ohta et al., 2001). Andererseits könnten auch viele der Gene durch die Abnahme des Jasmonsäure (JA) Signals abreguliert sein, falls sie Zielgene dieses Signalwegs sind (s.u.). Unter den semirobust abregulierten befinden sich auch drei *ERF*-Gene, einschlieβlich *ERF1* (Daten nicht gezeigt), dass auch unabhängig von Ethylen durch JA aktiviert werden kann (Lorenzo et al., 2003). Somit bewirkt die *DRN*-Induktion sowohl die Hoch- wie auch Abregulation von *ERF*-Gene.

Von insgesamt 75 robust durch die DRN-Induktion regulierten Genen lassen sich 19 (25%) eindeutig Phytohormon-Signalwegen zuordnen, wovon wiederum ungefähr die Hälfte Komponenten oder Zielgene der Jasmonsäure (JA) sind (neun Gene; Listelb). Zu den fünf robust abregulierten Zielgenen des JA-Signalwegs, gehört auch das von der Abregulation am stärksten betroffene Gen (TAT3). Auch in der Übersicht der verschieden Phytohormon-Signalwege wird deutlich, dass der JA-Signalweg prozentual am stärksten missreguliert ist (Abb.3A). Zudem ist bei dem JA-Signalweg ein Großteil der Syntheseenzyme abreguliert, so dass vermutlich die JA-Konzentration in induzierten DRN-GR-Pflanzen stark verringert ist. Dies könnte die Mehrzahl der von DRN hervorgerufene Defekte, insbesondere der reduzierten Zellstreckung erklären, da JA den gegenteiligen Effekt auf Pflanzenzellen hat. Die Behandlung von Solanum tuberosum Pflanzen (Kartoffel) mit niedrigen JA-Konzentrationen bewirkt Zellstreckung in Blättern und Internodien, die dadurch stark vergrößert sind (Ulleo et al., 2002). Durch die JA-Behandlung differenzieren sich die Zellen der Solanum tuberosum Sprossmeristeme, so dass sie keine Primordien mehr bilden können und es schließlich zum Meristemarrest kommt (Cenzano et al., 2003). Ein weiteres Indiz für die Abregulation von JA ist die Sterilität der während der DRN-Induktion produzierten Blüten (Abb.2W), die vermutlich auch auf die verminderten Dehiszenz (Aufplatzen) der Stamen beruht (ohne Abb.). Dieser Phänotyp ist auch bei Mutanten der in die JA-Biosynthese involvierten Gene zu beobachten, der durch die Zuführung von JA gerettet werden kann (Sanders et al., 2000). JA fördert Seneszenz, einschließlich des Chlorophyllverlusts (Parthier, 1990; He et al., 2002). Die Genchip-Daten liefern jedoch kein klares Bild, da sowohl ein Seneszenz-assoziiertes Gen robust hoch-, wie auch eins robust und eins semirobust abreguliert wurde (Listela,b). Deshalb wurden die abgeschnittenen Blätter von induzierten und uninduzierten DRN-GR-Pflanzen in Dunkelheit auf feuchtem Papier gehalten. Die induzierten DRN-GR-Blätter waren nach einer Woche noch deutlich grün, wogegen die uninduzierten komplett etioliert waren (Abb.2X). Auch diese Beobachtung passt zu der Annahme, dass in induzierten DRN-GR-Pflanzen die JA-Konzentration reduziert ist.

Ferner sind weitere in der Zellstreckung involvierte Gene durch die *DRN*-Induktion abreguliert. Das von den wachstumsfördernden Phytohormonen Auxin (IAA) und Gibberillin (GA) induzierbare *MERI-5* gehört zu der <u>Xyloglucan-Endot</u>ransglucosylase/<u>Hydrolase/Transferase</u> (XTH auch XET, XTR oder EXT) Familie, die durch die Lockerung der Hemizellulose (Xyloglucan) in der Zellwand Zellstreckung ermöglicht (Liste1b; Xu et al., 1996; Müssig et al., 2002). Interessanterweise wird *MERI-5* ausschließlich in den Spross- und Blütenmeristemen, jedoch nicht in Blattprimordien exprimiert (Medford et al., 1991). Weitere in den Kohlehydrat-Metabolismus (Liste1b) involvierte Gene sind ebenfalls durch *DRN-GR* abreguliert (drei robust und 17 semi-robust). Darunter befinden weitere Glycosylhydrolasen und Glycosyltransferasen, die in die Lockerung der Zellwand und/oder in den Aufbau ihrer Polysaccaride (Xyloglucane, Galacturonane und Galactane) involviert sind. Die Gene sind jedoch nicht ausreichend charakterisiert um zu entscheiden, ob sie alle an einem dieser Prozesse bzw. an beiden beteiligt sind. Die Abregulation der Zellwandenzyme könnte eine indirekte Folge der verminderten Zellstreckung sein oder ebenso diese erst bewirken. Einige Mitglieder der Genklasse der Expansine sind gleichfalls durch die *DRN*-Induktion abreguliert (ein Gen robust und zwei semirobust, Liste1b). Darunter befinden sich *EXPL1* und *EXPL2*. Expansine bewirken direkt, im Gegensatz zu den *XTH*-Genen, die Lockerung der Zellwand durch Auflösung der Wasserstoffbrücken zwischen Zellulose und Glucane (McQueen-Mason et al., 1992; McQueen-Mason und Cosgrove, 2000). Dennoch verwundert es, dass von den 38 Expansinen im *Arabidopsis*-Genom (Li et al., 2002) nur drei abreguliert wurden.

Da die in diesem Kapitel präsentierten Daten weitgehend nur auf Affymetrix-Genchips beruhen und noch nicht durch weitere Experimente abgesichert wurden, unterliegt ihre Interpretation größtenteils der Spekulation. Die durch DRN-Induktion erhöhte CUC1- und CUC3-Expression kann jedoch in einen Kontext mit aktuellen Veröffentlichungen gebracht werden (Ikeda et al., 2006; Chandler et al., 2007). Die publizierten und die in dieser Arbeit präsentierten Daten legen nahe, dass die partiell redundanten Transkriptionsfaktoren DRN und DRNL direkt die Expression von CUC1 und CUC3 kontrollieren. Vermutlich kommt dies in der Normal-Entwicklung nur in der frühen Embryogenese zum tragen, da sich nur zu diesem Zeitpunkt die Expressionsdomänen der vier Gene überschneiden (Aida et al., 1997; Kirch et al., 2003; Vroemen et al., 2004; Ikeda et al., 2006). Die von der DRN-Überexpression hervorgerufenen morphologischen Defekte innerhalb und außerhalb des Meristems beruhen vermutlich gröβtenteils auf verminderter Zellstreckung (3.1.1; Kirch et al., 2003). Diese wird wahrscheinlich durch die Abregulation der JA-Synthese verursacht, da JA in niedrigen Konzentrationen Zellstreckung fördert. Auch eine Reihe von anderen Genen, die die Zellstreckung fördern und somit Zielgene der JA sein könnten, sind durch die DRN-Induktion abreguliert. Folglich könnte die JA eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von meristematischen Zellen spielen, die in der zentralen Zone durch DRN und eventuell von DRNL inhibiert werden. DRN würde somit dazu beitragen, die Stammzellpopulation in Spross- und Blütenmeristemen zu erhalten.

Liste 1a: Robust hochregulierte Gene

Cuto	kinin C	lianak	
18	1.0	1_3	Atta80100 (AHP6 / Cytokinin-Signalinhibitor)
24.	1.0	0.8	At1q80050 (APT2 / Phosphoribosvltransferase)
	.,•	0,0	
Ethyl	len-Sig	nalwe	g / ERF-Transkriptionsfaktoren
14.	1,2	1,1	At4g37580 (N-Acetyltransferase)
29.	1,0	0,8	At5g44210 (EFR9)
55.	0,8	0,7	At5g25190 (EFR-like)
70.	0,8	0,7	At1g53170 (EFR8)
			-
Salic	ylsäur	e-Sign	alweg
10.	1,3	0,9	At5g56300 (S-Adenosyl-L-Methionin:Carboxyl-
			Methyltransferase)
NAM	-like -T	ransk	riptionfaktoren
4.	1,8	1,7	At1g02220 (<i>NAM-like</i>)
31.	1,0	0,9	At1g76420 (CUC3)
123.	0,6	0,8	At1g69490 (NAP)
Weite	ere Tra	inskrip	ntionsfaktoren
5.	1,6	1,5	At1g01030 (RAV1-like Transkriptionsfaktor)
21.	1,0	1,2	At2g21650 (MYB - Transkriptionsfaktor)
108.	0,7	0,6	At3g50410 (OBP1)
-			
Sene	szenz	assoz	At5a65040 (Senergenz associiantes Bratein)
19.	1,0	1,1	Alogoou40 (Serieszenz-assoziiertes Protein)
	2.0	erprote 2 2	Δt3α18280 (LTP)
12	2,0	2,2	Δt4α12480 (LTP)
27	1,2	0,9	At4a12470 (LTP)
69	0.8	0,7	At5a59320 (LTP3)
00.	0,0	0,3	///////////////////////////////////////
Sons	tino		
3	1.8	19	At5g62360 (Pectinesterase)
6	1.4	1.5	At3q23550 (MATE-Effluxprotein)
7	1.4	1.1	At1g08800 (IFA-bindendes Protein)
8.	1.4	1.3	At2g39510 (Nodulin)
9.	1.3	1.0	At1g61810 (Glycosylhydrolase)
11.	1.2	1.3	At4q08780 (Peroxidase)
12.	1.2	1.4	At4q17340 (MIP-Transporter)
16.	1,2	1,1	At1g55200 (Proteinkinase)
17.	1,1	1,2	At1g02860 (Peroxidase / PEROXIN2-like)
20.	1,0	0,9	At4g01430 (Nodulin)
22.	1,0	0,8	At1g21890 (Nodulin)
23.	1,0	1,2	At3g49620 (<i>DIN11 /</i> Oxidoreductase)
25.	1,0	0,9	At1g59740 (Oligopeptid-Transporter)
26.	1,0	0,9	At1g07610 (<i>MT1C</i>)
28.	1,0	1,2	At3g50970 (XERO2 / Dehydrin)
42.	0,9	0,9	At4g28560 (Proteinkinase / LRR-Rezeptor)
45.	0,9	0,8	At3g54820 (Aquaporin-Transporter)
46.	0,9	1,0	At1g71880 (SUC1 / Sucrosetransporter)
61.	0,8	0,4	At5g09970 (CYP78A7, Cytochrome P450)
63.	0,8	0,9	At5g17700 (MATE-Effluxprotein)
72.	0,8	0,8	At5g10520 (Proteinkinase)
79.	0,7	0,7	At4g27590 (Copper-bindendes Protein)
88.	0,7	0,5	At1g75640 (Proteinkinase / LRR-Rezeptor)
110.	0,6	0,8	At3g47380 (Pectinesterase)
104.	0,7	0,8	At1g69880 (Thioredoxin)
Unbe	kannte	<u>e Fu</u> nk	tion
2.	1,8	1,7	At3g25640
15.	1,2	1,1	At4g19980
68.	0,8	0,7	At2g44080

Liste 1b: Robust abregulierte Gene

uxin-Signalweg

29.	-1,0	-1,0	At2g22330 (Cytochrom P450, involviert in der IAA- Svothese)
43	-1.0	-0.9	At5a18060 (Auvin_induziertes Protein)
43. 53	-1,0	-0,9	Attg44350 (// / 6)
55	-0.9	-1.0	At1g72430 (Auxin-induziertes Protein)
72.	-0.8	-0.6	At1q51780 (ILL5)
104.	-0.7	-0.9	At4q38860 (Auxin-induziertes Protein)
132.	-0,7	-0,8	At3g23050 (<i>IAA7</i>)
319.	-0,5	-0,6	At2g04850 (Auxin-induziertes Protein)
Gibe	relin-S	ignalw	eg
16.	-1,2	-1,2	At4g30270 (<i>MERI-5</i> / GA-induzierte Endo-Xyloglucan- Transferase)
23.	-1,1	-0,8	At1g22690 (GA-reguliertes Protein)
24.	-1,1	-0,9	At2g14900 (GA-reguliertes Protein)
60.	-0,9	-0,6	At1g75750 (GASA1)
Jasn	nonsäu	ire-Sig	nalweg
1.	-2,1	-0,7	At2g24850 (1A13 / JA-Induzierbare Aminotransferase)
ю. 7	-1,5	-1,1	A(1)(7420)(LOX)
7. 8	-1,5	-0,9	A(3)(43)(40)(20)(2)
13	-1.3	-1.0	At3q09940 (JA-induzierbare
10.	1,0	1,0	Monodehydroascorbatreductase)
15.	-1,2	-1,3	At1g18710 (JA-induzierbarer MYB-
			Transkriptionsfaktor)
21.	-1,1	-1,0	At1g76790 (JA-induzierbare O-Methyltransferase)
28.	-1,0	-0,8	At1g32640 (MYC2 / JASMONATE INSENSITIVE1)
37.	-1,0	-0,7	At5g42650 (Cytochrom P450 74A / Allenoxidsynthase)
78.	-0,8	-0,3	At3g25780 (Allenoxidcyclase)
87.	-0,8	-0,5	At2g06050 (OPR3)
236.	-0,6	-0,4	At3g16470 (JA-induzierbares Jacalin-Lectin)
264.	-0,5	-0,5	At3g22400 (LOX)
Woit	oro Tr	nekrin	stionsfaktoron
18	-1.2	апэкпр	At4q04840 (Transkriptionsfaktor)
10.		-09	
	,	-0,9	
Sene	eszenz	-0,9 -assozi	iierte Proteine
Sene 3.	eszenz	-0,9 -assozi -1,2	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein)
Sene 3. 68.	eszenz -1,8 -0,8	-0,9 -assozi -1,2 -1,0	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein)
Sene 3. 68.	eszenz -1,8 -0,8	-0,9 -assozi -1,2 -1,0	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein)
Sene 3. 68. Expa	-1,8 -0,8	-0,9 -assozi -1,2 -1,0	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein)
Sene 3. 68. Expa 12.	eszenz -1,8 -0,8 ansine -1,3	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1 /</i> Expansin)
Sene 3. 68. Expa 12. 199.	-1,8 -0,8 ansine -1,3 -0,6	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1 /</i> Expansin) At4g13340 (Expansin)
Sene 3. 68. Expa 12. 199. 338.	-1,8 -0,8 ansine -1,3 -0,6 -0,5	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1 /</i> Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2 /</i> Expansin)
Sene 3. 68. Expa 12. 199. 338.	eszenz -1,8 -0,8 ansine -1,3 -0,6 -0,5	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1</i> / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2</i> / Expansin) ation (<i>LTP</i>)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid	-1,8 -0,8 -1,3 -1,3 -0,6 -0,5 Itransf	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6 erprote	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1</i> / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2</i> / Expansin) Seine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74.	eszenz -1,8 -0,8 ansine -1,3 -0,6 -0,5 Itransf -1,2 -0,8	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6 erprote -1,2 -0,8	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1</i> / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2</i> / Expansin) sine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>) At2g38530 (<i>LTP2</i>)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200.	eszenz -1,8 -0,8 ansine -1,3 -0,6 -0,5 transf -1,2 -0,8 -0,6 -0,5	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,8 -0,8 -0,5	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1</i> / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2</i> / Expansin) sine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>) At2g38530 (<i>LTP2</i>) At2q45180 (<i>LTP</i>)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200.	eszenz -1,8 -0,8 -1,3 -0,6 -0,5 -0,5 Itransf -1,2 -0,8 -0,6 -0,8 -0,6	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6 erprote -1,2 -0,8 -0,5	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1 /</i> Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2 /</i> Expansin) eine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>) At2g38530 (<i>LTP2</i>) At2g45180 (<i>LTP</i>)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. Kohl	eszenze -1,8 -0,8 ansine -1,3 -0,6 -0,5 Itransf -1,2 -0,8 -0,6 enhyd	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -1,2 -0,8 -0,5 rat-Met	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1</i> / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2</i> / Expansin) eine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>) At2g38530 (<i>LTP2</i>) At2g45180 (<i>LTP</i>) abolismus
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. Kohl 9.	-1,8 -0,8 -0,8 -1,3 -0,6 -0,5 -0,5 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6	-0,9 -assozi -1,2 -1,0 -1,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -1,2 -0,8 -0,5 rat-Met -0,9	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1 /</i> Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2 /</i> Expansin) Sine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>) At2g38530 (<i>LTP</i> 2) At2g45180 (<i>LTP</i>) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. 74. 200. 338.	eszenz. -1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -0,5 -0,6 -0,6 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -0,5 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -0,5 -0,8 -0,6 -0,8 -0,14 -0,8 -0,14 -	-0,9 -assozi -1,2 -1,2 -1,0 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,8 -0,5 -0,9 -0,5	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (<i>EXPL1</i> / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (<i>EXPL2</i> / Expansin) Sine (<i>LTP</i>) At4g12510 (<i>LTP</i>) At2g38530 (<i>LTP</i> 2) At2g45180 (<i>LTP</i>) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (<i>PGIP2</i> / Polygalacturonase-Inhibator)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. Kohl 9. 30. 32.	eszenz. -1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -1,2 -0,8 -0,6 -1,2 -0,8 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -1,2 -0,8 -0,6 -0,5 -0,5 -0,6 -0,5 -0,6 -0,5 -0,6 -0,6 -0,5 -0,6 -0,6 -0,5 -0,6 -0,7 -0,6 -0,6 -0,7 -0,6 -0,6 -0,7 -0,6 -0,7 -0,7 -0,8 -0,6 -0,7 -0,8 -0,6 -0,7 -0,8 -0,6 -0,7 -0,8 -0,6 -0,7 -0,8 -0,6 -0,7 -0,8 -0,8 -0,14 -0,8 -0,14 -0,8 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,16 -0,14 -0,14 -0,14 -0,14 -0,16 -0,14 -0,14 -0,16 -0,14 -0,14 -0,16 -0,14 -0,16 -0,14 -0,16 -0,14 -0,14 -0,10 -0,14 -	-0,9 -assozi -1,2 -1,2 -1,0 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,8 -0,5 rat-Met -0,9 -0,5 -0,5 -0,1	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (EXPL1 / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (EXPL2 / Expansin) Sine (LTP) At4g12510 (LTP) At2g38530 (LTP2) At2g45180 (LTP) at2g45180 (LTP) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (PGIP2 / Polygalacturonase-Inhibator) At4g02130 (GATL6 / Glycosyltransferase)
Sene 3. 68. Expa 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. 74. 200. 300. 30. 32. 47.	eszenz. -1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -1,3 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 enhydl -1,4 -1,0 -1,0 -0,9	-0,9 -assozi -1,2 -1,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,5 rat-Met -0,9 -0,5 -1,1 -0,7	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (EXPL1 / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (EXPL2 / Expansin) At4g12510 (LTP) At4g28530 (LTP2) At2g45180 (LTP) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g2130 (GATL6 / Glycosyltransferase) At4g243620 (Chitinase)
Sense 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. 74. 200. 300. 32. 47. 64.	eszenz. -1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -1,3 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -1,2 -0,8 -0,6 -1,2 -0,8 -0,6 -1,2 -0,8 -0,8 -0,9 -0,8 -0,8 -0,9 -0,8 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,9 -0,9 -0,8 -0,9 -0,	-0,9 -assozi -1,2 -1,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,5 -0,5 -0,5 -0,5 -1,1 -0,7 -1,0	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (EXPL1 / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (EXPL2 / Expansin) At4g12510 (LTP) At2g38530 (LTP2) At2g45180 (LTP) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (PGIP2 / Polygalacturonase-Inhibator) At4g02130 (GATL6 / Glycosyltransferase) At2g38290 (Glycosylhydrolase)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. 9. 30. 32. 47. 64. 88.	entry constraints of the second secon	-0,9 -assozi -1,2 -1,2 -1,0 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,5 -0,5 -1,2 -0,9 -0,5 -1,2 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,5 -0,7 -0,5 -0,7 -0,	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At3g45970 (EXPL1 / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (EXPL2 / Expansin) At4g12510 (LTP) At2g38530 (LTP2) At2g45180 (LTP) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (PGIP2 / Polygalacturonase-Inhibator) At4g02130 (GATL6 / Glycosyltransferase) At2g38290 (Glycosylhydrolase) At2g08650 (Xyloglucan-Endotransglycosylase)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. 74. 200. 74. 200. 47. 64. 88. 98.	eszenz. -1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -1,3 -0,6 -1,3 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -1,4 -1,0 -1,4 -1,0 -0,9 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,5 -0,6 -0,5 -0,5 -0,6 -1,2 -0,8 -1,4 -1,4 -1,4 -0,6 -0,5 -0,6 -1,4 -1,4 -0,6 -0,5 -0,6 -1,4 -1,4 -0,8 -0,	-0,9 -385021 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -0,6 -0,5 -0,5 -1,2 -0,8 -0,5 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -1,2 -0,6 -0,6 -0,5 -0,5 -1,2 -1,1 -0,5 -1,1 -0,7 -1,1 -0,7 -1,1 -0,7 -1,2 -0,7 -0,	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At4g12510 (EXPL1 / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (EXPL2 / Expansin) eine (LTP) At4g12510 (LTP) At2g38530 (LTP2) At2g45180 (LTP) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (PGIP2 / Polygalacturonase-Inhibator) At4g02130 (GATL6 / Glycosyltransferase) At2g3620 (Chitinase) At2g048620 (Xyloglucan-Endotransglycosylase) At1g62660 (Glycosylhydrolase / β-Fructosidase)
Sene 3. 68. 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 200. 74. 200. 74. 200. 74. 200. 47. 64. 88. 98. 98. 99.	-1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -1,3 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -1,4 -1,0 -0,9 -0,8 -0,8 -0,8 -0,7 -0,7	-0,9 -385021 -1,2 -1,2 -1,0 -0,6 -0,5 -0,5 -0,5 -0,7 -0,	iierte Proteine At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At4g125100 (EXPL1 / Expansin) At4g133400 (EXPL2 / Expansin) at4g12510 (LTP) At2g38530 (LTP2) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (PGIP2 / Polygalacturonase-Inhibator) At4g02130 (GATL6 / Glycosyltransferase) At2g3620 (Chitinase) At2g06850 (Xyloglucan-Endotransglycosylase) At1g62660 (Glycosylhydrolase / β-Fructosidase) At1g62630 (Xyloglucan-Endotransglycosylase)
Sene 3. 68. Expanded 12. 199. 338. Lipid 20. 74. 20. 74. 30. 32. 47. 64. 98. 99. 103.	-1,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,6 -1,3 -0,6 -0,5 -1,2 -0,8 -0,6 -1,4 -1,0 -0,9 -0,8 -0,8 -0,8 -0,8 -0,7 -0,7 -0,7	-0,9 -385021 -1,2 -1,2 -1,0 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,6 -0,7 -0,7 -0,7 -0,7 -0,7 -0,9	At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At5g20700 (Seneszenz-assoziiertes Protein) At4g13340 (Expl1 / Expansin) At4g13340 (Expansin) At4g38400 (EXPL2 / Expansin) ateg38530 (LTP2) At2g45180 (LTP) At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase) At5g06870 (PGIP2 / Polygalacturonase-Inhibator) At4g13620 (Chitinase) At2g3650 (Xyloglucan-Endotransglycosylase) At2g06850 (Xyloglucan-Endotransglycosylase) At1g65310 (Xyloglucan-Endotransglycosylase) At3g16850 (Glycosylhydrolase / β-Fructosidase) At3g16850 (Glycosylhydrolase / β-Fructosidase)

Fortsetzung nächste Seite

Liste 1b: Fortsetzung

Kohl	enhydr	at-Met	tabolismus (Fortsetzung)				_
124.	-0,7	-0,7	At1g11545 (Xyloglucan-Endotransglycosylase)	40.	-1,0	-1,4	At2g34520 (RIBOSOMAL PROTEIN S14)
141.	-0,7	-0,7	At4g34135 (Glycosyltransferase)	41.	-1,0	-0,4	At3g44860 (Methyltransferase)
165.	-0,6	-0,6	At1g26450 (Glycosylhydrolase / β-1,3-Glucanase)	44.	-1,0	-0,8	At1g52040 (MYROSINASE BINDING PROTEIN 1)
170.	-0,6	-0,5	At1g52400 (BG1 / β-Glucosidase / Glycosylhydrolase)	122.	-0,7	-0,4	At1g06620 (2-Oxoglutarat-Dioxygenase)
176.	-0,6	-0,6	At3g62660 (Glycosyltransferase)				
178.	-0,6	-0,8	At1g20840 (Zuckertransporter)	Unbe	kannte	Funk	tion
298.	-0,5	-0,4	_At5g61520 (Hexosetransporter)	2.	-2,0	-1,9	At2g34600
299.	-0,5	-0,5	At3g61010 (Glycosylhydrolase)	5.	-1,5	-1,0	At1g17380
408.	-0,5	-0,5	At1g50460 (Hexokinase)	10.	-1,4	-1,2	At4g21850
				17.	-1,2	-1,4	At3g13980
Sons	tige			19.	-1,2	-0,7	At5g13220
4.	-1,8	-1,4	At1g54020 (Myrosinase-assoziierte Hydrolase)	22.	-1,1	-1,2	At5g03120
11.	-1,3	-0,9	At5g47240 (NUDT8 / Hydrolase)	26.	-1,0	-1,2	At5g41140
14.	-1,3	-1,1	At1g61120 (Terpensynthase)	33.	-1,0	-0,3	_At1g65400
25.	-1,1	-0,9	At4g37410 (Cytochrom P450, Monooxygenase)	39.	-1,0	-1,0	At3g08670
27.	-1,0	-0,5	At1g28480 (Glutaredoxinprotein)	42.	-1,0	-1,1	At5g57780
31.	-1,0	-0,7	At2g32150 (Hydrolase)				
34.	-1,0	-1,1	At1g52190 (Peptidtransporter)				-1,0 ≥ robust abreguliert
35.	-1,0	-2,0	5S rRNA				1,0 ≤ robust hochreguliert
36.	-1,0	-0,7	At4g15440 (Hydroperoxidlyase)				- 0,5 ≥ semirobust abreguliert
38.	-1,0	-1,1	At1g14120 (2-Oxoglutarat-Dioxygenase)				0,5 ≤ semirobust hochreguliert

Ein Tnl waren durch die *DRN*-Induktion 31 Gene robust hoch- und 44 robust abreguliert. Diese sind in verschiedene Kategorien unterteilt aufgelistet. Die unterschiedlichen Kategorien wurden durch semirobust regulierte Gene ergänzt. Es sind die Rangstufen (z.B.: 1. = das am stärksten hoch- bzw. abregulierte Gen), die Verhältnisse der Expressionsstärke von 1 Tnl / 0 Tnl und 3 Tnl / 0 Tnl in logarithmierter Form (siehe Text) und die At-Nummer angegeben. Die At-Nummer wurde durch den Gennamen und/oder der vorhergesagten Funktion des Gens ergänzt, falls diese bekannt sind. Bei den fett hervorgehobenen At-Nummern handelt es sich um Gene, die ebenfalls durch die Induktion von *DRNL* robust hochreguliert wurden (Ikeda et al., 2006).

3.2 Konsequenzen der Erhöhung der CLV3-Expression während der Entwicklung

Mit der Strategie, die *CLV3*-Expression während der Entwicklung induzierbar zu erhöhen, waren zwei Zielsetzungen verbunden. Zum einen sollte das Modell der gegenseitigen Regulation von *CLV3* und *WUS* überprüft, zum anderen sollten mittels Affymetrix-Genchips neue putative Regulatoren des Stammzellschicksals identifiziert werden.

3.2.1 Zusammenfassung der in Müller et al. (2006) veröffentlichten Ergebnisse

Um die *CLV3*-Expressionsrate in der Stammzelldomäne während der Entwicklung zu erhöhen, wurde das Ethanol-induzierbare *ALC*-Genenexpressionssystem verwendet (Deveaux et al., 2003). Dabei wurde der ALCR-Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle der *CLV3*-regulatorischen Sequenzen exprimiert. Durch die Ethanolinduktion kann der ALCR-Transkriptionsfaktor an den *alcA*-Promotor binden, hinter dem die *CLV3*-cDNA kloniert wurde. Zusätzlich besaßen die verwendeten transgenen *iCLV3*-Pflanzen das Reportergen *alcA*:: β -*Glucuronidase* (*GUS*), um die Domäne, in der das transgene *CLV3* nach der Induktion exprimiert wurde, zu detektieren (Fig.1C und 6F). Die Ethanolinduktion wurde kurz nach der Blühinduktion durchgeführt, da sich der erwartete Stammzellverlust leichter an dem Phänotyp der Infloreszenz als an der in der vegetativen Phase produzierten Blattrosette dokumentieren lässt. Wie erwartet führte die kontinuierliche Induktion zur Termination des Sprossmeristems (Fig.1B). Bei den Meristemen der Kontrollpflanzen blieb die Ethanolbehandlung dagegen ohne Effekt (Fig.1A).

Durch eine Testreihe mit unterschiedlichen Induktionszeiträumen konnte gezeigt werden, dass die Ethanolbehandlung länger als drei Tage aufrechterhalten werden muss, damit alle Sprossmeristeme terminieren. Bei einer einzelnen sechsstündigen Induktion erhöhte sich die *CLV3*-Expression innerhalb von drei Stunden rapide, um nach 48 Stunden wieder annähernd das natürliche Expressionsniveau zu erreichen. Unerwarteterweise verminderte sich die Expressionsstärke von *WUS* zwischenzeitlich nur auf ein Minimum von 40% (Fig.2A).

Nach der sechsstündigen Induktion wurde den *iCLV3*-Pflanzen erlaubt, sich bis zur Reife zu entwickeln. Da Pflanzen während ihrer Entwicklung fortlaufend wachsen und laterale Organe anlegen, repräsentiert ihre Sprossachse zugleich eine Zeitachse, an der vorangegangene Störungen des Wachstums sichtbar werden. Viele *iCLV3*-Pflanzen zeigten keine Reduktion der Karpellenanzahl, an der sich die Größe der Stammzellpopulation in den Blütenmeristemen ablesen lässt (1.2.5). Vermutlich waren bei diesen Pflanzen zum Zeitpunkt der Ethanolbehandlung, vier Tage nach der Blühinduktion, noch keine Blütenmeristeme angelegt. 15% der Pflanzen zeigten jedoch eine Reduktion in der Karpellenanzahl in den ersten ein bis drei Blüten. Wie von einer zeitlich begrenzten Erhöhung der *CLV3*-Expression erwartet, entwickelten sich die später angelegten Blütenmeristeme normal (Fig.1D und 3A).

Oberhalb der Position der defekten Blüten waren bei 59% der Pflanzen drei bis sechs Blüten auf Grund unterbliebener Internodienstreckung Wirtel-artig angeordnet (Fig.1D,E und 3A). Durch die Entfernung des Infloreszenzmeristems im Wildtyp entsteht ein vergleichbarer Phänotyp (Fig.1F), der nicht durch Zuführung von Auxin, einem bekannten Förderer der Internodienstreckung, gerettet werden kann (nicht veröffentliche Daten). Somit stört die kurzfristige *CLV3*-Induktion eine Meristemfunktion, die außerhalb des Meristems Internodienstreckung fördert.

Um die Termination aller Spross- und Blütenmeristeme zu erreichen, wurden die *iCLV3*-Pflanzen zwölf Tage lang sechs Stunden am Tag induziert. Wie zuvor bei der einmaligen sechsstündigen Induktion konnte ein rascher Anstieg der CLV3-Expression innerhalb von drei Stunden beobachtet werden, die auch nach sieben Tagen das Wildtypniveau weit übertraf (Fig.2B). Aber erneut konnte nur eine partielle Reduktion der WUS-Expression auf ein Minimim von 35% in den untersuchten Apizes, die sowohl das Infloreszenzmeristem wie auch die Blütenmeristeme umfassten, beobachtet werden. Nach drei Tagen war sogar ein erneuter Anstieg der WUS-Expression zu verzeichnen. Das CLV3/WUS-Modell sagt voraus, dass die Expression von CLV3 abhängig von der WUS-Expression ist. Um zwischen endogenem und induziertem CLV3 zu unterscheiden, deren mRNAs verschiedene 5'und 3'-untranslatierte Regionen besitzen, wurden bei der RT-PCR spezifische Oligonukeotide benutzt. Die von dem ALC-Transaktivierungssystem (CLV3::ALCR; alcA::CLV3) induzierte CLV3-Expression ist zwar abhängig von WUS, bleibt jedoch auf Grund der über sieben Tage andauernden hohen Stabilität der ALCR-mRNA erhalten. Bei der Expression des endogenen CLV3 ist dagegen, wie bei WUS, eine signifikante Abnahme innerhalb von drei Stunden zu verzeichnen. Somit reagiert CLV3 innerhalb kürzester Zeit auf die Erhöhung seiner eigenen Expression. Das legt nahe, dass nach der Abregulation des WUS-Promotors durch den verstärkt aktivierten CLV-Signalweg, durch eine kurze Halbwertszeit der WUS-mRNA und des WUS-Proteins, eine schnelle Abregulation des CLV3-Promotors erfolgt und dazu die CLV3-mRNA ebenfalls eine geringe Halbwertszeit besitzt. Somit besitzt der negativ regulierte CLV3/WUS-Rückkopplungskreislauf tatsächlich eine hohe Dynamik und kann in kurzer Zeit auf Veränderungen der Expressionsstärke einer der beiden Gene reagieren. Darüber hinaus sind die Reaktionen auf transkriptioneller Ebene bedeutend schneller als die durch die erhöhte CLV3-Expression verursachten morphologischen Konsequenzen für das Infloreszenzmeristem, die auf zellulärer Ebene in Zusammenarbeit mit Dorota Kwiatkowska, Universität Wroclaw untersucht wurden (Fig.4).

Nachdem die endogene *CLV3*-Expression innerhalb von 24 Stunden ein Minimum nahe Null erreicht hat, steigt diese, wie die von *WUS*, wieder an. Daher scheint *WUS* trotz hoher *CLV3*-Expression wieder in den Meristemen reaktiviert zu werden. Daher verwunderte es nicht, dass auch bei der kontinuierlichen Induktion von *iCLV3* über zwölf Tage nur ein Teil der Blütenmeristeme Defekte aufwies. Die primären Infloreszenzmeristeme waren dagegen alle terminiert (Fig.1G-I und 3B), einige der jüngern sekundären Infloreszenzen zeigten jedoch ebenfalls keine Defekte (ohne Abb.). Um die unterschiedliche Reaktion der zum Beginn der Induktion bereits angelegten Meristeme zu den während der erhöhten *CLV3*-Expression etablierten Meristeme zu erklären, wurde die *CLV3*und *WUS*-Expression auf zellulärer Ebene mittels RNA-*in situ*-Hybridisierungen untersucht (Fig.6). Innerhalb von sechs Stunden erhöht sich die *CLV3*-Expression in der zentralen Zone der Blüten- und Sprossmeristeme extrem und bleibt auch nach vier Tagen in dieser Stärke erhalten. Das im organisierenden Zentrum unterhalb der zentralen Zone exprimierte *WUS* geht nach 24 Stunden in allen Infloreszenz- und in den meisten Blütenmeristemen verloren. Nach 48 Stunden wird *WUS* in den jüngeren Blüten wieder reaktiviert, obwohl die *CLV3*-Expression weiterhin stark erhöht ist. Somit kann langfristig das *WUS*-reprimierende *CLV3*-Signal durch einen bisher unbekannten Mechanismus kompensiert werden.

Ein vergleichbares Phänomen wurde bei dem Versuch beobachtet, *clv3-2-*Mutanten mit verschiedenen Promotordeletionstransgenen zu komplementierten. Über eine Spannbreite von ca. 30 bis 300% der Wildtyp-*CLV3*-Expression wurden die vergrößerten *clv3-2*-Blütenmeristeme komplett gerettet (Fig.7; Lorenzo Borghi, Dissertation, 2005). Von mir konnte gezeigt werden, dass dies auch für die Homöostase des SAM zutrifft (Fig.7). Somit wird die Größe der Stammzelldomäne nicht alleine durch die *CLV3*-Expressionsrate stabil gehalten.

Folgende in Müller et al. (2006) veröffentlichen Ergebnisse sind nicht Teil dieser Arbeit:

- Patrick Laufs stellte die transgenen CLV3::ALCR/alcA::GUS-Pflanzen zu Verfügung.
- Lorenzo Borghi erzeugte die transgenen *clv3-2-*Pflanzen mit den *CLV3-*Promotortransgenen und bestimmte bei diesen die durchschnittliche Karpellenanzahl (Lorenzo Borghi, Dissertation, 2005).
- Dorota Kwiatkowska, Universität Wroclaw, analysierte die Konsequenzen der induzierten *CLV3*-Expression auf zellulärer Ebene mittels Meristemreplikaten.

This article is published in *The Plant Cell* Online, *The Plant Cell* Preview Section, which publishes manuscripts accepted for publication after they have been edited and the authors have corrected proofs, but before the final, complete issue is published online. Early posting of articles reduces normal time to publication by several weeks.

Dynamic and Compensatory Responses of *Arabidopsis* Shoot and Floral Meristems to *CLV*3 Signaling[™]

Ralf Müller,^a Lorenzo Borghi,^a Dorota Kwiatkowska,^{b,1} Patrick Laufs,^c and Rüdiger Simon^{a,2}

^a Institut für Genetik der Heinrich-Heine Universität, D-40225 Düsseldorf, Germany

^b Institute of Plant Biology, Wroclaw University, 50-328 Wroclaw, Poland

^c Institute Jean-Pierre Bourgin, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Institut National de la Recherche Agronomique, 78026 Versailles, France

In Arabidopsis thaliana, the stem cell population of the shoot system is controlled by regulatory circuitry involving the WUSCHEL (WUS) and CLAVATA (CLV1-3) genes. WUS signals from the organizing center (OC) to promote stem cell fate at the meristem apex. Stem cells express the secreted peptide CLV3 that activates a signal transduction cascade to restrict WUS expression, thus providing a feedback mechanism. Stem cell homeostasis is proposed to be achieved by balancing these signals. We tested the dynamics of CLV3 signaling using an inducible gene expression system. We show here that increasing the CLV3 signal can very rapidly repress WUS expression during development, which in turn causes a fast reduction of CLV3 expression. We demonstrate that increased CLV3 signaling restricts meristem growth and promotes allocation of peripheral meristem cells into organ primordia. In addition, we extend the current model for stem cell control by showing that meristem homeostasis tolerates variation in CLV3 levels over a 10-fold range and that high-level CLV3 signaling can be partially compensated with time, indicating that the level of CLV3 expression communicates only limited information on stem cell number to the underlying OC cells.

INTRODUCTION

Plant meristems provide the protective niche that allows maintenance and proliferation of undifferentiated stem cells. Intercellular communication between the functional domains of the meristem allows them to maintain their size and shape during development. Organs are formed at the meristem flanks in the peripheral zone (PZ), and stem cell divisions in the central zone (CZ) have to provide new cells to support continuous organ formation. In Arabidopsis thaliana, stem cell fate in the CZ of shoot and floral meristems is promoted by the cells of the underlying organizing center (OC) (Clark, 2001a; Baurle and Laux, 2003; Carles and Fletcher, 2003) that express the homeodomain transcription factor WUSCHEL (WUS) (Mayer et al., 1998). In wus mutants, stem cells are no longer maintained, and organ formation arrests prematurely (Laux et al., 1996). WUS expression is repressed by the CLAVATA (CLV) signal transduction pathway (Clark, 2001b; Carles and Fletcher, 2003). Stem cells in the CZ express the secreted peptide CLV3 that is thought to bind to and thereby activate the CLV1 leucine-rich receptor kinase in cells underneath (Fletcher et al., 1999; Brand et al.,

[™]Online version contains Web-only data.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.105.040444.

2000). Mutations in *CLV1* or *CLV3* cause stem cell accumulation in the CZ due to unrestricted *WUS* expression, resulting in a larger surrounding PZ and the formation of more organs.

A model of how stem cell number in the CZ is controlled by feedback regulation between *CLV3* and *WUS* has been proposed and predicts that if stem cell number decreases, less *CLV3* is produced and *WUS* is released from repression by the *CLV* pathway. On the other hand, if stem cell number increases, *CLV3* signaling intensifies and downregulates *WUS* expression (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). A range of transgenic plants expressing *CLV3* or *WUS* from different promoters has been generated, and the phenotypes observed support the current model. However, the dynamics of the regulatory system are only poorly understood. One recent study showed that inactivation of *CLV3* during development using an RNA interference (RNAi) approach allows for unrestricted *WUS* expression and activation of ectopic *CLV3* expression in PZ cells (Reddy and Meyerowitz, 2005).

Here, we have analyzed the dynamics of altered *CLV3* signaling and the consequences for *WUS* expression and meristem development. CLV3 belongs to the CLE family of small signaling molecules that can, in part, functionally substitute for each other, provided that they are expressed at sufficient levels in a given cell (Casamitjana-Martinez et al., 2003; Hobe et al., 2003). To avoid artificial crosstalk between signaling pathways due to high-level misexpression, we modulated *CLV3* expression levels within its normal expression domain. We show here that *WUS* expression decreases very rapidly when *CLV3* expression increases. However, we found no direct proportionality between the levels of the stem cell *CLV3* signal and *WUS* repression. We extend the existing model for stem cell regulation and propose that *WUS*

¹ Current address: Department of Biophysics and Cell Biology, University of Silesia, Jagiellonska 28, 40-032 Katowice, Poland.

 $^{^2 \, {\}rm To}$ whom correspondence should be addressed. E-mail ruediger. simon@uni-duesseldorf.de; fax 49-211-8112279.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Rüdiger Simon (ruediger.simon@uni-duesseldorf.de).

activity in the OC is controlled by a secondary mechanism that can compensate for fluctuations in *CLV3* expression with time. Furthermore, we show that *WUS* activity or an active stem cell population is required to restrict primordia initiation to the meristem's periphery.

RESULTS

Inducible Expression of CLV3 in the Stem Cell Domain

We used the ethanol-inducible gene expression system to activate CLV3 expression during development (Deveaux et al., 2003). Briefly, the ALCR transcription factor was expressed under control of the CLV3 regulatory sequences (named CLV3:ALCR). Target genes to be expressed in an inducible manner are cloned behind the alcA promoter sequences and introduced into the same plant. An alcA: β-glucuronidase (GUS) transgene was used as a reporter for successful activation of gene expression via the ALC system. The alcA:CLV3 transgene allowed inducible expression of CLV3 within the stem cell domain. Transgenic Arabidopsis plants that carried the CLV3:ALCR, alcA:GUS, and alcA:CLV3 transgenes were obtained (iCLV3). Histochemical staining for GUS reporter gene activity and RNA in situ hybridization using GUS probes confirmed that the reporter gene was inducible but not active prior to ethanol induction (Figures 1C and 6F) (Deveaux et al., 2003). Inductions using ethanol vapor were performed between 5 and 7 weeks after germination at or after the onset of bolting. Continuous inductions caused termination of shoot meristem development in both wild-type and clv3-2 mutant backgrounds, as expected from high expression of CLV3 (Figure 1B). Control plants lacking the alcA:CLV3 transgene, as well as wild-type Landsberg erecta plants, were unaffected by the inductive treatments (Figure 1A).

To study the consequences of transient changes in CLV3 signaling on meristem development, we first had to identify an appropriate length for the inductive treatment. Therefore, the percentage of plants showing shoot meristem termination after different inductive periods was determined. No termination was observed in plants treated for 2 h. Inductions for 6 to 24 h resulted in 5 to 7% meristem termination; treatments for 3 d caused shoot meristem arrest in 78% of all plants, and inductions for 6 or 12 d caused termination in all plants analyzed (total n = 458). To allow for shoot apical meristem (SAM) recovery in the majority of plants, we performed single pulse treatments of 6-h duration. Quantitative RT-PCR of CLV3 levels showed that expression was rapidly induced within 3 h and that CLV3 expression levels remained elevated for up to 48 h after induction (HAI) (Figure 2A). Concomitantly, WUS RNA amounts decreased within 3 HAI to reach a minimum of 40% between 6 and 22 HAI. Close to or even higher than normal WUS RNA levels were reached again within 48 h.

Plants were allowed to grow to maturity after the single pulse to study morphology and flower organ number. On 15% of all induced plants, two to three sterile flowers that lacked one or both carpels developed somewhere along the main inflorescences axis, followed by normal fertile flowers (Figures 1D and 3A). Thus, only a minority of all flower meristems responded to a rapid, short-term pulse in *CLV3* signaling with a reduction in stem cell activity. We also noted that flower arrangement along the stem axis appeared altered above the position of sterile flowers (Figures 1D, 1E, and 3A). In 59% of treated plants, three to six flowers were arranged in small clusters (n = 86), which could be due to a transient alteration in meristem size or a transient failure in internode elongation. Interestingly, *wus* mutant plants initiate socalled aerial rosettes, which are clusters of leaves arranged in a dense spiral (with short internodes) around an inflorescence stem (Mayer et al., 1998). However, dissecting the SAM together with the youngest flower primordia from wild-type Landsberg *erecta* plants (n = 26) resulted in the formation of similar flower clusters, indicating that an active SAM is required for internode elongation (Figure 1F).

Our pulsed induction experiments showed that a transient increase in CLV3 signaling is not generally sufficient for immediate termination of shoot meristem development. We found that induction for >3 d is required to arrest SAM growth in all plants.

WUS Is Rapidly but Transiently Repressed after Induction of CLV3

Only some of the floral meristems responded to increased CLV3 expression with a reduction in meristem activity, which could be due to the limited length of the inductive treatment. We therefore performed continuous inductions with ethanol for 6 h per day for 12 d. Within 3 h after commencing ethanol induction, the CLV3 RNA level increased 70-fold and increased further to >400 times the uninduced level within 72 HAI (Figure 2B). Quantification of WUS RNA levels in shoot tips, comprising inflorescence and floral meristems, showed an overall reduction to 35% of untreated levels within 24 HAI (Figure 2B). However, WUS RNA remained always detectable. We observed a significant increase in WUS RNA amounts from 72 HAI onwards, which could at least in part be due to the expression of WUS in stamens and ovules that now start to develop. There, WUS expression is not subject to regulation via the CLV pathway (Gross-Hardt et al., 2002; Wellmer et al., 2004). Since CLV3 expression depends on WUS activity, we expected that downregulation of WUS expression in shoot and floral meristems would be paralleled by reduced CLV3 expression. To distinguish between CLV3 expression from the transgene and the endogenous gene copy, we performed quantitative RT-PCR analysis using gene-specific amplification primers derived from untranslated region sequences (Figure 2B). Expression of the inducible CLV3 (from the CLV3:ALCR; ALCA:CLV3 transgene), which is controlled from a CLV3 promoter and therefore ultimately dependent on WUS activity, is maintained for at least 168 HAI due to the stability of the ALCR mRNA (data not shown). Expression from the endogenous CLV3 gene was significantly reduced within 3 HAI and close to background by 24 HAI (Figure 2B), in line with the expectation that WUS is required to promote CLV3 expression. Surprisingly, CLV3 expression levels increased again by 72 and 168 HAI, which could suggest that WUS was also reactivated in meristems (Figure 2B).

Phenotypic Consequences of Long-Term CLV3 Induction

At the macroscopic level, differences from untreated plants became apparent \sim 9 d after induction (DAI). All plants that were



Figure 1. Morphological Effects of Increased CLV3 Expression.

(A) The shoot meristem (arrow) of wild-type plants is unaffected by ethanol treatments 11 DAI and continues to initiate flower primordia.

(B) At 11 DAI, the inflorescences of *iCLV3* plants lack young flower meristems and the shoot meristem has arrested (arrow).

(C) The *iCLV3* transgenic lines carry the *alcA:GUS* reporter gene. GUS activity is found in the CZ of the inflorescence meristem (arrowhead) and floral meristems after induction. Bar = $25 \mu m$.

(D) and (E) *iCLV3* transgenic plants after a single 6-h induction pulse.

(D) The majority of *iCLV3* plants grows flowers with a reduced number of carpels (arrowheads) and form pseudo-whorls (arrow) higher up.

- (E) Terminated inflorescences (arrow) are observed in 7% of pulse-induced *iCLV3* plants.
- (F) Decapitation of wild-type plants phenocopies the arrested meristem phenotype (arrow; compare with [E]).

(G) to (J) Continuous inductions for 12 d.

(G) Close-up of a terminating shoot as in (H).

(H) Inflorescence at 17 DAI. The meristem has terminated with a pseudo-whorl of normal flowers (arrow). Flowers further down on the inflorescence axis carry only one carpel (arrowheads) or a filamentous organ in the center.

(I) Close-up of an arrested meristem as in (H).

(J) Flower with only three stamens and no carpels.

induced for six or more consecutive days arrested shoot growth and flower formation (>250 plants analyzed) (Figures 1G to 1J and 3B). Internode elongation between the last three to six flowers was strongly reduced, resulting in a pseudo-whorled arrangement of flowers around the shoot tip, thus resembling pulse-induced plants. In some cases, a small filamentous organ grew at the arresting shoot apex (Figure 1I). We analyzed all flowers that were formed on terminated *iCLV3* plants (n = 32) after long-term, continuous ethanol induction (Figure 3B). Although floral induction was synchronized by shifting plants from short days to long days at 43 d after germination (DAG), individual plants still differed in their developmental stage and in their total number of flowers, ranging from 3 to 21. In 26 of 32 plants (81%), we found one to six flowers carrying three to four stamens and only a single carpel, indicating a premature floral meristem arrest. The distribution of these flowers along the inflorescence axis depends on the developmental stage at which the induction of *CLV3* expression started (Figure 3B). Defective flowers were



Figure 2. Quantification of CLV3 and WUS Expression after *i*CLV3 Induction.

Total RNA was isolated from shoot tips of induced plants at the indicated time points, and *CLV3* or *WUS* transcripts were quantified by quantitative RT-PCR. Two independent RNA preparations were analyzed for each time point. Median values were calculated from triplicate real-time PCR analysis, and standard errors are shown. Levels of *CLV3* and *WUS* RNAs before induction (time point 0) were set to 1. The *y* axis represents X-fold induction in a logarithmic scale. Means are of three experimental repetitions, and bars indicate the standard error.

(A) Changes in CLV3 and WUS expression after a single 6-h ethanol pulse.

(B) Changes in *CLV3* and *WUS* expression after continuous inductions. Oligonucleotide primers were used that allowed *iCLV3* transgene (induced *CLV3*) and *CLV3* gene (endogenous *CLV3*) expression to be distinguished.

formed only for a short period, after which, on average 7 \pm 0.4 normal flowers were grown higher up on the inflorescence.

Thus, while the shoot meristem of all plants responded to strong CLV3 signaling with stem cell loss, only a limited number of floral meristems reacted in a similar manner. A similar restricted response was observed when CLV3 was inducibly and ubiquitously expressed using the cauliflower mosaic virus 35S promoter (J. Lohmann, personal communication). This could indicate that CLV3 can act only during a narrow developmental window. Such a window must lie between stages 1 and 6 of flower development, when WUS is normally expressed. However, on average seven normal flowers are found higher up on the inflorescence of our *iCLV3* plants, which were formed after the

defective flowers. Notably, the youngest flowers passed through all developmental stages during the ethanol treatment. We therefore conclude that the response to *CLV3* signaling cannot depend on a sensitive stage of flower development. We also considered the possibility that the *iCLV3* transgene is silenced during plant development. However, plants that had been induced once with a 6-h single ethanol pulse still responded to a second, inductive pulse provided 10 d later (data not shown), confirming that the transgene could still be activated.

Increased CLV3 Signaling Reduces SAM Growth and Recruits More SAM Cells to Primordia

In order to visualize the dynamic cellular response to increased *CLV3* signaling, we prepared replicas (developmental sequences) of the meristem surface before and at regular intervals after the inductive treatment, which were then analyzed by scanning electron microscopy (Dumais and Kwiatkowska, 2002). To control for tissue damage induced by the imprinting technology, we repeatedly took replicas from individual untreated apices, without



Figure 3. Effects of CLV3 Induction on Plant Development.

(A) Pulsed induction. *iCLV3* transgenic plants were induced for 6 h, and the morphology of the first 15 flowers was analyzed for individual induced plants and plotted according to their position on the inflorescence axis. Gray, normal flowers with two carpels; black, 0 or 1 carpel; white, aberrant positioning of flowers (i.e., more than three flowers are formed within 3 mm of stem axis). Only plants affected by the induction were plotted (51 of 86).

(B) Continuous inductions. Columns represent individual *iCLV3* plants analyzed after shoot meristem termination. Flowers along the inflorescence axis were scored for carpel number. Gray, normal flower with two carpels; black, flower with 0 or 1 carpel; white, filamentous organ.

Individuals were ordered along the x axis by total number of flowers produced and by the position of the first affected flowers along the inflorescence axis.

noticing any effect on growth or development (Figures 4A1 and 4A2; see Supplemental Figure 1 online). Furthermore, developmental sequences of individual apices were very similar. Overall growth was quantified as the relative area increase of an individual cell or SAM surface (percentage of increase per hour), and numbers of cell divisions in a 24-h interval were plotted on the SAM surface (Figures 4A and 4B). In general, overall growth is higher in primordia than in the center of the meristem, except in regions where flower primordium boundaries are formed (Figure 4, blue in the center and red in primordia).

Within 1 to 3 d after the beginning of induction, overall growth across the CZ and PZ of induced SAMs declined. While division rates in the PZ and primordia were not strongly affected, cell

divisions in the meristem center ceased (Figures 4B1 to 4B3). The SAM area started to decrease within this period (Figure 5). Approximately 5 DAI, the arresting SAMs had also changed shape and became flat or saddle shaped (Figure 4B3). The initiation of individual primordia was delayed, with an increase in the plastochron from 10 h in controls to 25 h in induced apices (Table 1). Furthermore, primordia were initiated closer to the SAM center and were significantly larger than those on control apices at the time of initiation (Table 1). Thus, a size decrease of the SAM was paralleled by a size increase of the individual primordia, indicating that increased *CLV3* signaling allowed the recruitment of cells from the flanks of the central region for organ initiation.





Scanning electron micrographs were taken from meristem replicas every 24 h, and cells were color-coded according to their areal growth rates within this time period (relative size increase, units % h^{-1}). Cell divisions occurring within 24 h are indicated by number of black dots per cell. Asterisks identify the cell at which the geometric center of the SAM surface is located at the beginning of the series. Flower primordia are initiated in a clockwise pattern and are numbered from the youngest primordium (P0) observed in the sequence to the oldest. Their borders as assessed by surface curvatures are outlined in black. Bars = 30 μ m.

(A) Sequence of an untreated control meristem.

(B) Sequence of an induced meristem. Replicas were taken at days 2 (B1), 3 (B2), and 4 (B3) after the start of induction.



Figure 5. Size Reduction of the SAM Surface Area after CLV3 Induction.

Surface areas (in μ m²) were measured from scanning electron micrographs for four induced apices (dashed lines) at 0 to 6 DAI, and two control meristems (solid lines) were analyzed on consecutive days.

In all shoot meristems analyzed, at least three new flower primordia were initiated after ethanol induction, but before the SAM ceased growth. These flowers developed through all stages during the induction period and were therefore continuously subjected to high *CLV3* signaling.

Differential Responses of Floral Meristems to *CLV3* Signaling

To characterize the molecular events in more detail, we analyzed the distribution of CLV3 and WUS RNA in tissue sections of induced plants (Figure 6). In the wild type, CLV3 is expressed in a roughly conical domain in shoot and floral meristems, and this general expression pattern remained unaltered by the inductive treatment (Figure 6A). We noted a minor expansion of CLV3 expression into more lateral positions, which can be explained by the stability of ALCR mRNA and inheritance to the flanking stem cell daughters. However, intensity of staining increased dramatically within 6 HAI, as predicted from the RNA guantifications. During the following days, CLV3 remained expressed at high levels in shoot and floral meristems (Figures 6B to 6E). WUS is normally expressed in the OC cells that form a central domain within inflorescence and floral meristems (Figure 6G). In the wild type, WUS is downregulated during stage 6 of flower development, when the gynoecium is formed (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). In induced plants, WUS expression in the SAM was reduced by 6 HAI and was permanently lost from all SAMs within 24 HAI (Figures 6G to 6I, Table 2). Floral meristems responded differently to increased CLV3 expression: between 6 and 24 HAI, the WUS RNA signal was weak or absent in stage 2 floral meristems and was not detected in stage 3 to 6 meristems (Figures 6H and 6I, Table 2). However, from 48 to 96 HAI, WUS was expressed in 50 and 69% of all stage 2 floral meristems and in 27 and 67% of all stage 3 to 6 meristems, respectively. WUS

expression in the SAM had already terminated 3 d earlier, within 24 h after induction had started (Figures 6I to 6K, Table 2). Importantly, WUS expressing flower meristems from all time points after the start of induction still expressed high levels of CLV3 RNA (Figure 6E). The presence of WUS transcripts in floral meristems from 48 HAI onwards could explain that developmental defects were restricted to a limited number of flowers in continuous induction experiments. Thus, increased CLV3 signaling appears to rapidly downregulate WUS expression within 3 h, which also causes a rapid decrease in endogenous CLV3 expression from stem cells. However, downregulation of WUS is at least partially compensated within 2 DAI. This compensatory effect is not limited to floral meristems but was also found in axillary meristems that initiated during the inductive treatment. We conclude that a compensation process, resulting in maintenance or reactivation of WUS expression in the presence of strong CLV3 signaling, acts in all meristems that initiated during the induction period.

CLV3 Expression Can Fluctuate Tenfold without Altering Meristem Size

The presence of a compensation mechanism that controls *WUS* expression independently of the CLV signaling pathway would make meristem size regulation at least partially independent of *CLV3* expression levels. To test for the effects of different *CLV3* expression levels, we made use of a series of *CLV3* promoter deletion derivatives that allow expression within the stem cell domain, albeit at reduced or increased levels compared with the wild type (U. Brand, L. Borghi, and R. Simon, unpublished data). In contrast with inducing *CLV3* expression rapidly to high levels using the *iCLV3* system, we now provide meristems with slightly different amounts of *CLV3* continuously from the establishment of the meristem onwards.

We first used a *GUS* reporter gene to assay promoter activity (Figure 7). The p*CLV3* transgene, consisting of \sim 3-kb regulatory sequences controlling expression of a *GUS* cDNA, gave a *GUS* RNA expression pattern that corresponded to the RNA distribution of *CLV3* in the stem cell domain. All other promoter variants were similarly tested in fusions with the *GUS* reporter for their

Table 1. Spacing, Timing, and Size of Flower Primordium Formation							
	Spacing	Plastochron Duration (h)	n ₁ ª	Size (µm²)	n2 ^b		
Control Induced	4.04 ± 0.11*c 3.10 ± 0.07*	10 25	27 59	870 ± 141* 1529 ± 109*	7 13		

Primordia spacing (distance from SAM center) is given as a number of cells counted from the geometric center of the SAM to the boundary of a flower primordium defined by curvature.

^a Flower primordia considered for spacing analysis were the youngest three primordia surrounding the SAM; total number $= n_1$.

^b For size measurements, primordia were at the earliest discernible developmental stage; total number = n_2 .

^c Differences between values marked with asterisks are significant at P < 0.05 level of Tukey's honestly significant difference mean-separation test. Values are means \pm SE.



Figure 6. Induction of CLV3 Expression in iCLV3 Transgenic Plants and Consequences for WUS Expression.

RNA in situ hybridizations with *CLV3* (**[A]** to **[E]**) or *WUS* (**[G]** to **[L]**) antisense RNA probes, and *alcA:GUS* activity staining of inflorescence apices (**F**). Color reactions for the detection of *WUS* RNA (**[G]** to **[L]**) and *CLV3* (**A**) were incubated overnight; all others gave a strong signal after 6 h of incubation. Uninduced controls (**[A]** and **[G]**); 6 HAI (**[B]** and **[H]**); 1 DAI (**[C]** and **[I]**); 2 DAI (**[D]** and **[J]**); 4 DAI (**[E]** and **[K]**); 10 DAI (**L**). Note the reduction in shoot meristem size from (**G**) to (**K**) and that the SAM is missing in (**L**) (arrow). The 2 and 3 indicate stage 2 or 3 flower primordia, respectively. Bars = 600 μ m for (**L**) and 100 μ m for all other panels.

(A) to (E) *CLV3* is expressed in the CZ of shoot and floral meristems (arrowheads in [A]). Expression increases dramatically after the inductive treatment. Note that color reactions in (B) to (E) were stopped after 6 h. Inset in (B) shows stage 2 flower expressing *CLV3*.

(F) Activation of the alcA:GUS reporter gene is revealed by a blue precipitate. Staining is detected in the SAM (asterisk) and floral meristems.

(G) WUS RNA is found in the SAM and two floral meristems.

(H) to (L) After *CLV3* induction, *WUS* RNA disappears rapidly from the SAM. At 24 HAI (I), only faint or no expression is detected in stage 2 flower meristems (arrowheads). *WUS* is again expressed in flower meristems at 48 and 96 HAI (insets in [J] and [K]), although *CLV3* is also highly expressed at this stage (cf. with [E], stage 2 flower meristem). *WUS* RNA is present in developing ovules (arrowhead in [L]).

expression patterns, and fluorometric GUS activity assays were performed with at least 20 individual seedlings 10 DAG for each transgenic line to quantify expression levels. We then selected five transgenes that gave GUS expression levels ranging from 16 to 320%, with pCLV3 expressing at 100% (wild-type level). The GUS reporter genes in these constructs were then replaced with a CLV3 cDNA, and these complementation constructs were transformed into clv3-2 loss-of-function mutants. clv3-2 mutants carry larger shoot and floral meristems due to unrestricted WUS expression and produce on average 5.9 \pm 0.1 carpels in the center of the floral meristem. Expression of a CLV3 cDNA from the pCLV3 promoter construct in clv3-2 plants rescued the mutant phenotype, and only two carpels were formed in each flower (Figure 7). To assay the size of the SAM, we measured the SAM surface diameter of seedlings at 10 DAG (see Supplemental Figure 2 online). We consistently found that SAM size and carpel number in floral meristems were highly correlated (Figure 7).

We then tested the other promoter variants for their rescue ability. Surprisingly, three different transgenes that controlled *CLV3* expression levels ranging from 33 to 320% of wild-type levels were able to fully rescue the mutant, which now formed only two carpels per flower. However, when *CLV3* levels dropped to 16% (in V4), carpel number in the flower and SAM size increased, indicating insufficient activation of the *CLV* signaling pathway. Together, we found that increased or decreased *CLV3* expression, ranging from 320 to 33% of wild-type levels (V1 to

V3), does not affect the size of shoot or floral meristems. Thus, the level of *CLV3* expression from stem cells is not perceived as precise information on the size of the stem cell domain by the OC, implying that an additional regulatory system is required to maintain a stable meristem size.

DISCUSSION

We studied the consequences of altering CLV3 expression levels during development for the regulation of meristem size in Arabidopsis. We first found that expression of WUS is repressed rapidly in response to increased CLV3 signaling. CLV3 expression from stem cells is predicted to depend on WUS expression, and consistent with this, we found a strong decrease of CLV3 RNA levels in meristems that paralleled the reduction of WUS RNA. A recent study used an inducible RNAi approach to downregulate CLV3 RNA levels during development and reported that within 24 HAI of CLV3 RNAi, CLV3 expression in the stem cell domain increased (Reddy and Meyerowitz, 2005). We show here that signaling between CLV3 and WUS results in drastic changes in expression levels of both genes within 3 h after altering CLV3 signaling. Although not all components involved in processing of the CLV3 peptide, receptor interaction, and further downstream signaling are known (Trotochaud et al., 1999; Brand et al., 2000; Clark, 2001b; Lenhard and Laux, 2003; Fiers et al., 2005), it is evident that changing the amount of CLV3 mRNA can affect

Table 2	Table 2. Expression of WUS in Shoot and Floral Meristems during High CLV3 Expression									
	SAMs			Fower Buds at Stage 2			Flower Buds at Stages 3 to 6			
HAI	n	With WUS	%	n	With WUS	%	n	With WUS	%	
0	3	3	100	10ª	9	90	6 ^b	5	83	
6	5	2	40	13	4	31	6	0	0	
24	6	0	0	18	4 ^c	22	9	0	0	
48	6	0	0	16	8	50	11	3	27	
96	5	0	0	13	9	69	12	8	67	

WUS expression was analyzed by RNA in situ hybridization on tissue sections at given hour after inducing CLV3 (HAI). Flower meristems were staged

according to Smyth et al. (1990). n is the total number of meristems analyzed; the total number of meristems expressing WUS and percentage of total are given.

^a Unstained bud is at early stage 2.

^b Unstained bud is at late stage 6.

^c Only weak staining.

signaling intensity through the pathway and therefore ultimately control WUS expression in the OC. This indicates that WUS expression in the entire OC is accessible for regulation by CLV3 signaling throughout development. The fast feedback regulation of CLV3 expression reveals that WUS protein is not long-lasting and that the entire regulatory system is designed to allow for a rapid adjustment of gene expression and cell fate regulation between stem cells and the OC.

We studied the development of individual meristems by scanning electron microscopy analysis of replicas taken at 24-h intervals after CLV3 induction. This showed that WUS is required to sustain growth and cell division in the meristem center. It also revealed that primordia initiation is delayed and that the size of newly initiated primordia is increased at the expense of shoot meristem size. Thus, the CZ cells, or WUS-expressing cells of the OC, could signal to the periphery to delimit organ primordia initiation. Alternatively, reduction or loss of WUS activity from the OC might allow cells to adopt peripheral cell identity as a default cell fate. By downregulating WUS, growth in the meristem center ceases and the boundary between CZ and PZ identity is shifted, so that the outermost cells of the CZ are now allowed to become incorporated into organ primordia. A converse situation was observed when WUS was released from regulation by CLV3, and cells from the PZ were respecified to adopt CZ fate (Reddy and Meyerowitz, 2005). Thus, the balanced signaling between WUS and CLV3 is fundamental to positioning of the CZ/PZ boundary.

Judging from our in situ RNA expression analysis, WUS is fully repressed in SAMs within 24 HAI. However, most plants receiving only a short induction pulse recovered from CLV3 overexpression that lasted (for a 6-h pulse) \sim 30 h. To achieve shoot meristem termination in the majority of plants, inductive treatments had to be repeated for >3 d to maintain high CLV3 levels for at least 96 h. This indicates that WUS expression, even if turned off for several days, can be reactivated during an extended period after the initial downregulation. Thus, although WUS expression can respond rapidly to alterations of CLV3 signaling, this response may be only transient and not necessarily affect the size of the stem cell population. Importantly, WUS expression is governed not only by CLV3 signaling but also by several other control systems (Baurle and Laux, 2005). STIMPY, encoding a WUS-related homeodomain protein, promotes WUS expression in the vegetative apex and can induce overproliferation of stem cells in the absence of CLV signaling (Wu et al., 2005). SPLAYED (SYD), an SNF2-type ATPase, is recruited to the WUS promoter and enhances WUS transcription within the OC. Genetic analysis predicts that SYD acts independently of CLV to control WUS expression (Kwon et al., 2005). Overexpression of miR166g in jba-1D plants results in increased WUS expression. The primary targets for this microRNA are the class III HD-ZIP proteins PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), CORONA (CNA), and REVOLUTA (Williams et al., 2005). PHB, PHV, and CNA play redundant roles in modulation of WUS expression during development (Green et al., 2005).



Figure 7. Activity of CLV3 Promoter Variants and Effects on Meristem Size.

Activity of CLV3 promoter derivatives (V1 to V4) in transgenic plants was measured by a fluorometric GUS assay and is shown as percentage of the activity of a wild-type CLV3 promoter controlling GUS activity (pCLV3 = 100%). After replacement of the GUS gene with a CLV3 cDNA, the transgenes were introduced into clv3-2 mutants. The diameters of the shoot meristems at 10 DAG and carpel numbers were measured and are shown as percentages of wild-type levels (two carpels =100%). n.t., no transgene. Bars indicate standard error; for GUS assays, n > 50 seedlings; for carpel number, n = 50; for meristem size, $n \ge 12$.

Furthermore, target genes regulated by *WUS* were found to feed back upon *WUS* (Leibfried et al., 2005), which contributes to stabilization of *WUS* expression.

WUS expression within the OC was proposed to be protected from CLV3-induced downregulation through sequestration by CLV1 (Lenhard and Laux, 2003). We found that high-level expression of *CLV3* can override possible sequestration effects. Furthermore, we did not observe a dramatic rise in *CLV1* expression upon ethanol induction that could compensate for the presence of more *CLV3* (data not shown).

In both pulsed and continuous CLV3 induction experiments, only a subset of all floral meristems exhibited an effective reduction or loss of stem cells. This was surprising because CLV3 remained expressed at high levels in flower meristems for >7 d in long-term induced plants. WUS expression was initially downregulated in all young floral meristems during the first 24 h after CLV3 induction but became detectable again in most stage 2 flowers later during the inductive period. This apparent adaptation to high-level CLV3 signaling could be explained by the time course of events: ALCR protein has already accumulated in stem cells of young floral meristems before induction and can trigger a rapid and massive increase in CLV3 expression. When new floral meristems are initiated during the inductive treatment, ALCR expression from the (WUS-dependent) CLV3 promoter is feedback regulated and will be expressed at somewhat lower levels. However, ALCR RNA is not rapidly degraded, and we found that even 7 DAI, CLV3 as well as WUS are still expressed at high levels in young floral meristems. Thus, feedback regulation of the inducible transgene cannot significantly contribute to the apparent adaptation during the induction period. Instead, meristems seem to be capable of compensating for excessive CLV3 signaling with time.

Inducible expression of *CLV3* using the *ALC* system always resulted in an extreme (100-fold and more) overexpression of *CLV3*. However, altering *CLV3* expression over a tenfold range (33 to 300% of wild-type levels) using different promoter variants did not affect the size of shoot or floral meristems. Furthermore, reduced *CLV3* expression to 16% wild-type levels was insufficient to fully rescue a *clv3* mutant, and both SAM size and carpel number increased. Expression of five copies of a *CLV3* cDNA resulted in a minor reduction of shoot meristem size by 20% but conferred no floral phenotype (Lenhard and Laux, 2003). Taken together, the limited response of meristems to a wide range of *CLV3* signal levels indicates that stem cell–derived *CLV3* expression communicates presence of stem cells but only limited information on their number to the underlying OC cells.

We have shown here that *CLV3* signaling from the CZ is rapidly sensed by the *WUS*-expressing cells of the OC. However, the response of the OC cells is, over a wide range of *CLV3* expression levels, not proportional to the amount of the emitted signal. We found that negative feedback regulation between *CLV3* and *WUS* cannot account for meristem size stability and propose that compensation for differences in *CLV3* signaling is achieved by a second feedback-regulated system that is controlled by *WUS* activity (e.g., *WUS* target genes) and acts to stabilize *WUS* expression in meristems. Such a slowly acting compensation system would thereby dampen the effects of strong fluctuations in *CLV3* levels and act as a failsafe mechanism to guarantee stem cell maintenance.

METHODS

Construction of the *iCLV3* Transgenic Plants

To create an *ALCR*-inducible *CLV3* transgene, the *CLV3* cDNA was first cloned into pACN1 as a *PstI* fragment (Salter et al., 1998). The resulting expression cassette (*alcA* promoter, the *CLV3* cDNA and *NOS* terminator) was cloned into pGPTV-HPT (Becker et al., 1992) to generate pRMALCL (*alcA:CLV3*). pRMALCL was transformed into *Arabidopsis thaliana* ecotype Landsberg *erecta* plants carrying the *CLV3:ALCR alcA*:GUS transgenes (Deveaux et al., 2003) via the floral dip method (Bechtold and Pelletier, 1998) to give *iCLV3*. For control experiments, we used the Landsberg *erecta* ecotype, *CLV3:ALCR alcA*:GUS plants (without *alcA*: *CLV3*), and uninduced *iCLV3* lines.

Growth Conditions and Ethanol Induction

Plants were grown in Quick-Pot trays at 21 to 28° C, with illumination of 9 Wm^{-2} . Plants were kept in short days (10-h day/14-h night) for 5 weeks after germination before flowering was induced by transfer to long days (16-h day/8-h night). Induction of *CLV3* expression by ethanol vapor (Deveaux et al., 2003) started 4 to 10 d after the transfer to long days, when inflorescence axes were shorter than 7 mm long and the oldest flower bud was still closed (before stage 13 according to Smyth et al., 1990). During inductions, plant trays were covered with transparent hoods.

RNA in Situ Hybridization and GUS Staining

Protocols for GUS stainings, RNA in situ hybridizations, and probe preparation for *CLV3* and *WUS* have been described previously (Brand et al., 2002). As a minor modification, in situ hybridizations and detections were performed with an InSituPro VS robot (Intavis).

Phenotypic Analysis

Photographs were taken with a Canon Powershot G2 digital camera mounted to a Zeiss dissecting microscope, or with an Axiocam HR camera attached to a Zeiss Axioscope II microscope. Digital photographs were collated with Adobe Photoshop.

Quantitative Real-Time RT-PCR

For RNA quantifications, total RNA was isolated from seedlings after dissecting leaves and cotyledons using the RNeasy plant mini kit (Qiagen). RNA quality was assayed using the Bioanalyzer 2100 (Agilent). First-strand cDNA synthesis was performed with 5 µg of total RNA using Superscript II RNase H⁻ reverse transcriptase and random oligonucleotide primers (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The 20- μ L cDNA reaction was diluted 1:75 with deionized water, and 5 μ L were used for each RT-PCR amplification. Amplifications were performed as triplicates in 96-well plates in a 25-µL reaction volume containing 12.5 μ L 2× Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG with 0.5 μ L ROX dye (Invitrogen). Reactions were performed on a GeneAmp 5700 sequence detection system (Applied Biosystems). For all samples, cDNAs were normalized using Cytochrome B5 isoform 1 (AT5G53560). Primers for all amplifications were located on an exon-exon border to prevent amplification of potentially contaminating genomic DNA. Primers used were as follows: CLV3 (5'-GTTCAAGGACTTTCCAACCGCAAGATGAT-3'; 5'-CCTTCTCTGCTTCTCCATTTGCTCCAACC-3'), WUS (5'-CCAGCTT-CAATAACGGGAATTTAAATCATGCA-3'; 5'-TCATGTAGCCATTAGAAG-CATTAACAACACCACAT-3'), and Cytochrom B5 (5'-CGACACTGCAAG-GGACATGA-3'; 5'-ACGTATGTCCTAGTTGCTGGAACA-3'). To distinguish between transcripts from the inducible or the endogenous CLV3 gene,

the following primers were used: inducible *CLV3* (3'-primer in the NOS terminator) (5'-TGTGAACCCACCAAGACAGC-3'; 5'-AACAAGAAGCA-GAAGAGTAGTAGTAGTAGTAGCA-3'), and endogenous *CLV3* (5'-primer in the 5'-untranslated region of *CLV3*) (5'-TCTCTCTCACTCAGTCACTTT-CTCTCTAA-3'; 5'-AACAAGAAGCAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGTAGTAGTAGTAGCA-3').

Construction of CLV3 Promoter Variants and GUS Activity Assays

The T-DNA vector p*CLV3* (pBU16) that allows *GUS* expression from the *CLV3* promoter has been described previously (Brand et al., 2002). Promoter variants (V) were created by progressively deleting 5' or 3' DNA sequences from the *CLV3* regulatory sequences in pBU16. Deletions are as follows: V1, 5' 320 bp and 3' 660 bp; V2, 5' 320 bp; V3, 3' 290 bp; V4, 5' 1190 bp. Complementation constructs were obtained by cleaving pBU16 with *Pstl-Bam*HI and inserting a full-length *CLV3* cDNA into these sites. Transformation of *clv3-2* mutants and selection of transgenic plants were performed according to previously described procedures (Bechtold and Pelletier, 1998). At least five independent lines were analyzed for each promoter variant.

For quantification of GUS activity, between 20 and 60 10-d-old *Arabidopsis* seedlings were harvested and analyzed according to published protocols (Weigel and Glazebrook, 2002). Complementation was quantified by counting carpel valve numbers from the first five siliques on 10 plants for each transgenic line. SAM sizes were measured as micrometer surface diameter from cleared seedlings at 10 DAG using Nomarski optics and ImageJ software for image analysis. At least 12 meristems were measured for each genotype.

Quantitative Analysis of Apex Geometry and Growth

In vivo observations and quantitative analysis were performed as described previously (Dumais and Kwiatkowska, 2002; Kwiatkowska, 2004). Briefly, sequences of images showing the surface of individual shoot apices at consecutive instants were obtained using replicas (dental polymer molds) taken from the surface of individual shoot apices. Epoxy resin casts obtained from replicas were analyzed in a scanning electron microscope (LEO435VP; Oxford Instruments). Replicas were taken every 24 h, always from the apex of the main inflorescence axis. Thirteen induced and six control apices were analyzed. Quantitative analysis was performed with the aid of computer programs written in Matlab (The Mathworks). Relative growth rates in area (areal growth rates) for each cell were computed and plotted on the cell wall pattern as it appeared at the beginning of the analyzed time interval. Additionally, cells, which divided during the time interval between successive replicas, were recognized based on the comparison of the cell wall pattern on the apex surface at consecutive instants. Analysis of variance followed by a multiple comparison of means using a Tukey's honestly significant difference meanseparation test for unequal sample sizes were performed to compare values of SAM and flower primordium areas, numbers of cells counted along the SAM radius, and areal growth rates of cells. Statistica software (Statsoft) was used for this analysis.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative data library under accession numbers At2g27250 (CLV3) and At2g17950 (WUS).

Supplemental Data

- The following materials are available in the online version of this article. **Supplemental Figure 1.** Analysis of Cell Behavior.
 - Supplemental Figure 2. Meristem Size Measurements.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rebecca Kloppenburg, Carin Theres, and Silke Winters for technical support. We also thank Yvonne Stahl and Marina Bureau for critical reading of the manuscript and Jan Lohmann for helpful comments and for communicating results prior to publication. Work by R.M. and L.B. was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 590) to R.S.

Received December 15, 2005; revised March 16, 2006; accepted March 20, 2006; published April 7, 2006.

REFERENCES

- Baurle, I., and Laux, T. (2003). Apical meristems: The plant's fountain of youth. Bioessays 25, 961–970.
- Baurle, I., and Laux, T. (2005). Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the Arabidopsis shoot meristem. Plant Cell 17, 2271–2280.
- Bechtold, N., and Pelletier, G. (1998). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. Methods Mol. Biol. **82**, 259–266.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol. Biol. 20, 1195–1197.
- 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.
- Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M., and Simon, R. (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. Plant Physiol. 129, 565–575.
- Carles, C.C., and Fletcher, J.C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: The art of a dynamic balance. Trends Plant Sci. 8, 394–401.
- 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.
- Clark, S.E. (2001a). Cell signalling at the shoot meristem. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 276–284.
- Clark, S.E. (2001b). Meristems: Start your signaling. Curr. Opin. Plant Biol. 4, 28–32.
- Deveaux, Y., Peaucelle, A., Roberts, G.R., Coen, E., Simon, R., Mizukami, Y., Traas, J., Murray, J.A., Doonan, J.H., and Laufs, P. (2003). The ethanol switch: A tool for tissue-specific gene induction during plant development. Plant J. **36**, 918–930.
- Dumais, J., and Kwiatkowska, D. (2002). Analysis of surface growth in shoot apices. Plant J. 31, 229–241.
- Fiers, M., Golemiec, 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.
- 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.
- Green, K.A., Prigge, M.J., Katzman, R.B., and Clark, S.E. (2005). CORONA, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in Arabidopsis, regulates stem cell specification and organogenesis. Plant Cell **17**, 691–704.
- Gross-Hardt, R., Lenhard, M., and Laux, T. (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during Arabidopsis ovule development. Genes Dev. 16, 1129–1138.

- Hobe, M., Müller, R., Grünewald, 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.
- Kwiatkowska, D. (2004). Surface growth at the reproductive shoot apex of *Arabidopsis thaliana* pin-formed 1 and wild type. J. Exp. Bot. 55, 1021–1032.
- Kwon, C.S., Chen, C., and Wagner, D. (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. Genes Dev. **19**, 992–1003.
- 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.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G., and Laux, T. (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. Cell 105, 805–814.
- Lenhard, M., and Laux, T. (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. Development 130, 3163–3173.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. Cell **105**, 793–803.
- 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.

- Reddy, G.V., and Meyerowitz, E.M. (2005). Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the Arabidopsis shoot apex. Science **310**, 663–667.
- Salter, M.G., Paine, J.A., Ridell, K.V., Jepson, I., Greenland, A.J., Caddick, M.X., and Tomsett, A.B. (1998). Characterisation of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants. Plant J. 16, 127–132.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., and Laux, T. (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems in maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell 100, 635–644.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. Plant Cell 2, 755–767.
- 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 Rhorelated protein. Plant Cell **11**, 393–406.
- Weigel, D., and Glazebrook, J. (2002). Arabidopsis: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M., and Meyerowitz, E.M. (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in Arabidopsis flowers. Plant Cell 16, 1314–1326.
- 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.
- 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.

3.2.2 Die Suche nach direkten und indirekten Zielgenen des CLV3-Signalweges

Neben *WUS* sind eine Reihe weiterer positiver Regulatoren des Stammzellschicksals bekannt. Dennoch ist bisher unklar, welche Gene neben *CLV3* exklusiv in den Stammzellen exprimiert sind und somit vermutlich zu deren Identität beitragen. Da *CLV3* sich selbst durch die Repression von *wus* negativ reguliert, ist anzunehmen, dass auch weitere in den Stammzellen exprimierte Gene dieser Regulation unterliegen. Daher sollten die Konsequenzen der induzierten *CLV3*-Expression mittels *Affymetrix*-Genchips auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Dazu wurden dieselben RNAs von *iCLV3*-Pflanzen verwendet, die für die Expressionsprofile von endogenen und induzierten *CLV3* und *WUS* verwendet wurden (3.2.1; Fig.2B). Das vor der Induktion und drei und 24 Stunden danach geerntete und zuvor unter LT aufgezogene Pflanzenmaterial wurde weitgehend von den Blättern und dem Hypocotyl einschließlich der Wurzel befreit. Es wurden jeweils zwei Genchips pro Zeitpunkt hybridisiert.

Die Chipdaten zeigten 24 Stunden nach Induktionsbeginn (HnI) für CLV3 eine kontinuierliche Erhöhung der Expression auf das siebenfache der ursprünglichen Expression. Für WUS konnte keine Veränderung festgestellt werden. Das bestätigt die weit geringere Sensibilität der Genchip-Hybridisierung für Veränderungen der Expressionsstärke im Vergleich zur real time-RT-PCR, insbesondere bei schwach exprimierten Genen wie WUS. Die weitere Analyse ergab, dass vermutlich ein Großteil der beobachten Veränderung der Expressionsstärke der 174 nach drei Stunden robust hoch- und 50 abregulierten Genen durch die cricadiane Rhythmik und nicht durch die Erhöhung der CLV3-Expression verursacht wurde (Daten nicht gezeigt). Somit sind diese Daten als Grundlage weiterer Untersuchungen weitgehend ungeeignet. Eine Auffälligkeit ergab sich dennoch aus dem Vergleich mit den DRN-GR-Genchipdaten (3.1.3). Von den 44 durch die DRN-Induktion nach 24 Stunden robust abregulierten Genen waren durch die CLV3-Induktion zehn robust und zehn semirobust hochreguliert. Das legt bei ca. 24.000 untersuchten Genen den Schluss nahe, dass DRN und der CLV-Signalweg antagonistisch auf die Expression einiger meristematischer Gene wirken. Unter diesen entgegengesetzt regulierten Genen befanden sich fünf der acht durch DRN robust abregulierten Mitglieder des Jasmonsäure-Signalweges und EXPL1 und MERI-5, die Schlüsselregulatoren der Zellstreckung sind. Bei den fünf Mitgliedern des Jasmonsäure-Signalweges ist nach 24-stündiger CLV3-Induktion jedoch nur noch bei einem erhöhte Expression festzustellen. Somit bleibt unklar, ob es durch die CLV3-Induktion zu einer kurzfristigen Antwort des Jasmonsäure-Signalweges kommt oder ob dieser auch durch die cricadiane Rhythmik kontrolliert wird.

Liste 2: Die durch die *DRN*-Induktion robust abregulierten Gene: Vergleich der Expressionsdaten von *DRN-GR* mit denen von *iCLV3*

DRN-	-GR	iCLV	
Tril	ann	34111 24	8
-2,1	-0,7	1,4 -0	At2g24850 (TAT3 / JA-induzierbare Aminotransferase)
-2,0	-1,9	2,2 -0	At2g34600
-1,8	-1,2	1,0 0	At1g53885 (Seneszenz-assoziiertes Protein)
-1,8	-1,4	0,4 0	At1g54020 (Myrosinase-assoziierte Hydrolase)
-1,5	-1,0	1,3 0,	At1g17380
-1,5	-1,1	1,7 -0	At1g17420 (<i>LOX</i>)
-1,5	-0,9	-0,8 -1	At3g45140 (LOX2)
-1,5	-1,1	2,0 0	At1g72520 (LOX)
-1,4	-0,9	-1,3 -1	At5g24420 (6-Phosphogluconolactonase)
-1,4	-1,2	0,8 1	At4g21850
-1,3	-0,9	0,4 0	At5g47240 (NUDT8 / Hydrolase)
-1,3	-1,6	1,3 1	At3g45970 (EXPL1 / Expansin)
-1,3	-1,0	0,9 0,	At3g09940 (JA-induzierbare Monodehydroascorbatreductase)
-1,3	-1,1	0,0 0	At1g61120 (Terpen-Synthase)
-1,2	-1,3	0,1 0	At1g18710 (JA-induzierbarer MYB-Transkriptionsfaktor)
-1,2	-1,2	0,9 1	At4g30270 (MERI-5 / GA-induzierte Endo-Xyloglucan-Transferase)
-1,2	-1,4	-0,4 0	At3g13980
-1,2	-0,9	-0,1 0	At4g04840 (Transkriptionsfaktor)
-1,2	-0,7	1,0 0	At5g13220
-1,2	-1,2	0,0 0	At4g12510 ($L1P$)
-1,1	-1,0	-0,9 -1	At1g/6/90 (JA-induzierbare O-Methyltransferase)
-1,1	-1,2	0,2 0,	At5g03120
-1,1	-0,8	7,0 0	At1g22690 (GA-reguliertes Protein)
-1,1	-0,9	0,3 1	Alzg14900 (GA-reguliertes Protein)
-1,1	-0,9	-0,4 -0	At4g37410 (Cytochrom P450, Monooxygenase)
-1,0	-1,2	-0,1 0	Alby41140
-1,0	-0,5	2 ,1 1,	
-1,0	-0,0	0,0 0	At 1932040 (MTC2 / JASMONATE INSENSITIVET)
-1,0	-1,0	-0,2 -0	Atzg22330 (Cytochioni F430, involvient in der IAA-Synthese)
-1,0	-0,5	-0,1 -1	A(3900070 (FGF27F0))
-1,0	-0,7	0,7 -0	A(2g)2(150 (H)g)(10ase)
-1,0	-1,1	0,2 0	Atta65400
-1,0	-0,5	0.2 0	At1q52190 (Pentid-Transporter)
-1,0	-2.0	-0.1 -0	5S rBNA
-1,0	-0.7	0.2 -0	At4a15440 (Hydroperoxidlyase)
-1,0	-0.7	0,2 0	At5g42650 (Cytochrom P450 74A / Allenoxidsynthase)
-1 0	-1 1	0.1 0	At1q14120 (2-Oxoglutarat-Dioxygenase)
-1.0	-1.0	0,1 0	At3a08670
-1_0	-1.4	0.1 -0	At2q34520 (RIBOSOMAL PROTEIN S14)
-1.0	-0.4	0.6 0	At3q44860 (Methyltransferase)
-1.0	-1.1	0.0 0	At5q57780
-1.0	-0.9	0.0 0	At5g18060 (Auxin-induziertes Protein)
-1.0	-0,8	-2,01	At1g52040 (MYROSINASE BINDING PROTEIN 1)

-1,0 ≥ robust abreguliert	
1,0 ≤ robust hochreguliert	
- 0,5 ≥ semirobust abreguliert	
0.5 < semirobust hochreguliert	

Die 44 durch die *DRN*-Induktion robust abregulierten Gene: Vergleich der Konsequenzen der *DRN*-Induktion mit der der *CLV3*-Induktion für die Expressionsrate dieser Gene. Es sind die Verhältnisse der Expressionsrate von 1 Tnl / 0 Tnl bzw. 3 Tnl / 0 Tnl (*DRN-GR*) und 3 Hnl / 0 Hnl bzw. 24 Hnl / 0 Hnl (*iCLV3*) in logarithmierter Form angegeben (siehe 3.1.3). Tnl: Tage nach Induktionsbeginn; Hnl: Stunden nach Induktionsbeginn.

3.3 Isolierung von Suppressormutanten der CLV3-Überexpression in Arabidosis thaliana

Eine Reihe von Komponenten der *CLV3*-Signaltransduktion konnte in den letzten Jahren identifiziert werden (Waits und Simon, 2000; Ishiguro et al., 2002; Song et al., 2006). Die bisherigen genetischen Analysen und theoretische Überlegungen legen jedoch die Existenz weiterer Komponenten nahe. So sind z.B. die Null-Allele des putativen Liganden CLV3, *clv3-2* und *clv3-9*, stärker als die Null-Allele der LRR-Rezeptoren CLV1 und CLV2. Somit könnte ein von *CLV1/CLV2*-unabhängiger paralleler *CLV3*-Signaltransduktionweg existieren. Daher war es das Ziel, im dritten Teil dieser Arbeit, einige der noch fehlenden Elemente des *CLV3*-Signalweges zu identifizieren und zu charakterisieren.

3.3.1 Durchführung der Suppressormutagenese

Um Gene zu identifizieren, die Komponenten der *CLV3*-Signaltransduktion sind, wurde eine EMS-Mutagenese mit transgenen *35S*::*CLV3*-Samen (Ökotyp L*er*) von Rüdiger Simon durchgeführt. Die Überexpression von *CLV3* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *CaMV35S* (*35S*) Promotors führt zum Verlust der *WUSCHEL* (*WUS*) Expression. Daher kopieren *35S*::*CLV3*-Pflanzen den Phänotyp von *wus*-Mutanten (Abb.4A,B), die die Stammzell-Population nicht aufrecht erhalten können. Es werden immer wieder Stammzellen angelegt, diese gehen jedoch stets verloren, so dass die Pflanzen sehr lange in der vegetativen Phase verharren (Abb.4B; Brand et al., 2000).

Die Unterbrechung des *CLV3*-Signaltransduktionsweges durch die Mutation eines seiner Komponenten sollte in *35S::CLV3*-Pflanzen zum Erhalt der *WUS*-Expression und somit der Stammzellen führen. Als unmittelbare Folge würden die homozygoten Suppressormutanten früher als die *35S::CLV3*-Kontrollpflanzen blühen. Daher wurde die M2-Generation der Mutagenese von Rüdiger Simon nach frühblühenden *35S::CLV3*-Pflanzen durchmustert (Abb.4C). Die Durchmusterung der M2-Nachkommen von ca. 40.000 M1-Pflanzen erfolgte in Pools. Die von Rüdiger Simon identifizierten putativen Suppressorlinien wurden von mir weiter charakterisiert.

Von den über hundert in der M2-Generation selektierten putativen Suppressormutanten trugen 21 Pflanzen keulenförmige Schoten mit erhöhter Karpellenanzahl (7.3.1, Tab.20). Dieser Schotenphänotyp ist typisch für *clv*-Mutanten und deutet auf vergrößerte Blütenmeristeme hin. *clv1*- und *clv2*-Mutanten wurden bereits als Suppressoren der *CLV3*-Überexpression beschrieben (Abb.4D; Brand et al., 2000). Wie erwartet erwiesen sich die meisten Mutanten mit keulenförmigen Schoten als *clv1*oder *clv2*-Allele (3.3.2).

Eine weitere Mutante mit keulenförmigen Schoten war nicht allelisch zu *clv1* oder *clv2* und wurde auf Grund des Schotenphänotyps *coryne* (*crn*: griech. *Keule*) genannt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen, auf die sich der dritte Teil konzentriert, konnte *CRN* als neue

Komponente des *CLV3*-Signaltransduktionsweges identifiziert werden (3.3.3). Die ursprünglich identifizierten *crn*-Linien tragen eine weitere Mutation, *korallenriff (krf)*, die den *crn*-Phänotyp modifiziert. Dieser additive Phänotyp wurde ebenfalls analysiert (3.3.3.11).

Des Weiteren wurde ein neues *CURLY LEAF* (*CLF*) Allel in dieser Mutagenese identifiziert (3.3.4). Es konnte bisher jedoch nicht endgültig geklärt werden, ob die Suppression auf der Unterbrechung des *CLV3*-Signalweges beruht oder *CLF* eine Komponente eines *CLV*-unabhängigen Signalweges ist, dessen Störung den Verlust der Stammzellen durch die *CLV3*-Überexpression kompensiert.

Mehrere Linien zeigten einen *apetala2-* bzw. einen *primordia timing-*artigen Phänotyp. Bei der Segregationsanalyse erwiesen sich beide Phänotypen jedoch nicht ursächlich für die Suppression der *CLV3-*Überexpression. Der Großteil der übrigen putativen Suppressormutanten zeigte keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Diese wurden nicht weiter analysiert, da aufgrund der häufigen Inaktivierung des *35S-*Promotors keine Kartierung dieser Linien auf der Basis der Suppression des *CLV3-*Überexpressionsphänotyps möglich ist.



Abb.4: *CLV3*-Überexpression und Suppressormutagenese. (A) 35S::CLV3-Pflanze, 3 WnK (Foto Ulrike Brand). 35S::CLV3-Pflanze sind, wie *wus*-Mutanten, nicht in der Lage ihre Stammzellpopulation kontinuierlich aufrecht zu erhalten. Nach der Bildung weniger Blätter kommt es zum Meristemarrest (Pfeil). In der weiteren Entwicklung werden immer wieder Stammzellen angelegt, die anschließend erneut verloren gehen. Das kurzfristige Auftreten von Stammzellen reicht aus, um wiederholt ein bis zwei Blätter anzulegen. (B) 35S::CLV3 in Ler. Nach vier Monaten hat sich eine große Anzahl von Rosettenblättern akkumuliert, ohne dass ein Spross gebildet wurde. In wenigen Fällen kommt es in der Folge von Transgeninaktivierung dennoch zur verspäteten Ausbildung eines Sprosses mit fertilen Blüten, so dass Samen geerntet werden können (ohne Abb.). (C) Die M2-Generation der Suppressormutagenese wurden auf früher blühende Pflanzen hin durchmustert (Pfeilspitze). (D) Modell des *CLV3*-Signalweges mit den möglichen Positionen von Suppressoren (Pfeilspitze). Maßstab = 5 mm.

3.3.2 Neue *clv1*- und *clv2*-Allele

Ein guter Test für die Effizienz einer Suppressormutagenese ist das Auffinden bereits bekannter Suppressoren. Bekannte Suppressoren der *CLV3*-Überexpression sind Mutationen in den LRR-Rezeptoren CLV1 und CLV2 (Brand et al., 2000). Durch Testkreuzungen mit *clv1-4* und *clv2-1* konnten in fünf Pools *clv1*- und in zwei Pools *clv2*-Allele identifiziert werden (7.3.1, Tab.20). Die Anzahl der neuen *clv1*-Allele könnte größer fünf sein, da in einigen Pools in der M2-Generation mehr als eine *clv1*-Pflanzen gefunden wurden. In den meisten Fällen wird es sich aber vermutlich um die Abkömmlinge einer M1-Pflanze handeln. Dies wird sich endgültig nur durch die Sequenzierung der jeweiligen *clv1*-Allele klären lassen.

Die meisten *clv1*-Allele wie *clv1-1* und *clv1-8* sind dominant-negativ und weisen eine Punktmutation in der LRR-Rezeptor-Domäne oder der Kinase-Domäne auf. Bei ihnen ist die Karpellenanzahl stärker erhöht als bei Null-Allelen wie *clv1-11*, bei dem ein *Ds*-Element in die LRR-Rezeptordomäne inseriert ist (Diévart et al., 2003). Die Karpellenanzahl pro Schote ist bei *clv1-* und *clv2*-Null-Allelen etwa gleich stark erhöht (Abb.5C und 9A,B).

Um einen Überblick über die Stärke der in der Suppressormutagenese gefundenen neuen *clv1*- und *clv2*-Allele zu erhalten, wurden bei einigen der Linien, die noch das 35S::*CLV3*-Transgen trugen, die Karpellenanzahl bestimmt. In Abb.5A,B sind typische Schoten der neuen *clv1*- und *clv2*-Allele abgebildet.

Die meisten der untersuchten neuen *clv1*-Allele haben eine signifikant ($p \le 0,001$) höhere durchschnittliche Karpellenanzahl als die Null-Allel-Kontrolle *clv1-11*. Es handelt sich daher vermutlich um dominant-negative Allele. Die höhere Karpellenanzahl könnte auch auf einer partiellen Co-Suppression des *CLV3*-Gens beruhen. Eine solche Co-Suppression wurde jedoch bisher, im Gegensatz zu der alleinigen Inaktivierung des Transgens, nicht beobachtet (Ulrike Brand, Dissertation, 2002 und eigene Beobachtung). Die durchschnittliche Karpellenanzahl von *clv1-25/8* zeigt dagegen keine signifikante Abweichung (p = 0,744) zu *clv1-11. clv1-25/8* könnte somit, da EMS-Mutagenesen normalerweise Punkmutation verursachen, das erste bekannte, auf einer Punkmutation beruhende *clv1*-Null-Allel sein.

Die durchschnittliche Karpellenanzahl des *clv2-24/3*-Allels ist leicht signifikant kleiner als die des *clv2-1*-Allels (p = 0,022), das wie alle bisher beschriebenen *clv2*-Allele ein putatives Null-Allel ist (Jeong et al., 1999). Insoweit könnte das *clv2-24/3*-Allel hypomorph sein. Das Pflanzenwachstum dieser Linie ist jedoch im Vergleich zu *clv2-1* reduziert (nicht gezeigt), was auf Hintergrundmutationen beruhen könnte. Durch Stress induzierter Zwergwuchs bei *clv1-*, *clv2-* und *crn-*Mutanten führt zur Suppression des Karpellenphänotyps (eigene Beobachtung). Die eigentliche Stärke der neuen *clv1-* und *clv2-*Allele wird sich endgültig erst nach der Auskreuzung des *35S::CLV3-*Transgens und putativer Hintergrundmutationen klären lassen.

Durch das Auffinden bekannter Suppressoren der *CLV3*-Überexpression konnte die Effizienz der Mutagenese bestätigt werden. Die neu isolierten *clv1*- und *clv2*-Allele könnten zudem zum weiteren Verständnis der Funktion dieser beiden Gene beitragen. Daher empfiehlt es sich, diese neuen Mutanten zu sequenzieren und phänotypisch genauer zu beschreiben.



Abb.5 Neue *clv1*- und *clv2*-Allele, Schotenphäntyp. (A) Schoten einiger der in der Suppressormutagenese der *CLV3*-Überexpression isolierten *clv1*-Linien im Vergleich zu *clv1-11*, *clv1-8* und Ler. Schoten von starken *clv*-Allelen bilden einen fünften inneren Wirtel aus, äußerlich erkennbar durch eine Verdickung an der Schotenspitze. In seltenen Fällen brechen die inneren karpelloiden Organe durch die äußeren Karpellen nach außen (*). (B) Schoten der beiden neu isolierten *clv2*-Linien *clv2-5/2* und *clv2-24/3* im Vergleich zu *clv2-1* und Ler. (C) Durchschnittliche Karpellenanzahl pro Schote einiger der neu isolierten *clv1*-Allele und der beiden neuen *clv2*-Allele (grau) im Vergleich zu bereits beschrieben *clv1*- und *clv2*-Allelen und Ler (weiß). Die schwarzen Balken sind keine Fehlerbalken, sondern markieren die Spannbreite der detektierten Karpellenanzahl pro Schote. *clv1-4/6* n = 16; *clv1-4/9* n = 39; *clv1-6/27* n = 19; *clv1-25/8* n = 30; *clv1-11* n = 48; *clv1-1* n = 48; *clv1-8* n = 35; *clv2-5/2* n = 12; *clv2-24/3* n = 49 *clv2-1* n = 50; Ler, n.d. da immer zwei Karpellen pro Schote. Maßstab = 5 mm.

3.3.3 CORYNE, ein neue Komponente des CLV3-Signalweges

Von den in der Mutagenese isolierten 21 Suppressormutanten mit keulenförmigen Schoten (= erhöhte Karpellenanzahl) erwiesen sich zwei Linien desselben Pools (6/16 und 6/22) als nicht allelisch zu *clv1* oder *clv2* (3.3.1 und 3.3.2; Abb.6; 7.3.1, Tab.20). Im Laufe der Analyse konnte gezeigt werden, dass beide Linien die gleiche Punktmutation tragen, die ursächlich für den Schotenphänotyp ist (Abb.6E; 3.3.3.7 und 3.3.3.8). Die Namensgebung der *clavata* (lat. *Keule*) Mutanten beruht auf ihren keulenförmigen Schoten, dementsprechend wurde die neue Mutante nach dem griechischen Heteronym für Keule *coryne* (*crn*) genannt.

3.3.3.1 crn-Mutanten supprimieren die CLV3-Überexpression

Die beiden Suppressorlinien 6/16 und 6/22 teilen mit den *clv*-Mutanten das gemeinsame Merkmal keulenförmiger Schoten mit zusätzlichen Karpellen. Durch Komplementationstests mit *clv1-4* bzw. *clv2-1* konnte jedoch gezeigt werden, dass 6/16 und 6/22 weder Mutationen in dem *CLV1-*, noch dem *CLV2-*Gen tragen. Zudem besitzt der pleiotrope Phänotyp von 6/16 und 6/22 Merkmale, die untypisch für *clv-*Mutanten sind. Beide Suppressorlinien sind zwergwüchsig und ihre stark fasziierten Infloreszenzmeristeme produzieren in der späteren Entwicklung statt Blüten karpelloide Gewebe. In der im Folgenden dargestellten Analyse der Auskreuzung mit *Ler* konnte gezeigt werden, dass die Suppressorlinien 6/16 und 6/22 Mutationen in zwei verschiedenen Genorten tragen. Die Mutation in dem *CRN* genannten Gen verursacht die keulenförmigen Schoten, wogegen die im *KORALLENRIFF* (*KRF*) genannten Gen den Zwergwuchs und die Überproliferation von karpelloidem Gewebe bewirkt.

Die Linie 6/22 wurde gegen L*er* zurückgekreuzt, um *crn*-Pflanzen ohne 35S::*CLV3* (pBU6) Transgen zu erhalten. Die F1-Pflanzen zeigten wie erwartet einen *wus*-artigen Phänotyp (ohne Abb.), was darauf hindeutet, dass die Funktionstüchtigkeit des 35S::*CLV3*-Transgens nicht durch die EMS-Mutagenese beeinträchtigt wurde. In der F2 einer Linie (A1 = Auskreuzunglinie 1; N = 92) trugen 23,9% der Pflanzen keulenförmige Schoten, dieses Merkmal wird somit rezessiv vererbt.

Die Mehrzahl der F2-Pflanzen ohne keulenförmige Schoten zeigten im vegetativen Stadium einen *wus*-artigen Phänotyp einschließlich vorübergehendem Meristemarrest, erhöhter Rosettenblattbildung und verspäteter Sprossentwicklung. Dieser Phänotyp wurde dagegen bei den Pflanzen mit keulenförmigen Schoten nicht beobachtet. Daraufhin wurden 24 F2-Pflanzen mit keulenförmigen Schoten getestet, ob sie das *35S::CLV3*-Transgen tragen. Mittels PCR konnte bei neun Pflanzen das Transgen nachgewiesen werden (siehe 2.1.5, pBU6). Die beobachtete Segregation des Transgens (15:9) wich nicht signifikant von der erwarteten 3:1-Segregation ab (p = 0,16). Das legt nahe, dass in den Pflanzen mit keulenförmigen Schoten die *CLV3*-Überexpression supprimiert wird.

Von insgesamt 27 F2-Nachkommen mit keulenförmigen Schoten der F1-Pflanze A1 zeigte eine Pflanze (A1.17, ohne 35S::*CLV3*-Transgen) einen verminderten Zwergwuchs und im späterem Stadium keine Proliferation von karpelloidem Gewebe. Beide Merkmale, Zwergwuchs und Überproliferation von karpelloidem Gewebe, kosegregieren in der F3 von A1.17 1:3. Es handelt sich somit vermutlich um einen weiteren Genlokus (*krf*; s.o.). Die von *krf* verursachte Überproliferation von karpelloidem Gewebe trat nicht unabhängig vom *crn*-Phänotyp (= keulenförmige Schoten) auf (3.3.3.10). Die Überproliferation ist jedoch, abhängig von den Umweltfaktoren, Bestandteil des *crn*-Phänotyps (3.3.3.3). Somit könnte es sich bei *krf* um einen Enhancer der *crn*-Mutation handeln. Die Beobachtung eines Austauschs bei 27 F2-Pflanzen der Kreuzung 6/22 (*crn/krf*) x Ler spricht für eine sehr enge Kopplung von *crn* und *krf* (1/62 = 1,6 cM). Bei nur einem Austausch kann der berechnete cM-Wert nur als Hinweis gewertet werden. Für eine Grobkartierung wäre eine höhere Anzahl von Ereignissen erforderlich.

Von den A1.17 abstammenden F3-Linien wurden die selektiert, die keinen Zwergwuchs (= krf) in der F4-Generation aufwiesen. In vielen dieser Linien zeigten einige Pflanzen eine stark reduzierte Internodienstreckung der Sprossachse und den damit einhergehenden Verlust der Apikaldominanz, der zur Übergipfelung durch die Seitentriebe führt. Dieser tritt auch bei *crn/krf*-Pflanzen auf (Abb.6A,B). Beide Merkmale deuten auf eine Störung der Meristemfunktion hin, die jedoch nur bei 10 von 96 F4-Pflanzen aus insgesamt 10 F3-Linien auftrat. Diese Aufspaltung weicht signifikant von einer 1:3 Aufspaltung ab (p = 0,001), die bei der Segregation einer weiteren rezessiven Hintergrundmutation zu erwarten wäre. Daher könnte der gelegentliche Verlust der Apikaldominanz Bestandteil des *crm* Phänotyps sein, der sporadisch auch bei *clv2-1*-Mutanten auftritt (eigene Beobachtung). Zwei Linien (A1.17.1 und A1.17.2) wurden für die weitere Analyse des *crm*-Phänotyps verwendet.

Um zu testen, ob der *crn*-Phänotyp tatsächlich ursächlich für die Suppression der *CLV3*-Überexpression ist und nicht etwa die Kombination *crn/krf*, wurde die nicht transgene *crn*-Linie A17.17.2 erneut mit 35S::*CLV3* bzw. *HIS*::*CLV3* transformiert. Der *HistonH4*-Promotor (*HIS*) wird auf Grund der essentiellen Rolle von *HistonH4* für die Pflanzenentwicklung nicht inaktiviert. Obwohl *HistonH4*, im Gegensatz zu dem ubiquitär aktiven 35S-Promotor, nur in sich teilenden Pflanzenzellen exprimiert wird, sind die von beiden Transgenen verursachten Phänotypen vergleichbar. Das erklärt sich durch die nicht zellautonome Funktion von *CLV3* (Brand et al., 2000). Als Kontrolle wurden ebenfalls *clv1-11-*, *clv1-4-* und L*er*-Pflanzen mit *HIS*::*CLV3* und L*er*-Pflanzen mit 35S::*CLV3* transformiert. Alle in der T1 identifizierten *CLV3-*überexprimierenden L*er*-Pflanzen zeigten einen *wus-*artigen Phänotyp (7.3.1, Tab.20; Abb.6F). Bei den transgenen *crn-* und *clv1-*Pflanzen wurde dagegen die Blattrosette in einem weitgehend wildtypischen Muster angelegt (Tab.8; Abb.6G) und es kam zu keiner Verzögerung der Blühinduktion. *crn* ist somit wie *clv1-* und *clv2-*Mutanten ein starker Suppressor der *CLV3-*Überexpression. Bei 35S::*CLV3/crn-*Pflanzen kommt es manchmal zu frühzeitigem Auswachsen von Seitentrieben (Abb.6H). Eine Erklärung dafür könnte eine kurzfristige eventuell durch die *CLV3*-Überexpression verursachte Funktionsstörung des primären SAM sein.



Abb.6: *crn* und *crn/krf*. Ausgangslinien (6/16, 6/22), Auskreuzungen (A1.17) und Transformation mit *HIS*::*CLV3*. (A) Vergleich des Habitus der Ausgangslinie 6/22 (*crn/krf* mit 35S::*CLV3*) mit *crn* (A1.17; F3 der Auskreuzung mit Ler ohne *krf*), *clv1-1* und Ler. Einige *crn*-Pflanzen (A1.17) zeigen unter Normalbedingungen eine stark reduzierte Internodienstreckung des Haupttriebes (*) und einen Apikaldominanzverlust, der zur Übergipfelung durch die Seitentriebe führt. (B) Vergleich des Habitus der Ausgangslinie *crn/krf* (6/16 mit 35S::*CLV3*) mit *crn* (A1.17.1). (C+D) Unter Kurztagbedingungen fasziiert die *crn*-Sprossachse. Die Ausprägung dieses Phänotyps variiert von stark (C, Pfeilspitze) bis wildtypisch (D, Pfeilspitze). (E) *crn*-Schoten mit (von links nach rechts) vier, zwei und einem Karpell im Vergleich zu Ler. (F-H) Transgene *HIS*::*CLV3*-Pflanzen (T1; 3 WnK). Alle *HIS*::*CLV3*-Pflanzen im L*er*-Hintergrund zeigen einen Meristemarrest, sichtbar durch eine stark reduzierte Organanzahl (F, nur ein Primärblatt wurde gebildet). Bei gleich alten *HIS*::*CLV3/crn*-Pflanzen bildet sich die Blattrosette weitgehend wildtypisch (G). Manchmal kommt es jedoch zu einem kurzfristigen Apikaldominazverlust und Seitentriebe können frühzeitig auswachsen (H, dieselbe Pflanze wie (G); 5 WnK; (*) markiert den Haupttrieb). Maßstab = 10 mm.

	35S::CLV3		HIS::	CLV3	gesamt	
	wus	clv	wus	clv	wus	clv
Ler	11	-	2	-	13	-
crn	-	5	-	8	-	13
clv-1-11	-	1	-	1	-	1
clv1-4	-	-	-	4	-	4

Tab.8: Phänotyp der 35S::*CLV3-* und *HIS::CLV3-***Pflanzen in der T1-Generation.** Die transgenen Pflanzen wurden in der T1-Generation mittels BASTA[®]-Selektion identifiziert. Alle transgenen L*er*-Pflanzen zeigten einen Meristemarrest (Abb.6F) und produzierten bis zur stark verspäteten Ausbildung der Sprossachse zahlreiche Rosettenblätter (Abb.4B) und erinnern somit an *wus*-Mutanten. Bei den transgenen *crn-* und *clv1-*Mutanten konnte keine Verzögerung der Blühinduktion beobachtet werden und ihre Sprossachsen trugen keulenförmige Schoten. *wus: wus-*artiger Phänotyp; *clv: clv-*artiger Phänotyp.

3.3.3.2 crn-Mutanten haben vergrößerte Spross- und Blütenmeristeme

Das auffälligste Merkmal von *crn*-Mutanten sind ihre keulenförmigen Schoten, die mehr Karpelle tragen und ihre, besonders unter Kurztagbedingungen, stark fasziierten Sprossachsen (Abb.6C,D). Die erhöhte Karpellenanzahl pro Schote ist ein Indiz für vergrößerte Blütenmeristeme, fasziierte Sprossachsen indessen für stark vergrößerte Sprossmeristeme. Wie im zweiten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte, korreliert die Größe der vegetativen SAM weitgehend mit der Karpellenanzahl (3.2; Müller et al., 2006). Dies trifft aber nicht immer zu, wie im Fall von *clv1-8*. Obwohl die durchschnittliche Karpellenanzahl bei *clv1-8*-Pflanzen deutlich niedriger als bei *clv1-1*-Mutanten ist (3.3.3.1; Abb.5C), ist die Sprossachse bei *clv1-8*-Pflanzen um das zwei- bis dreifache stärker fasziiert als bei *clv1-1* und übertrifft sogar den Grad von *clv3-2*-Pflanzen (DL; ohne Abb.). Deshalb wurden die *crn* Mutanten daraufhin untersucht, ob sowohl ihre Spross- wie auch Blütenmeristeme vergrößert sind.

Nach zehn Tagen unter Kurztag (KT) sind Wildtyp- und *crn*-Keimlinge etwa gleich groß (ohne Abb.). In diesem Stadium ist das vegetative Sprossmeristem von *crn*-Mutanten bereits signifikant breiter als im Wildtyp (32%; p < 0,001; Abb.7A-C). Zwei Wochen nach der Überführung der Pflanzen von KT zu DL (8 WnK) sind die Infloreszenzmeristeme von *crn* deutlich sichtbar (Abb.7E), wogegen beim Wildtyp die Meristeme kaum zu erkennen sind (Abb.7D). Um von den Infloreszenzmeristemen und den sie flankierenden Blütenprimordien Detailaufnahmen zu erhalten, wurden *crn*- und Wildtyp-Infloreszenzen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (2.5.3). Wie von der breiten Streuung des Verdickungsgrads der *crn*-Sprossachsen erwartet, variiert auch die Größe der *crn*-Infloreszenzmeristeme von deutlich größer als beim Wildtyp bis stark fasziiert (Abb.7F-H). Zudem sind die *crn*-SAM von mehr Blütenprimordien umgeben als es beim Wildtyp der Fall ist. Eine Beobachtung, die auch auf *clv*-Mutanten zutrifft.

Die Größenbestimmung der Blütenmeristeme wird durch das Überwachsen der Meristeme durch die Sepalen erschwert. Deswegen wurde die Blütenmeristemgröße zunächst indirekt untersucht. Eine

genauere Analyse erfolgte anhand von Längsschnitten im Zusammenhang mit der *CLV3*-Expression (3.3.3.5). Die Größe der Blütenmeristeme wirkt sich direkt auf die Anzahl der von ihnen gebildeten Blütenorgane aus. Zudem lässt sich am Verhältnis der Karpellenanzahl zu der Organanzahl der äußeren drei Wirteln die relative Vergrößerung der Stammzelldomäne abschätzen (1.2.5).

Zwei Wochen nach der Blühinduktion unter DL bilden *crn*-Blüten mehr Blütenorgane im Vergleich zum Wildtyp aus (Abb.8). Wie bei *clv*-Mutanten ist der vierte Wirtel am stärksten betroffen. Die Karpellenanzahl pro Schote ist auf 3,9 erhöht (Abb.8J) und die Schoten sind teilweise verdickt, was die Anlage eines fünften Wirtels nahe legt (Abb.8F und 6E). Bei den unter Kurztag gewachsen Kontrollpflanzen ist die erhöhte Organanzahl der äußeren drei Wirtel komplett supprimiert, die Karpellenanzahl bleibt jedoch im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Abb.8J).

Bei *crn*-Mutanten scheinen die Vergrößerung der Spross- und Blütenmeristeme, die Fasziation der Sprossachse und die erhöhte Blütenorgananzahl zu korrelieren. Da der vierte Wirtel am stärksten betroffen ist, könnte ein enger Zusammenhang mit der Stammzellanzahl bestehen. Der Ausbildungsgrad der Defekte in den Blüten erhöht sich mit der Tageslänge. Diese Abhängigkeit des *crn*-Phänotyps von Umweltfaktoren wurde am Beispiel der Karpelle genauer untersucht (3.3.3.3).



Abb.7 *crn*-**SAM.** (**A**,**B**) Vegetative SAM von L*er*- und *crn*-Keimlingen (10 TnK; KT). Die Pfeilspitzen markieren die Grenze zwischen SAM und Blattprimordien. (**C**) Durchschnittliche Breite der Meristemoberfläche bei L*er* und *crn* (10 TnK; KT; ± Standardfehler; n = 40; p < 0,001). (**D**,**E**) Infloreszenzen von L*er* und *crn* (8 WnK). Das Infloreszenzmeristem von *crn* ist deutlich größer und von mehr Blütenprimordien umgeben als bei L*er* (Pfeilspitzen). (**F**-**H**) Rasterelektronenmikroskop-aufnahmen von L*er*- und *crn*-Infloreszenzen (8 WnK). Im Vergleich zu L*er* (F) variiert die Größe der *crn*-Infloreszenzmeristeme von deutlich größer (G) bis stark fasziiert (H). Die Pflanzen wurden nach sechs Wochen von KT nach DL überführt (D-H). Maßstab: A,B = 25 µm; D,E = 1 mm; F-H = 100 µm.


Abb.8: Blüten- und Blütenorganentwicklung von crn Pflanzen unter Dauerlicht. Neun WnK, drei Wochen nach der Überführung von KT zu DL. (A) Aufsicht auf eine Ler-Blüte; sechs Stamen mit Antheren sind ausgebildet. (B) Aufsicht auf eine crn-Blüte; nur drei Stamen sind sichtbar, das Gynösium ist deutlich vergrößert. (C) In der Seitenansicht wird nach der Entfernung einer Sepale deutlich, dass die vermeintlich fehlenden Stamen nur verkürzt sind und zudem keine Antheren tragen (Pfeilspitze). (D) crn-Blüte; Wirtel eins, zwei und vier wurden entfernt. Wie im Wildtyp sind sechs Stamen angelegt worden, drei tragen jedoch keine Antheren (Pfeil markiert Blütenboden). (E) Teilweise werden bei den defekten Stamen die Antheren angelegt, diese entwickeln sich aber nicht weiter (Pfeilspitze; eine Sepale und eine Petale wurden entfernt). (F) Gleiche crn-Blüte wie in (B,C). Die beiden äußeren Wirtel wurden entfernt (Pfeilspitze markiert die defekten Stamen). (G) Aufsicht auf den ersten Wirtel einer crn-Blüte. Die drei inneren Wirtel wurden entfernt. Es wurde eine zusätzliche fünfte Sepale angelegt (*). (H,I) Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Ler- und crn-Blütenprimordien. (H) crn-Blütenprimordium im Stadium 5, eine Sepale ist deutlich eingeschnitten (Pfeilspitze). (H) Ler-Blütenprimordium im Stadium 6. (J) Durchschnittliche Organanzahl pro Blüte unter Dauerlicht von Ler-Pflanzen (weiße Balken; n =10) und crn-Pflanzen (graue Balken; hellgrau: Anteil der defekten Stamen; n = 20) im Vergleich zu crn-Pflanzen unter KT (schwarze Balken; n = 10). ± Standardfehler. Maßstab: A-G = 1 mm; H,I = 100 µm.

3.3.3.3 Der Phänotyp von crn-Mutanten wird von der Umwelt beeinflusst

Der Ausprägungsgrad des Phänotyps von Mutanten kann stark von Umweltfaktoren beeinflusst werden. So variiert bei *clv*-Mutanten die durchschnittliche Karpellenanzahl pro Schote abhängig von der Tageslänge (Jeong und Clark, 2005). Der Effekt der Tageslänge auf die Karpellenanzahl wurde auch bei *crn* beobachtet (3.3.3.2; Abb.8J). Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurde die Karpellenanzahl von *crn* bei KT, LT und DL bestimmt. Als Kontrollen dienten die Null-Allele *clv1-11, clv2-1* und *clv3-2* und Wildtyppflanzen (L*er*) (Abb.9B).



Abb.9: Einfluss der Tageslänge auf die durchschnittliche Karpellenanzahl pro Schote. *crn* im Vergleich zu *clv*-Null-Allelen und Ler. (A) Reproduzierbarkeit der durchschnittlichen Karpellenanzahl pro Schote bei Dauerlicht. Der Datensatz ist identisch zu (B) Dauerlicht, unterteilt in die unabhängigen Versuche. Die Auswertung in Versuch 4a und 4b wurden von verschiedenen Personen durchgeführt. \pm Standardfehler; n: Versuch 1, 2 = 60; Versuch 3: *crn*, *clv1-11* = 45, *clv2-1* = 42; Versuch 4a: *crn*, *clv1-11*, *clv2-1* = 75, *clv3-2* = 372; Versuch 4b = 85; Versuch 5 = 131; Versuch 6 = 137. (B) Abhängigkeit der Karpellenanzahl pro Schote von der Tageslänge. Die Ausprägung des Karpellenphänotyps bei *crn*, *clv1-11* und *clv2-1* nimmt von Dauerlicht (24 h Licht) über Langtag (16 h Licht) zu Kurztag (8 h Licht) deutlich ab. *clv3-2* ist von diesem Phänomen weniger stark betroffen. \pm Standardfehler; n ≥ 200 .

Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei DL überprüft, da hier die stärkste Ausprägung des Karpellenphänotyps zu beobachten ist (Abb.9A). Die größten Schwankungen in der durchschnittlichen Karpellenanzahl waren bei *clv1-11* und *clv2-1* mit jeweils 0,5 Karpellen zu beobachten. Aber auch die größte Abweichung bei *crn* zwischen Versuch 1 und Versuch 4 mit 0,2 Karpelle ist mathematisch signifikant (p < 0,01). Die Auswertung einer Pflanzenpopulation durch zwei verschiedene Personen in Versuch4a und 4b zeigte dagegen keine signifikante Abweichung (p = 0,45) bei *clv3-2*. Die bei DL gefundenen Unterschiede bei *crn-* und *clv-*Pflanzen sind bedeutend kleiner als die bei den unterschiedlichen Tageslängen (s.u.; Abb.9B). Daraus folgt: Kleine, mathematisch signifikante Abweichungen in der Karpellenanzahl von *crn-* und *clv-*Pflanzen werden vermutlich von weiteren Umweltfaktoren verursacht, die jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse haben.

Die Karpellenanzahl bei *crn* und den Null-Allelen *clv1-11* und *clv2-1* ist bei den unterschiedlichen Tageslängen annähernd gleich, ca. 3,9 bei DL, ca. 2,9 bei LT und ca. 2,3 bei KT (Abb.9B). Dieses gemeinsame Merkmal der Korrelation der Karpellenanzahl mit der Tageslänge, wurde auch mit Blühinduktionsexperimenten überprüft (Abb.10). Dazu wurden *crn*-Pflanzen unter KT aufgezogen und nach vier, sechs bzw. acht Wochen nach DL überführt. Die vor der Überführung produzierten Blüten trugen zumeist zwei, die danach drei bis fünf Karpelle. Mit dem jeweils späteren Überführungszeitpunkt verschiebt sich die Grenze an der Sprossachse zwischen weniger und mehr Karpellen nach oben (Abb.10B-D). Dieser Übergang zwischen mehr und weniger Karpellen erfolgt bei *crn* und den Kontrollpflanzen *clv1-11* und *clv2-1* auf der annähernd gleichen Höhe (Überführung nach sechs Wochen; Abb.10C,E,F). Die vergleichbare Reaktion der Karpellenanzahl auf die Tageslänge spricht dafür, dass die drei Gene Komponenten desselben Signalweges sein könnten.



Abb.10: Karpellenanzahl vor und nach der Blühinduktion durch Dauerlicht. (A) Abschnitt einer *crn*-Sprossachse (9 WnK). Die Pflanze wurde nach sechs Wochen bei KT nach DL überführt. (*) markiert das obere Ende der abgeschnittenen Sprossachse. Maßstab = 10 mm. (**B**-**F**) Karpellenanzahl pro Schote bei *crn*, *clv1-11* und *clv2-1*. Die Schoten sind nach ihrer Sprossachsenposition geordnet. Überführung der Pflanzen von KT nach DL: 4 WnK (B), 6 WnK (C,E,F) und 8 WnK (D). Die vereinzelt auftretenden fünf karpelligen Schoten bei *crn* und *clv2-1* wurden nur in diesen Überführungs-experimenten gefunden.

Bei *clv3-2* ist die Suppression des Karpellenphänotyps durch die verkürzte Tageslänge weit weniger ausgeprägt (Abb.10B). Die Reduzierung der Extra-Karpelle beträgt bei *clv3-2* von Dauerlicht zu Kurztag nur 42,6 % (von 4,2 auf 2,7 Extra-Karpelle) bei *crn* dagegen 84,2 % (von 1,9 auf 0,3 Extra-Karpelle). Jeong und Clark (2005) konnten zeigen, dass die Suppression des *clv2-1*-Phänotyps unter KT eine photoperiodische Antwort auf die Inaktivierung des die Blühinduktion kontrollierenden LT-Signalweges ist, der unabhängig von den *CLV*-Genen agiert (1.2.6). Diese Befunde liefern jedoch keine Erklärung für die verminderte Antwort von starken *CLV3*-Mutanten auf die Inaktivierung des LT-Signalweges unter KT. Somit könnte bei KT ein weiterer, von *CRN*, *CLV1* und *CLV2* unabhängiger *CLV3*-Signalweg existieren.

Bei den Experimenten unter KT (10 h Licht) fiel auf, dass die crn-, clv1-11- und clv2-1-Pflanzen früher blühen als Ler. 39 TnK trugen alle crn-, clv1-11- und clv2-1-Pflanzen bereits Blüten und der Spross war bei den meisten Pflanzen ca. 3 cm in die Höhe geschossen. Alle Ler-Pflanzen trugen zu diesem Zeitpunkt noch keine Blüten (Abb.11A,B). Daraufhin wurde der Tag bestimmt, an dem die erste Blüte am Hauptspross geöffnet wurde (Abb.11C und Tab.9). Der durchschnittliche Blühzeitpunkt variiert zwischen 44,1 und 46,7 TnK bei crn, clv1-11 und clv2-1. Damit blühen diese Pflanzen signifikant früher als Ler (51,9 TnK). Viele clv2-1-Pflanzen öffneten verspätet oder gar nicht ihre Blüten am Hauptspross. Dieses Phänomen wurde nur vereinzelt bei crn- und clv1-11-Pflanzen beobachtet. Da aber nur die Pflanzen aus der Wertung genommen wurden, bei denen sich die Blüten der Seitensprosse eher als die des Hauptsprosses öffneten, erklärt dieses Phänomen vermutlich die signifikante Abweichung des Blühzeitpunkts von clv2-1 zu crn (Tab.9). Ein klassisches Kriterium für den Blühzeitpunkt ist die Anzahl der produzierten Rosettenblätter, da diese normalerweise in regelmäßigen Zeitabschnitten (Plastochron) gebildet werden. Bei der Rosettenblätteranzahl gab es keine signifikanten Abweichungen zwischen crn, clv1-11 und Ler, clv2-1-Pflanzen hatten dagegen signifikant weniger Rosettenblätter (Tab.9). Bei vergrößerten clv-Meristemen werden mehr Rosettenblätter pro Zeiteinheit gebildet (Clark et al., 1995). Daher beruht der frühere Blühzeitpunkt bei crn- und clv-Pflanzen vermutlich nicht auf einer direkten Störung der Blühinduktionssignalwege, sondern ist eher ein sekundäres Phänomen der vergrößerten Meristeme dieser Pflanzen.

	1. o.	1. o. Bl.								
	(Tnl	<)		Rbl. Ar	zahl					
	MW	+/-		MW	+/-		N			
Ler	51,9	0,3		16,4	0,3		17			
crn	44,1	0,6		15,9	0,4	Ę	53			
clv1-11	45,4	0,5		15,5	0,5		9			
clv2-1	46,7	0,6		12,8	0,3	3	31			

Tab.9: Blühinduktion unter Kurztag (10 h Licht). Der durchschnittliche Blühzeitpunkt von *crn*, *clv1-11*, *clv2-1* und Ler wurde sowohl absolut (1. o. BI = 1. offene Blüte am Hauptspross; TnK) wie auch relativ an der Anzahl der Rosettenblätter (Rbl. Anzahl) bestimmt. Absolut blühen *crn*, *clv1-11* und *clv2-1* signifikant früher als Ler und *clv2-1* hat signifikant weniger Rosettenbätter als die anderen Genotypen (p < 0,001). N: Anzahl der untersuchten Pflanzen. MW: Mittelwert. +/-: Standardfehler.



Abb.11: Blühzeitpunkt unter Kurztag (10 h Licht). (**A**,**B**) *crn-*, *clv1-11-*, *clv2-1-* und *Ler-*Pflanzen (39 TnK). Bei den meisten *crn-*, *clv1-11 -* und *clv2-1-*Pflanzen ist der Spross bereits ca. drei cm in die Höhe geschossen (Pfeilspitze). Bei allen *Ler-*Pflanzen erfolgte zu diesem Zeitpunkt noch keine Blühinduktion, erkennbar an dem Fehlen jeglicher Blüten. Die jeweilige Blattrosettengröße ist charakteristisch für die verschieden genetischen Hintergründe. Maßstab = 10 mm. (**B**) Blühzeitpunkt bei *crn* (weiße Balken) und *Ler-*Pflanzen (schwarze Balken), bestimmt an der ersten offenen Blüte. Es wurde der prozentuale Anteil an der jeweiligen Gesamtpopulation aufgetragen (*Ler.* n = 17; *crn:* n = 53).

shepherd (*shd*) Mutanten supprimieren ebenfalls die *CLV3*-Überexpression und produzieren keulenförmige Schoten mit mehr Karpellen. SHD kodiert für ein Chaperon, das bei der Etablierung der *CLV3*-Signalkomplexe involviert ist (Ishiguro et al., 2002). *shd*-Mutanten sind temperatursensitiv. Daraufhin wurden die *crn*-Mutanten darauf untersucht, ob ihr Phänotyp ebenfalls durch höhere Temperaturen modifiziert wird.

Bei 29°C (LT) fasziieren die *crn*-Infloreszenzen nach einer Weile deutlich stärker als bei 22°C (Abb.12E) und produzieren in der weiteren Entwicklung karpelloide Strukturen statt Blüten (Abb.11L). Dieser Phänotyp ist selten auch bei starken *clv3-2*-Pflanzen zu beobachten, die auch bei 22°C vergrößerte Infloreszenzmeristeme besitzen, aber weitgehend normale Blüten hervorbringen (Abb.12A). Die Terminierung des *clv3-2*-Infloreszenzmeristems in einem Wust aus karpelloidem Gewebe findet dagegen nur vereinzelt statt (Abb.12B).

Die Transformation der *crn*-Infloreszenz bei 29°C erfolgt in mehreren Etappen. Zunächst akkumuliert das meristematische Gewebe des Infloreszenzmeristems (Abb.12E); Blüten- und Schotenentwicklung gestalten sich jedoch weitgehend normal (s.u. und ohne Abb.). In einer Übergangsphase werden Blüten gebildet, die valvelose Pistille tragen (Abb.12D,H; "valveless" Phänotyp, siehe 3.3.3.4). Die Pistille sind an ihrer Spitze verdickt und teilweise gespalten. Beides spricht eher für

	Über- proliferation	%	keine Über- proliferation	N
Ler	0	0	16	16
crn	22	76	7	29
clv1-11	0	0	9	9
clv2-1	0	0	9	9

Tab.10: Überproliferation von karpelloidem Gewebe bei 29°C. 56 TnK wurde der Anteil der Pflanzen bestimmt, der eine auffallende Überproliferation von karpelloidem Gewebe am primären und/oder an einem oder mehreren sekundären Infloreszenzmeristemen aufwies (Abb.12L). Pflanzen mit alleiniger Überproliferation von undifferenzierten Zellen (Abb.12E) oder in der Anfangsphase der Transformation (Abb.12F,G) wurden der Kategorie keine Überproliferation zugeordnet.

eine Akkumulation von Stammzellen in den Blütenmeristemen bzw. dessen verspätete Termination. Es besteht jedoch ein deutlicher Unterschied zu der Akkumulation von meristematischem Gewebe, der teilweise bei clv3-2 beobachtet werden kann, bei der das überproliferierende Gewebe durch die zuvor bereits fusionierten Karpellen des vierten Wirtels nach außen bricht (Abb.12C). Den crn-Blüten in der Übergangsphase fehlen teilweise auch einige Organe der äußeren drei Wirtel (Abb.12H). Am Ende dieser Übergangsphase werden nur noch karpelllose Pistille ohne äußere Wirtel gebildet. Diese Übergangsphase wurde nur bei weniger stark fasziierten crn-Infloreszenzmeristemen beobachtet (Abb.12F,G), trifft vermutlich aber auch auf die stärker fasziierten zu. Nach 56 TnK waren schließlich 76 % der crn-Infloreszenzen (n = 29) in einer großen Masse von karpelloidem Gewebe terminiert, das keine Ähnlichkeit mehr zu den karpellosen Pistillen aufwies (Abb.12L). Die Kontrollpflanzen clv1-11, clv2-1 und Ler zeigten dagegen normale oder durch den Hitzestress abgestorbene Infloreszenzen (Abb.12I-K; Tab.10). Das Absterben der primären und sekundären Infloreszenzen bei allen untersuchten Pflanzen bei 29°C (Abb.12M) könnte die starken Verzweigungen der Pflanzen erklären (Abb.12N). Bei crn ist vermutlich zusätzlich die Transformation des Infloreszenzmeristems Ursache für das frühzeitige Auswachsen der Seitentriebe. Die Größe der crn-Pflanzen variiert stärker als die der Kontrollpflanzen (Abb.12N). Drei der crn-Pflanzen (n = 29) waren extrem zwergwüchsig, produzierten eine Vielzahl von Blättern und zeigten eine verminderte Seneszenz (Abb.12O).

Bis auf die erhöhte Karpellenanzahl haben die älteren *crn*-Schoten bei 29°C keine weiteren Defekte. Um zu überprüfen, ob sich ihre Karpellenanzahl auf Grund der Temperatur verändert, wurde die Karpellenanzahl von *crn* und den Kontrollpflanzen *clv1-11* und *clv2-1* bestimmt (Tab.11). Die durchschnittliche Karpellenanzahl aller untersuchten *crn*-Schoten ist bei 29°C signifikant um 0,4 Karpellen pro Schote im Vergleich zu 22°C erhöht (p < 0,001). Bei der Betrachtung der unabhängigen Teilversuche relativiert sich dieses Bild stark: Die Spannbreiten der durchschnittlichen Karpellenanzahl bei 22°C und 29°C überschneiden sich bei *crn*, *clv1-11* und *clv2-1*. Bei *crn* z.B. wurden in den Teilversuchen eine durchschnittliche Karpellenanzahl von 2,7 - 3,6 Karpellen (22°C) und 3,3 - 3,6 Karpellen (29°C) gemessen. Daher ergeben sich aus diesen Daten kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Temperatur und Blütenmeristemgröße bei *crn* und *clv*.

In diesem Kapitel wurde die Reaktion des crn-Phänotyps auf unterschiedliche Umweltbedingungen untersucht. Die Akkumulation von Stammzellen in den crn-Blütenmeristemen, gemessen an der Karpellenanzahl, wird wie bei clv1- und clv2-Null-Allelen durch die Tageslänge beeinflusst. Durch Verkürzung der Lichtperiode wird der Karpellenphänotyp supprimiert. Die vergleichbare Reaktion von crn, clv1-11 und clv2-1 auf die Tageslänge legt nahe, dass diese Gene in denselben Signalweg involviert sind. Bei den crn- und clv-Infloreszenzmeristemen verhält es sich gegenteilig, hier akkumulieren die Stammzellen stärker bei Kurztag. Diese verstärkte Akkumulation von Stammzellen könnte sich durch eine längere Verweildauer in der vegetativen Phase erklären. Diese Erklärung greift jedoch nur teilweise, da die crn- und clv-Pflanzen unter Kurztag früher blühen. Entscheidend in dieser Frage wäre jedoch der Unterschied im Blühinduktionszeitpunkt zwischen Kurztag und Langtag bzw. Dauerlicht. Hierzu liegen bisher keine Daten für crn- und clv-Mutanten vor. Der crn-Phänotyp wird ebenfalls durch die Temperatur modifiziert. Das Anheben der Temperatur auf 29°C verstärkt die Akkumulation von undifferenzierten Zellen in den Infloreszenzmeristemen, die in der späteren Entwicklung ausschließlich karpelloides Gewebe bilden. Dieses Phänomen tritt zwar vereinzelt auch bei starken clv-Mutanten wie clv3-2 auf, die Rezeptormutanten clv1-11 und clv2-1 zeigten jedoch keine vergleichbare Reaktion auf die erhöhte Temperatur. Somit könnte CRN bei hohen Temperaturen eine Funktion besitzen, die CLV1 und CLV2 nicht haben.

		crn			clv1-11				clv2-1			
	Ka	+/-	Ν	-	Ka	+/-	Ν		Ka	+/-	Ν	
22°C 1. Versuch	3,63	0,08	60		3,02	0,11	45		3,27	0,09	60	
2. Versuch	2,69	0,06	140	_	2,95	0,06	155		2,74	0,07	140	
gesamt	2,97	0,06	200		2,97	0,06	200		2,90	0,06	200	
29°C 1. Versuch	3,25	0,08	105		2,64	0,08	85		3,15	0,07	120	
2. Versuch	3,32	0,09	65		2,75	0,09	75		3,04	0,08	110	
3. Versuch	3,57	0,06	75		3,00	0,10	75		3,36	0,10	75	
gesamt	3,37	0,04	245	-	2,79	0,05	235		3,16	0,05	300	

Tab.11: Vergleich der Karpellenanzahl von *crn* und *clv* Mutanten bei 22° und 29°C (LT). Die durchschnittliche Karpellenanzahl wurde in zwei bzw. drei unabhängigen Versuchen bestimmt. Ka: Durchschnittliche Karpellenanzahl. +/-: Standardfehler. N: Anzahl der untersuchten Schoten.

3. Ergebnisse



Abb.12: Sprossphänotyp von crn bei 29°C. Außer (A-C) wurden alle Pflanzen bei 29°C gehalten. (A) clv3-2 Infloreszenz, das Infloreszenzmeristem ist fasziiert (Peilspitze), aber deutlich schwächer als bei crn bei 29°C (DL, 22°C). (B) Bedingungsweise produzieren c/v3-2-Infloreszenzmeristem im späten Entwicklungsstadium karpelloide Strukturen statt Blüten (DL, 22°C). (C) Das Gewebe des fünften Wirtels von clv3-2-Blüten überproliferiert teilweise so stark, dass es sich durch die bereits geschlossenen Karpellen nach außen bricht. (D,H) Bei 29°C bilden crn-Pflanzen in der späteren Entwicklung Blüten mit Pistillen ohne Valves ("valveless", siehe 3.3.3.4), die sich häufig aufspalten (Pfeilspitzen; (*) markiert das Infloreszenzmeristen in (H), einige ältere normale Blüten wurden entfernt; 42 TnK). Schließlich werden nur noch karpelloide Strukturen gebildet (F,G,L). (E) Viele crn-Infloreszenzen fasziieren bei 29°C stärker als bei 22°C, bilden zunächst aber normale Blüten (42 TnK). (F-G) Auch weniger stark vergrößerte crn-Infloreszenzmeristeme (Pfeilspitze) produzieren in der späteren Entwicklung Pistille ohne Valves (42 TnK). (G) Nahaufnahme von (F). (I-L) 56 TnK: Die bei crn beobachtete Überproliferation des meristematischen Gewebes (E) und die darauffolgende von karpelloiden Gewebe (L) konnte bei den Ler-, clv1-11- und clv2-1-Kontrollpflanzen nicht beobachtet werden. Die Inflorezenzen entwickelten sich entweder normal (I) oder es kam zum Absterben der Infloreszenzspitze (K). Eine von neun clv1-11 Pflanzen bildete jedoch stark verdrehte Schoten aus (J). (M) Bei den meisten bei 29°C gehaltenen Pflanzen starben einige der sekundären Infloreszenzen ab (weiße Pfeilspitze). Manchmal wuchsen darauf zwei Seitensprosse an einem Hochblatt aus (schwarze Pfeilspitze), 42 TnK. (N) crn-, clv1-11-, clv2-1- und Ler-Pflanzen (39 TnK): Die Pflanzen sind stark verzweigt. Bei crn-Pflanzen variiert die Pflanzengröße stärker als bei den übrigen genetischen Hintergründen. (O) Annähernd 10% der crn-Pflanzen waren auf Grund unterbliebener Internodienstreckung zwergwüchsig und bildeten eine Vielzahl von Blättern. Diese Pflanzen zeigten eine geringere Seneszenz und ihre kurzen Infloreszenzen terminierten ebenfalls in karpelloidem Gewebe (Pfeilspitze; 56 TnK). Maßstab: (B-M) = 2 mm, (N,O) = 10 mm.

3.3.3.4 crn-Mutanten zeigen Defekte in der Organentwicklung

Neben den vergrößerten Spross- und Blütenmeristemen zeigen *clv*-Mutanten ebenfalls Effekte in der Entwicklung der lateralen Organe. Zum einem wird die für den L*er*-Ökotyp typische Stauchung der Pedicels teilweise supprimiert, zum anderen treten Defekte in der Entwicklung der beiden inneren Blütenwirtel auf. Letzteres wird auf eine Veränderung der Meristemarchitektur zurückgeführt, weil diese Defekte wie die Vergrößerung der Blütenmeristeme bei KT supprimiert werden (Kayes und Clark, 1998). Dieser pleiotrope Phänotyp ist am stärksten bei den Allelen von *clv2* ausgebildet (Kayes und Clark, 1998) und ist in einem vergleichbaren Ausmaß auch bei *crn*-Mutanten zu finden.

Gemäß Literaturangaben tragen bei DL 10-12 % der Stamen von *clv2-* und *clv3-*mutanten Blüten keine Antheren (Kayes und Clark, 1998). Bei den dominant-negativen *clv1-*Allelen *clv1-1, clv1-5* und *clv1-4* tritt dieser Phänotyp nur in einer Frequenz von 4-6 % auf (Kayes und Clark, 1998). Der teilweise Verlust der Antheren ist auch bei *crn-*Blüten nach der Blühinduktion unter DL zu beobachten. Dieser Defekt tritt gehäuft bei *crn-*Pflanzen auf, die zunächst unter KT aufgezogen wurden. Im Beispiel von Abb.8B-F,J tragen 32% der Stamen der geöffneten *crn-*Blüten keine Antheren - zwei Wochen nach der Überführung von KT zu DL. Bei einigen Stamen wurden die Antheren zwar angelegt, entwickelten sich jedoch nicht bis zur Reife (Abb.8E). Bei den unter Kurztag aufgezogenen Kontrollpflanzen entwickelten sich die Stamen dagegen normal (Abb.8J).

Die erhöhte Karpellenanzahl wird bei crn-Mutanten teilweise durch einen weiteren, in der englischsprachigen Literatur "valveless" genannten (Kayes und Clark, 1998), sporadisch auftreten Phänotyp überdeckt. Das mit stigmatischen Papillen normal ausgebildete Pistill trägt keine Valve (= komplett "valveless") oder der Ansatz einzelner Valves liegt deutlich oberhalb des Blütenbodens oder einzelne Valves fehlen ganz (= partiell "valveless") (Tab.12; Abb.23J am Beispiel von crn/krf/clv2-1 Schoten). Die "valveless" Pistille unterscheiden sich deutlich von der bei wus- und 35S::CLV3-Blüten auftretenden Reduzierung des Gynöziums auf ein Filament ohne stigmatischen Papillen (Brand et al., 2000). Die "valveless" Pistille bei crn sind dagegen an ihren Spitzen verdickt, wenn sie unter Umweltbedingungen entstanden sind, bei denen die Karpellenanzahl pro Schote aufgrund des vergrößerten Blütenmeristems normalerweise erhöht ist (Abb.23J, DL). Bei 29°C kommt es sogar zur Spaltung der "valveless" Pistille (Abb.12D,H). Beides spricht trotz Karpellverlustes eher für eine erhöhte Stammzellanzahl. Diese Befunde sprechen gegen eine direkte Korrelation des "valveless"-Phänotyps mit der Blütenmeristemengröße. Dennoch könnte eine Veränderung der Meristemarchitektur, die als mögliche Erklärung für die Stamen und den "valveless"-Defekt in clv2-Mutanten angenommen wird (Kayes und Clark, 1998), eine Rolle spielen. Der "valveless"-Phänotyp tritt nach Literaturangaben auch bei 23 bis 30% der clv2-1-, clv3-2- und clv1-4-Allelen auf (Kayes und Clark, 1998). Bei meinen Untersuchungen bei DL trat dagegen der "valveless"-Phänotyp bei crn und clv2-1 teilweise gar nicht auf. Der höchste prozentuale Anteil an "valveless" Schoten in einem Einzelexperiment wurden bei DL zwei bis drei Wochen nach der Überführung von KT beobachtet (Tab.12). Dennoch ist bisher unklar, welche Umweltbedingungen, zusätzlich zu der Tageslänge, den Karpellenverlust bei *crn* und *clv2-1* fördern. Somit könnten die unterschiedlichen Höchstwerte für den prozentualen Anteil der "valveless"-Schoten bei *crn* und *clv2-1* allein auf unterschiedlichen Umweltbedingungen beruhen. Bei den *clv1-11*-Null-Allelen wurde der "valveless"-Phänotyp dagegen nie beobachtet (mehr als 10 Einzelexperimente bei DL). Das spricht dafür, dass ein *CLV1*unabhängiger Signalweg, der die Komponenten *CLV2* und *CRN* umfasst, die Valve-Entwicklung kontrolliert. Der "valveless"-Phänotyp bei starken *clv1*-Mutanten wäre demnach nur Teil ihres dominant-negativen Charakters (Diévart et al., 2003), der vermutlich die Funktion von *CLV2* und/oder *CRN* stört.

Im Rahmen der Analyse der *crn/krf/clv*-Dreifachmutanten (3.3.3.11) wurde die Auswirkungen des partiell "valveless"-Phänotyp auf die durchschnittliche Karpellenanzahl (Ka) untersucht (Abb.23J). Bei der Auslassung der komplett "valveless" Schoten (= 0 Ka, das Pistil wurde nicht als Karpelle gewertet) konnte keine signifikante Unterschiede zwischen partiell "valveless" Schoten (3,4 Ka; n = 36) und normalen Schoten (3,7 Ka; n = 27) von *clv2-1*-Mutanten für die durchschnittliche Karpellenanzahl beobachtet werden (p = 0,20). Daher wurden bei allen in dieser Arbeit ermittelten durchschnittlichen Karpellenanzahlen nur komplett "valveless" Schoten aus der Wertung genommen.

Die *crn*-Mutanten und die in dieser Arbeit verwendeten *clv*-Null-Allele sind im L*er*-Hintergrund erzeugt worden. L*er* trägt eine Mutation in der LRR-Rezeptotkinase ERECTA, was zu einer Stauchung der gesamten Pflanze und somit zu einer Verkürzung der Pedicellänge im Vergleich zum eigentlichen Wildtyp Landesberg (L*ER*+) führt (Bowman, 1993; Torii et al., 1996; Lease et al., 2001). In *crn*, *clv2-1*- und *clv3-2*-Mutanten wird der Pediceldefekt teilweise supprimiert, jedoch nicht bei *clv1-11* (Abb.13A,B). Das legt nahe, dass *crn* und *clv2-1* Komponenten eines *CLV3*-abhängigen Signalweges sind, der die Pedicellänge kontrolliert. Es scheinen jedoch weitere Liganden und/oder Rezeptoren in diesen Signalweg involviert zu sein, da in *clv2-1/clv3-2*-Pflanzen die Suppression additiv erfolgt (Kayes und Clark, 1998).

	komplett	partiell	"valveless"
	"valveless"	"valveless"	gesamt
crn	0 - 9 %	0 - 3 %	0 - 12 %
clv1-11	0 %	0 %	0 %
clv2-1	0 - 50 %	0 - 32 %	0 - 82 %

Tab.12: Anteil des "valveless"-Phänotyps bei *crn*-, *clv1-11*- und *clv2-1*-Mutanten. Der prozentuale Anteil an "valveless"-Schoten wurde bei mehr als fünfzehn Einzelexperimenten (DL, 22°C: n > 10; LT, 22°C: n > 5) bestimmt. In den Einzelexperimenten trat der "valveless" Phänotyp bei *crn* und *clv2-1* häufig nicht auf, bei *clv1-11* wurde er nie beobachtet. Komplett "valveless" = Pistill ohne Valves. Partiell "valveless" = der Ansatz einzelner Valves liegt deutlich oberhalb des Blütenbodens oder einzelne Valves fehlen ganz.



Abb.13: Pedicellänge bei *crn*, *clv2-1*, *clv1-11* und *clv3-2* im Vergleich zu L*ER*+ und L*er*. (A,B) Die Pedicels von L*er* sind im Vergleich zu L*ER*+ gestaucht. Dieser Phänotyp wird bei *crn*, *clv2-1* und *clv3-2*, aber nicht bei *clv1-11*, teilweise supprimiert. (A) Maßstab = 5 mm. (B) Durchschnittliche Pedicellänge; n = 120.

Die pleiotropen Effekte auf die Entwicklung lateraler Organe sind nach der Literatur (Kayes und Clark, 1998) und meinen Untersuchungen Teil des Phänotyps von *crn-*, *clv2-1-* und *clv3-2-*Mutanten, aber nicht des *clv1-11-*Null-Allels. Im Fall des Antherendefektes muss jedoch noch geklärt werden, ob er ebenfalls nicht Teil des *clv1-11-*Phänotyps ist. Somit könnte ein *CLV1-*unabhängiger Signalweg mit den Komponenten *CRN* und *CLV2* die Entwicklung lateraler Organe kontrollieren.

3.3.3.5 CLV3- und WUS-Expression in crn

Das Modell der gegenseitigen Regulation von *CLV3* und *WUS* basiert wesentlich auf Expressionsstudien dieser beiden Gene in verschiedenen genetischen Hintergründen (Fletcher et al., 1999; Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). *CLV3* wird im Wildtyp in der zentralen Zone an der Spitze von Spross- und Blütenmeristemen exprimiert (Abb.14A,C,D). Da sich in der zentralen Zone ebenfalls die Stammzellen befinden, wird *CLV3* als Stammzellmarker verwendet. In *clv*-Mutanten ist die Expressionsdomäne von *CLV3* stark vergrößert. Das *CLV3*-Signal inhibiert somit seine eigene Expression.

Die *CLV3*-Expression ist in den vergrößerten *crn*-Infloreszenzmeristemen ebenfalls ausgedehnt. Wie bei *clv*-Mutanten ist die Expansion der *CLV3*-Domäne überproportional zur Zunahme der Meristemgröße und erstreckt sich auch in tiefere Zellschichten (Abb.14B). In Wildtyp-Blütenprimordien nimmt die *CLV3*-Expression nach dem Stadium 5 (Abb.14C) langsam ab und ist im Stadium 6, nach der Bildung der Karpellprimordien, nicht mehr detektierbar (Abb.14D; Blütenstadien nach Smyth et al., 1990). Bei *crn*-Blütenprimordien ist die *CLV3*-Domäne auch überproportional vergrößert und darüber hinaus bleibt die *CLV3*-Expression länger erhalten (Abb.14D-F). Somit korrelieren der Anstieg und der verspätete Verlust der Stammzellen mit der Zunahme der Karpellenanzahl und der Entstehung eines ektopischen fünften Wirtels.



Abb.14: CLV3- (A-G) und WUS-Expression (H-I8) in crn. RNA-in situ-Hybridisierungen. Alle: Schnittdicke: 7 µm. (A) CLV3 wird im Wildtyp (Ler) in der zentralen Zone an der Spitze des Infloreszenz- und der Blütenmeristeme (C,D) exprimiert. (B) CLV3-Expression in einem vergrößerten crn-Infloreszenzmeristem. Die CLV3-Domäne hat sich überproportional zur Vergrößerung des Meristem, auch in tiefere Zellschichten, ausgedehnt. (C) CLV3-Expression im wildtypischen Blütenprimordium (Stadium 5). (D) Rechts: nach der Anlage der Karpellen im Stadium 6 wird CLV3 im Wildtyp ausgeschaltet. Links (*): Blütenprimordium (Stadium 3). (E) In crn-Blütenprimordien wird CLV3 später ausgeschaltet. In dem crn-Blütenprimordium (Stadium 6) ist die CLV3-Domäne deutlich größer als im Wildtyp (C). Das Meristem wurde durch die Anlage der Karpellen nicht aufgebraucht, so dass später ein fünfter ektopischer Wirtel entsteht. (F) Manche crn-Blütenprimordien sind länglich gestreckt (Stadium 6). (G) Auch während des Auswachsen der Karpelle bleibt in crn CLV3 detektierbar (Stadium 7–8). (D-G) weiβe Pfeilspitzen: Stamenprimordien; schwarze Pfeilspitzen: Karpellenprimordien. (H) WUS wird im Wildtyp im organisierenden Zentrum unterhalb der zentralen Zone exprimiert. (I,I1-I8) WUS-Expression in einem stark fasziierten crn-Infloreszenzmeristem. (D) Die WUS-Expression ist stark verbreitert, sie reicht jedoch nicht bis zur Basis des Infloreszenzmeristems. Im Vergleich zu CLV3 gibt es jedoch keine Ausdehnung in tiefere Zellschichten. (D1-D8) Serienschnitte durch das Infloreszenzmeristem. Der Abstand zwischen den Schnitten beträgt im Durchschnitt 21 µm. (D) ist zwischen D7 und D8 einzuordnen. (D6) Die WUS-Domäne wurde gewissermaßen quer am Rand des Infloreszenzmeristems getroffen. So könnte bei der Betrachtung des Einzelbilds der falsche Eindruck entstehen, dass die WUS-Domäne in tiefere Zellschichten ausgedehnt ist. Maßstab: $(A,B,H-I8) = 100 \mu m$, $(C-G) = 100 \mu m$.

WUS wird im Wildtyp in einer Region unter der *CLV3*-Domäne exprimiert und definiert die Position des organisierenden Zentrums (Abb.14H). Das *CLV3*-Signal reprimiert die *WUS*-Expression. Daher ist die *WUS*-Domäne in *clv*-Infloreszenzmeristem vergrößert, dehnt sich im Gegensatz zu *CLV3* aber nicht in tiefere Regionen aus (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). Dies ist auch bei *crn* zu beobachten (Abb.14I-I8). In den *crn*-Blütenmeristemen ist die *WUS*-Domäne ebenfalls, jedoch weniger deutlich, vergrößert und wird wie *CLV3* verspätet abgeschaltet (Abb.14I-I8 und ohne Abb.).

Die identischen Expressionsmuster von *CLV3* und *WUS* in *crn*- und *clv*-Mutanten legen eine gemeinsame Regulation der Stammzellpopulation, durch *CRN* und die *CLV*-Gene über die Repression der *WUS*-Expression nahe.

3.3.3.6 Wurzelphänotyp von crn

Die Überexpression von *CLV3* in der Wurzel führt zum Verlust des Wurzelmeristems (Hobe et al., 2003). Dieser Phänotyp wird in *clv2*-Mutanten supprimiert, deren Wurzeln zeigen jedoch keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyp (Fiers et al., 2005). *CRN* und *CLV2* sind im Gegensatz zu *CLV1* und *CLV3* in der Wurzel exprimiert (3.3.3.8; TAIR Microarray-Datenbank). Um zu klären, ob *CRN* ebenfalls eine Rolle in der Wurzelentwicklung hat, wurde der Wurzelphänotyp von *crn*-Pflanzen untersucht.

Zunächst wurde die Wurzellänge von *crn*-Pflanzen bestimmt. Nach 10 Tagen bei 22°C (DL) waren die Wurzeln von *crn* signifikant (p < 0,01) länger als bei L*er* (Abb.15A,D). Die Wiederholung dieses Experiments konnte die Unterschiede in der Wurzellänge nicht bestätigen (Andrea Bleckmann, persönliche Mitteilung). Bei 29°C (LT) war dagegen weder nach 8 noch nach 10 TnK eine signifikante Abweichung festzustellen (Abb.15C,E). Die Struktur der Wurzelmeristeme von *crn* und L*er* zeigten nach 14 TnK bei 22°C keine deutlichen Unterschiede (Abb.15F-H). Ungeachtet dessen empfiehlt sich eine weitere, genauere Untersuchung der Wurzellänge und der Architektur der Wurzelmeristeme von *crn* und *clv2-1*.

Die in der Mutagenese identifizierten Suppressormutanten (mit 35S::*CLV3*) wurden darauf überprüft, ob sie den *CLV3*-Überexpressionsphänotyp in der Wurzel supprimieren. Dazu wurden die Wurzellänge und die Länge der meristematischen Zone (gemessen als Abstand zwischen dem 1. Wurzelhaar und der Wurzelspitze) bestimmt. Im Unterschied zu einem neuen *clv1*-Allel supprimierten das neue *clv2-23/3*-Allel und die *crn/krf*-Doppelmutanten den Wurzelarrest (Abb.15I,J).

Um zu überprüfen, ob *crn*-Einzelmutanten ebenfalls den *CLV3*-Überexpressionphänotyp supprimieren, wurde der Phänotyp von *HIS*::*CLV3/crn*-Pflanzen untersucht. Nach der zweiwöchigen Selektion auf Kanamycin-Platten besaßen die transgenen *HIS*::*CLV3/Ler*-Pflanzen der T1-Generation nur kurze bzw. keine Wurzeln (ohne Abb.). Bei den *crn*-Transformaten waren die Wurzeln deutlich länger und alle auf Erde pikierten Pflanzen überlebten (n = 8). In der T2-Generation konnte keine 3:1-



Abb.15: Wurzelphänotyp bei *crn*- und *crn/krf*-Pflanzen. (A,B,D) Wurzellänge bei L*er*, *crn*, 35S::*CLV3/crn/krf* (3/4 der Pflanzen sind transgen) und *crn/krf*, 10 TnK; 22°C. Die *crn*-Wurzeln sind signifikant (p < 0,01) länger als bei L*er*. Die allgemein kleineren *crn/krf*-Pflanzen haben unabhängig vom 35S::*CLV3*-Transgen kürzere Wurzeln. (D) + = 35S::*CLV3*; $n \ge 28$. (C,E) Wurzellänge von L*er* und *crn* bei 29°C. (C) und graue Balken in (E): 8 TnK. Weiße Balken in (E): 10 TnK. (F-H) Wurzelmeristeme von L*er* und *crn* (14 TnK). (F,I) Hauptwurzel. (G,H) Seitenwurzeln. (I,J) Wurzellänge (I) und Länge des apikalen Wurzelmeistems (WM) = Abstand 1.Wurzelhaar zur Wurzelspitze (J) bei transgenen 35S::*CLV3*-Pflanzen. Das *clv2*-Allel und *crn/klf* supprimiert den *CLV3*-Überexpressionphänotyp. (I) $n \ge 14$. (J) $n \ge 12$. (K,L) Beispiele zu (J). (M,N) Wurzellänge bei L*er* und *HIS*::*CLV3/crn* (T2: ca. 3/4 der Pflanzen sind transgen). (N) n = 25. (O) *real time*-RT-PCR: Expressionskürke des transgenen *CLV3* (t*CLV3*) in *HIS*::*CLV3/crn*-Wurzeln. Bei L*er* zeigte die Dissoziationskurve nur unspezifisches Produkt (ohne Abb.). (S,E,I,J,N,O): ± Standardfehler. Maßstab: (A-C,M) = 10 mm; (F-H) = 25 µm; (K,L) 500 µm.

Segregation von kurzen zu langen Wurzeln bei den zu Dreivierteln *HIS*::*CLV3* transgenen *crn*-Pflanzen beobachtet werden, zudem zeigte ihre durchschnittliche Wurzellänge keine signifikante Abweichung zu Ler (Abb.15M,N). Mittels *real time*-RT-PCR konnte gezeigt werden, dass das transgene *CLV3* stark in den *HIS*::*CLV3/crn*-Pflanzen exprimiert wird (Abb.15O).

crn- und *clv2-*Mutanten supprimieren den *CLV3-*Überexpressionsphänotyp in der Wurzel. Ein eindeutiger Wurzelphänotyp konnte bisher nicht identifiziert werden. Da *CLV3* nicht in der Wurzel exprimiert wird, könnten *CRN* und *CLV2* eventuell gemeinsame Komponenten eines anderen CLE-Protein-abhängigen Signalweges in der Wurzel sein, der analog zu der *WUS-*reprimierende *CLV3-*Signaltransduktion im Spross die Aktivität des Wurzelmeristems über die Repression von *WOX5* kontrolliert (siehe 1.2.8 und 1.2.10; Casamitjana-Martinez et al., 2003; Hobe et al., 2003; Fiers et al., 2005; Sarkar et al., 2007).

3.3.3.7 Kartierung und Klonierung von CRN

Um den Genort von crn zu kartieren wurden die Ausgangslinien 6/16 und 6/22 mit Col-Pflanzen gekreuzt und in der F2-Generation die DNA von Pflanzen mit keulenförmigen Schoten isoliert. Zunächst sollte crn unter Verwendung von 19 bzw. 20 DNAs und 22 SSLP-Markern grobkartiert werden. Die verwendeten SSLP-Marker verteilen sich gleichmäßig über die fünf Arabidopsis-Chromosomen (Lukowitz et al., 2000). Zwei SSLP-Marker auf dem oberen Arm von Chromosom 5 zeigten eine Kopplung von 10 cM (CTR1; Position 10 cM; 4/40) bzw. 13,2 cM (ciw8; Position 42 cM; 5/38) (Abb.16 A). Zudem wurde keine Kopplung zu den bekannten Genorten von CLV1, CLV2 (beide Chromosom 2), CLV3 (Chromosom 1) und SHD (Chromosom 4) gefunden (Daten nicht gezeigt). Für die Feinkartierung wurden weitere SSLP- und CAPS-Marker, die zwischen den Markern CTR1 und ciw8 liegen, aus der TAIR-Datenbank (www.Arabidopsis.org) verwendet und die Anzahl der untersuchten DNAs auf 554 erhöht. Die Kopplung zwischen dem CRN-Genort und den SSLP-Markern nga249 (Agi 2770 Kb) und nga151 (Agi 4670 Kb) betrug 2,6 cM (19/1108) bzw. 1,0 cM (11/1108). Bei dem Marker CA72 (Agi 4255 Kb) konnte dagegen kein Austausch (0/1108) festgestellt werden. In der Nähe von CA72 befindet sich das Gen VAN3, für dessen Kartierung neue SSLP- und CAPS-Marker generiert wurden (T24H18b, T31B5d, T22N19f; Koizumi 2005 et al., 2005). Zwischen crn und den Markern T31B5b (Agi 4231 Kb) und T22N19f (Agi 4305 Kb) wurden ein bzw. zwei Austausche unter 1108 Chromosomen festgestellt. Diese Marker umspannen eine Region von 74 Kb mit 18 vorhergesagten Genen (Abb.16 A).

Nachdem es sich abzeichnete, dass sich das *CRN*-Gen in der Nähe des Markers CA72 befindet, schien es sinnvoll -parallel zu der Feinkartierung- damit zu beginnen, aussichtreiche Kandidatengene zu sequenzieren. Bei der Auswahl wurden in erster Linie die vorhergesagte Proteinfunktion und die davon abgeleitete mögliche Funktion in einer Signalkaskade berücksichtigt. CA72 befindet sich in der

vorhergesagten 5'-UTR von AT5g13290, das eine Rezeptorkinase ohne Rezeptordomäne kodiert. Daher wurde die Region dieses Gens zuerst sequenziert. Dazu wurde der Bereich des offenen Leserasters und des Promotors der *crn* Mutante (A1.6) und von L*er* kloniert (2.3.3: pRM_C, pRM_L, pRM_m_PCOR, pRM_L_PCOR,). Die Sequenzierung der Klone und der Sequenzvergleich zeigte eine Punktmutation in der vorhergesagten Transmembrandomäne von AT5g13290 im *crn*-Hintergrund. Die Punktmutation verursacht einen Aminosäurenaustausch von Gly zu Glu an Position 70 der vorhergesagten Aminosäuresequenz. Durch einen Komplementationstest mit der 3,3 Kb großen genomischen *CRN*-Region und der Überexpression der *CRN*-cDNA in *crn*-Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die Punktmutation ursächlich für den *crn*-Phänotyp ist (3.3.3.8). Somit ist AT5g13290 der Genort von *CRN*.

Um weitere *crn*-Allele zu erhalten wurde in Internet-Datenbanken nach T-DNA-Linien mit Insertionen in *CRN* (AT5g13290) gesucht. Es konnten jedoch nur Linien mit T-DNA Insertionen im vorhergesagten Promoter von *CRN* gefunden werden. In fünf bei NASC bestellten Linien konnte die jeweilige T-DNA mittels PCR nachgewiesen werden, diese zeigten jedoch keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Zudem ist die *CRN* Expressionsstärke in den Infloreszenzen der homozygoten SALK_056806 Linie, deren T-DNA Insertion die größte Nähe zum vorhergesagten Transkriptionstart aufweist (ca. 200 bp; Abb.16B), annähernd identisch zu der Wildtyp Expression (*real time*-RT-PCR Daten, nicht gezeigt).

Die Klonierung (2.3.3: pRM GT L 51329) und anschließende Sequenzierung der CRN cDNA zeigte, dass die Datenbank-Annotation (TAIR, TIGR) der Introns von CRN teilweise falsch ist. CRN hat ein 1203 bp großes offenes Leseraster, was von einem 86 bp großen Intron unterbrochen ist. Das kodierte Protein besteht somit aus 401 Aminosäuren (AS) (Abb.16B,C). Ein zweites vorhergesagtes Intron existiert nicht, was jedoch zu keiner Verschiebung des Leserasters im Vergleich zum vorhergesagten führt (Abb.16C). Der in der Abb.16B eingezeichnete Transkriptionsstart und die 5'und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) beruhen auf der Vorhersage bei TAIR (At5g13290.1). In den Datenbanken wird CRN als Rezeptorkinase geführt, der jedoch die Rezeptordomäne fehlt. Nach der in silico-3D-Analyse ist die Kinasedomäne 236 AS groß (AS 118 – 353; Abb.16C) (Andrea Bleckmann, persönliche Mitteilung). Die mit dem Programm SignalP3.0 durchgeführte Vorhersage der Signalsequenz ergab, je nach Methode, zwei verschiedene Schnittstellen. Nach SignalP-NN wird das CRN-Protein zwischen der 33. und 34. AS geschnitten (diese Schnittstelle wurde in Abb.16C eingezeichnet), nach SignalP-HMM dagegen zwischen der 32. und 33. AS. Die Transmembrandomäne von CRN wurde mit dem Programm TMpred ermittelt und erstreckt sich im Wildtyp mit einer Länge von 24 AS von der 62. bis 85. AS (Abb.16C,D). Der Aminosäureaustausch in der Transmembrandomäne bei crn von Glycin zu Glutamat (Position: AS 70) führt in der in silico-Vorhersage zu einer Verkürzung und Verschiebung der Transmembrandomäne (19 AS lang, AS 71 - 89; Abb.16D,E). Das könnte eine der Ursachen für den Funktionsverlust in crn sein, eine weitere denkbare Erklärung wäre



Abb.16: Kartierung, Gen- und Proteinstruktur von *CRN.* (**A**) Kartierung von *CRN* auf dem Chromosom 5. (**B**) Genomische Region von *CRN* (At5g13290). Boxen: Offenes Leseraster; hellgraue Box: Signalpeptide (SP), dunkelgraue Box: Transmembrandomäne (TMD), mittelgraue Box: Kinase-Domäne. Die dicke Linie markiert die vorhergesagte 5'- und 3'-UTR, Pfeil: vorhergesagter Transkriptionsstart. Die Positionen der Punkmutation in *crn* (G > A), der T-DNA in der SALK-Linie 056806, des SSLP Markers CA72 und der RM_C-Oligonukleotide (C1-C5) sind eingezeichnet. (**C**) Aminosäuresequenz von *CRN* (*Ler*). Die beiden in Col abweichenden Aminosäuren in runden Klammern, Mutation in *crn* in eckigen. SP: unterstrichen, vorhergesagte Schnittstelle: schwarzes Dreieck; TMD: dunkelgraue Box; Kinase-Domäne: hellgraue Box; falsch vorhergesagtes Intron: unterstrichen in der Kinase-Domäne; Intron: weißes Dreieck. (**D**) Sequenzvergleich der TMD von CRN, Oso-CRN, CRN^{TMD}1: mit Aminosäureaustausch (in *crn*); CRN^{TMD}2: vorhergesagte Verschiebung der TMD durch den Aminosäureaustausch (in *crn*), CLV1 und CLV2 mit dem jeweiligen Isoelektrischenpunkt (pl). **Fett:** Geladene Aminosäuren. (**E**) Modell der Lokalisation des wildtypischen und mutanten CRN-Proteins in der Plasmamembran.

eine Delokalisation CRNs von der Plasmamembran. In dem Reis-Homolog (Os-*CRN*, Os1g70260.1) ist die in *crn* mutierte AS konserviert (Abb.16D).

crn- und *clv2-*Mutanten teilen in ihrem pleiotropen Sprossphänotyp Merkmale, die das *clv1-11-*Null-Allel nicht besitzt und so auf eine zusätzliche gemeinsame und von *CLV1-*unabhängige Funktion von *CLV2* und *CRN* hindeuten (3.3.3.4). Auch die Suppression der *CLV3-*Überexpression in der Wurzel legt diesen Schluss nahe (3.3.3.6). Beruhend auf der Proteinstrukturvorhersage kodiert *CLV2* für einen LRR-Rezeptor ohne Kinasedomäne, *CRN* dagegen eine Rezeptorkinase ohne Rezeptordomäne. So entsteht der Eindruck, dass CRN und CLV2 einen dimeren Rezeptor bilden könnten, der parallel zu dem CLV1-Rezeptor das Stammzell reprimierende CLV3-Signal weiterleitet und zudem in anderen Bereichen der Pflanze weitere Funktionen ausübt. Diese These wurde anhand der genetischen Interaktion in *crn/clv*-Doppelmutanten überprüft (3.3.3.10).

3.3.3.8 Komplementation von crn-Mutanten und Überexpression von CRN

Um zu testen, ob die Mutation in der putativen Transmembrandomäne von At5g13290 ursächlich für den *crn*-Phänotyp ist, wurde die 3,3 Kb große genomische Region von At5g13290 (Col) kloniert um das Plasmid p*CRN* zu erhalten (2.3.5: $pCRN = pRM_gCC$, Derivat von pGreen nos-bar).

crn-Pflanzen wurden mit p*CRN* transformiert, um einen Komplementationstest durchzuführen. Als Kontrolle wurde ebenfalls L*er* transformiert. In der T1-Generation wurden die transgenen p*CRN*-Pflanzen mittels BASTA[®] selektioniert. Alle p*CRN*-T1-Pflanzen zeigten unabhängig vom genetischen Hintergrund einen wildtypischen Phänotyp (Abb.17A,B; Tab.13). Somit ist eine Kopie von *CRN* ausreichend, um homozygote *crn*-Mutanten zu komplementieren, während die leichte Erhöhung auf drei *CRN*-Kopien keine Auswirkung auf den Wildtyp-Phänotyp zeigt. Nach der Selbstung spalteten sich die Nachkommen 3:1 auf (Tab.14). Zudem kosegregierte die Komplementation und das Transgen in der T2-Generation (Tab.14; Nachweis mittels PCR, 2.3.5). Somit ist At5g13290 der Genort der *crn*-Mutation.

Um eine mögliche Rolle der Gendosis zu untersuchen und um auszuschließen, dass es sich bei *crn* um ein hyper- oder neomorphes Allel handelt, wurde in *crn* und weiteren genetischen Hintergründen die wildtypische (Col und Ler) und die mutante Version der *CRN*-cDNA überexprimiert (2.3.5: Ler: 35S::L_CRN; Col: 35S::C_CRN; crn: 35S::m_CRN).

p <i>CRN</i>	Ν	Phänotyp
Ler	14	Alle wt
crn	9	Alle wt

Tab.13: Phänotyp der p*CRN***-Pflanzen in der T1-Generation.** Komplementation der *crn*-Mutante durch ein genomisches DNA-Fragment von At5g13290 (p*CRN*). N: Anzahl der p*CRN*-T1-Pflanzen.

		2	Karpell	en	>2	Karpe	llen	ges	amt	Chi-Test
	Linie	Ν	%	Tg.	Ν	%	Tg.	Ν	%	3:1
ıın	g1	17	68	17	8	32	0	25	100	0,42
in	g10	15	71	-	6	29	-	21	100	0,71
RN	g13	15	83	-	3	17	-	18	100	0,41
<u>o</u>	gesamt	47	73		17	27		64	100	0,77
-er	g4	10	100	6	0	0	0	10	100	0,27
in	g18	20	100	-	0	0	-	20	100	-
RN	g13	10	100	-	0	0	-	10	100	-
g	gesamt	40	100		0	0		40	100	-

Tab.14: Segregationsanalyse der Komplementation und des p*CRN*-Transgens (T2-Generation). Bei den Pflanzen wurde die durchschnittliche Karpellenanzahl der ersten fünf Schoten am Hauptspross ermittelt. Komplementation und p*CRN*-Transgen co-segregieren in der *crn*-Linie g1. N: Anzahl der untersuchten Pflanzen. %: prozentueller Anteil der Pflanzen. Tg.: absolute Anzahl der Pflanzen mit nachgewiesenem Transgen. Chi-Test: Die gefundene Segregation der Komplementation bzw. des Transgens in einer Linie wurde mittels des Chi-Quadrat (X²) Tests auf signifikante Abweichungen von der erwarteten 3:1-Aufspaltung überprüft.

In der T1-Generation zeigten viele 35S::L CRN/crn-Pflanzen einen geretteten Phänotyp (Abb.17C). Vermutlich aufgrund von Transgeninaktivierung zeigten jedoch nicht alle 35S::L CRN crn-T1-Pflanzen eine vollständige Rettung (Tab.15). Bei den meisten in der T1-Generation komplett geretteten Linien spalteten die T2-Nachkommen jedoch 3:1 auf. Die wenigen signifikanten Abweichungen der Segregationsraten könnten sich durch Mehrfachinsertionen bzw. durch Transgeninaktivierung erklären. Die Überexpression der wildtypischen CRN-cDNAs in Ler (n = 17) und Col (n = 7) Pflanzen bewirkte sowohl in der T1- wie auch der T2-Generation keine Veränderung des Wildtyp-Phänotyps (Abb.17D). Ebenso zeigten clv1-4 (n = 7), clv2-1 (n = 10) und clv3-2 (n = 3) Pflanzen keine Reaktion auf die Transformation mit 35S::L CRN in der T1-Generation (Abb.17.E). Da jedoch nicht die genaue durchschnittliche Karpellenanzahl bestimmt wurde, könnten subtile Veränderungen eventuell übersehen worden sein. Die Überexpression der mutanten crn-cDNA in Ler (n = 3), Col (n = 13), crn (n = 6), clv1-4 (n = 10), clv2-1 (n = 6) und clv3-2 (n = 1) bewirkte ebenfalls keine sichtbaren Veränderungen im Vergleich zum genetischen Hintergrund, jedoch wurde auch hier die genaue Karpellenanzahl nicht bestimmt. Die Expressionsstärke von CRN in den transgenen 35S::CRN-Linien beträgt ca. das zwei bis neunfache der Wildtyp-Expression (T2-Generation; siehe Anhang Abb.28). Somit rettet die CRN-Überexpression crn-Mutanten, hat jedoch keinen Einfluss auf den Phänotyp in anderen genetischen Hintergründen. Die Überexpression der mutanten crn-Version bleibt ohne Effekt.

Für die Rettung von *crn*-Mutanten reicht eine genomische Kopie von *CRN* (At5g13290) aus. Die Überexpression der *CRN*-cDNA führt ebenfalls zur Rettung von *crn*, jedoch zu keinem sichtbaren Effekt im Wildtyp. Das identifizierte *crn*-Allel ist somit hypo- oder amorph. Dass *crn* kein

hypermorphes oder neomorphes Allel sein kann, schließt sich ebenso aus der Überexpression der mutanten *crn*-Version, die nicht störend auf die Wildtyp-Funktion von *CRN* oder eines anderen Gens wirkt. Die *CRN*-Funktion ist darüber hinaus weitgehend unabhängig von der Kopienanzahl der Transkripte und ist vermutlich abhängig von *CLV3*.



Abb.17: Komplementationstest und Überexpression von *CRN*. (A,B) p*CRN/crn*-Pflanze (T1-Generation). Eine genomische Kopie von *CRN* reicht aus, um homozygote *crn*-Pflanzen vollständig zu retten. (C) Die meisten 35S::CLV3/crn-T1-Pflanzen tragen wildtypische Schoten (Pfeil). (D,E) Die Überexpression von *CRN* hat im Wildtyp (hier L*er*) und *clv3-2* keine Auswirkung auf den Phänotyp. Maßstab: (A) = 10 mm; (B-E) = 5 mm.

			ert	Nie Kor	cht npl.	gesamt						
		2	2 K.		2,1-2,9 K.		gesamt		3,0-4,0 K.			CHI-TEST
		Ν	%	Ν	%	Ν	%	Ν	%	Ν	%	3:1
	crn*	0	0	0	0	0	0	76	100	76	100	
T1	crn 35S::L_CRN	6	67	1	11	7	78	2	22	9	100	
	crn 35S::C_CRN	3	38	4	50	7	88	1	13	8	100	
Т2	crn 35S::L_CRN (1)	17	45	8	21	25	66	13	34	38	100	0,190
	crn 35S::L_CRN (2)	41	79	0	0	41	79	11	21	52	100	0,522
	crn 35S::L_CRN (3)	40	78	3	6	43	84	8	16	51	100	0,125
	crn 35S::L_CRN (5)	34	57	16	27	50	83	10	17	60	100	0,136
	crn 35S::L_CRN (9)	17	44	5	13	22	56	17	44	39	100	0,007
	crn 35S::L_CRN (10)	33	100	0	0	33	100	0	0	33	100	0,001
	crn 35S::C_CRN (3)	18	100	0	0	18	100	0	0	18	100	0,014
	crn 35S::C_CRN (4)	20	91	0	0	20	91	2	9	22	100	0,085
	crn 35S::C_CRN (6)	18	69	1	4	19	73	7	27	26	100	0,821

Tab.15: Segregationsanalyse von 35S::CRN in crn-Mutanten. N: Anzahl der untersuchten Pflanzen. %: prozentueller Anteil der Pflanzen einer Linie. Chi-Test: Die gefundene Segregation der Komplementation in einer Linie wurde mittels des Chi-Quadrat (X^2) Tests auf signifikante Abweichungen von der erwarteten 3:1-Aufspaltung überprüft. (*): Bei den crn-Einzelpflanzen war 3,0 die niedrigste durchschnittliche Karpellenanzahl pro Schote.

3.3.3.9 Expressionsmuster von CRN

Die Entwicklungsdefekte von *crn*-Mutanten zeigen eine große Ähnlichkeit mit denen von *clv*-Mutanten. Diese Defekte betreffen hauptsächlich die Spross- und Blütenmeristeme, die auf Grund von erhöhter *WUS*-Expression vergrößert sind. Weitere Defekte in der Entwicklung der lateralen Organe von *crn*-Mutanten erinnern an den pleiotropen Phänotyp von *clv2*-Mutanten. Um zu klären in welchen Geweben *CRN* seine Funktion ausübt, wurde das Expressionsmuster von *CRN* mittels RT-PCR und RNA-*in situ*-Hybridisierung untersucht.

Es wurde die Gesamt-RNA von Apex (junge Infloreszenzen; zwei unabhängige Proben), Hochund Rosettenblätter und Wurzeln isoliert und anschlieβend die Expressionsstärke von *CRN* mittels *real time*-RT-PCR in diesen Organen bestimmt. Im Apex beträgt die *CRN*-Expression ca. ein Viertel der des Haushaltsgens *Cytochrom b5*. Das Expressionsniveau von *CRN* ist somit relativ hoch (Abb.18A). *CRN* wird in allen untersuchten Organen exprimiert, jedoch ca. fünffach stärker im Apex (Abb.18B). Es konnte inzwischen mittels eines *CRN*-Promotor-Protein-GFP Fusionstransgen (*CRN*::*CRN*-GFP) gezeigt werden, dass sich die *CRN*-Expression in der Wurzel auf die Zellen des Ruhenden Zentrums (QC) und die sie umgebenen Initialen konzentriert (Andrea Bleckmann, persönliche Mitteilung). Die im Vergleich zum Apex geringe *CRN*-Expression in der Wurzel könnte sich daraus erklären, dass für die RNA-Isolierung ganze Wurzeln verwendet wurden. In Infloreszenzen konzentriert sich die *CRN*-Expression auf das Infloreszmeristem und die jungen Blütenprimordien (Abb.19A1-C). Folglich überlappt die Expression von *CRN*, *CLV1* und *WUS* (Brand et al., 2000) und *CRN* könnte wie *CLV1* die *WUS*-Expression in einer zellautonomen Weise negativ regulieren.

CRN wird ebenfalls in den sich ab Blütenstadium 6 formierenden Stamen- und Karpellenprimordien und in den Provaskulären- und Vaskulärengewebe der Pedicels und der Sprossachse exprimiert. In dem Bereich der Stamen und Karpellen weisen *crn*-Mutanten Entwicklungsdefekte auf, die somit durch den Verlust einer zellautonomen *CRN*-Funktion verursacht werden könnten. Dagegen spricht jedoch, dass diese Defekte teilweise auch in *clv3-2*-Mutanten zu beobachten sind und die *CLV3*-Expression auf das Meristem beschränkt ist (Fletscher et al., 1999). jedoch für eine nicht-zellautonome Fernwirkung der *CRN*-Funktion im Meristem. Das gleiche gilt für einen möglichen zellautonomen Zusammenhang zwischen der *CRN*-Expression in den Vaskulärengewebe der Pedicels und der Suppression der Pedicelstauchung durch den *CRN*-Funktionsverlust.

In der Embryoentwicklung wird *CRN* spätestens ab dem 16-Zellstadium – Daten für jüngere Stadien liegen nicht vor – im ganzen Embryo, jedoch nicht im Suspensor exprimiert (Abb.20A-E). Ab dem späten Herzstadium konzentriert sich die *CRN*-Expression immer mehr auf das provaskuläre Gewebe von Kotyledonen und Hypokotyl (Abb.20F-K). Zu diesem Zeitpunkt ist die *CRN*-Expression in dem Bereich des zukünftigen SAM vergleichsweise schwächer (Abb20H). Das deutet daraufhin, dass *CRN* vermutlich erst ab der Keimung in die Entwicklung des Sprossmeristems involviert ist. Für die SAM Größe im reifen Embryo liegen jedoch noch keine Daten vor.



Abb.18: *CRN*-Expression, quantitative **RT-PCR.** (**A**) Im Apex (Inflorezenzmeristem mit jungen Blüten) beträgt die *CRN*-Expression ca. ein Viertel der des Haushaltsgens *Cytochrom b5*. Gemittelte Expression in % (ME %); ± Standardfehler. (**B**) *CRN* ist sowohl im Apex, Rosetten- und Hochblatt wie auch der Wurzel exprimiert. Die Expression im Apex ist jedoch ca. fünffach stärker als in den übrigen Geweben. Die *CRN*-Expression wurde mit dem Haushaltsgen *Cytochrom b5* normalisiert. Gemittelte Normalisierte Expression in % (MNE %); ± Standardfehler.



Abb.19 *CRN*-Expression im Spross, RNA-*in situ*-Hybridisierung. (A1-A5 und B1-B3) Zwei Serienschnitte durch L*er*-Infloreszenzen. *CRN* wird im ganzen Infloreszenzmeristem (*) und etwas stärker in den jungen Blütenprimodien und deren Anlagen exprimiert (weiße Pfeilspitzen). Bei den älteren Blüten ist *CRN* in den Stamen- (schwarze Pfeilspitze) und den Karpellenprimordien (schwarzer Pfeil) detektierbar. Des Weiteren wird *CRN* in den Provaskulären- und Vaskulärengewebe der Pedicels und der Sprossachse exprimiert. (**C**) In dem Blütenprimordium (Stadium 3) umfasst die *CRN*-Expression das gesamte Meristem (weiße Pfeilspitze). Die Sepalenprimordien sind dagegen nicht gefärbt. (**D**) *CRN* wird in den Ovulen exprimiert (weiße Pfeilspitze; der Schnitt ist leicht überfärbt). Schnittdicke: 7 µm. Maßstab = 100 µm.



Abb.20: Bildlegende nächste Seite.

Abb.20 *CRN*-Expression im Embryo (Col), RNA-*in situ*-Detektion. (A) 16-Zell Stadium. Die Zellen des Embryos sind gefärbt, die des Suspensors zeigen dagegen keine Färbung (schwarze Pfeilspitze). (B-D) Globularstadium. (C) Leicht überfärbt. (E) Frühes Herzstadium. (F) Spätes Herzstadium. *CRN* wird stärker in der Region des zukünftigen Wurzelmeristems exprimiert (weiße Pfeilspitze). (G1,2) Serienschnitt durch einen frühen Torpedo-Embryo. Die *CRN*-Expression konzentriert sich auf die Mitte der Kotelydonen und des Basalkörpers. (H) Torpedo-Stadium. Die Region des zukünftigen SAM zeigt eine deutlich schwächere Färbung (Pfeil). (I) Schwach gefärbter, später Torpedo-Embryo. (J,K) Reife Embryos. In der Schlussphase der embryonalen Entwicklung konzentriert sich die *CRN*-Expression auf die Kotelyden (Pfeilspitzen in J) und dem vaskulären Gewebe des Hypokotyl. (*) Unspezifische Färbung des Endosperms. Maßstab = 25 µm.

3.3.3.10 crn/clv-Doppelmutanten: Die Einordnung CRNs in den CLV-Signalweg

Aus der Analyse der *crn*-Einzelmutante in den vorangegangenen Kapiteln ergibt sich die zwingende Frage, ob *CRN* und die drei *CLV*-Gene im selben Signalweg wirken. Schon das Auffinden der *crn*-Mutante in der Suppressorgenese der *CLV3*-Überexpression legt nahe, dass die von *CLV3* ausgelöste Repression von *WUS* und somit das Stammzellschicksal abhängig von der *CRN*-Funktion ist. Auch die zu *clv*-Mutanten identische Fehlexpression von *CLV3* und *WUS* in den vergrößerten *crn*-Spross- und Blütenmeristemen rechtfertigt die Einordnung *CRN* in das Modell des *CLV3*-Signalweges. Zudem teilen *crn*- und *clv2-1*-Mutanten eine Reihe von Merkmalen, die nicht Teil des *clv1-11*-Phänotyps sind. Dies unterstützt die auf der Strukurvorhersage beruhende Vorstellung, dass CLV2 und CRN eine dimere Rezeptorkinase bilden könnten, die parallel zu der CLV1-Rezeptorkinase das *CLV3*-Signal weiterleitet.

Diese Annahme sollte anhand der genetischen Interaktion von *CRN* mit den *CLV*-Genen überprüft werden. Dazu wurden *crn*-Doppelmutanten mit den *clv*-Allelen *clv1-1*, *clv1-4*, *clv1-11*, *clv2-1* und *clv3-2* etabliert (siehe 2.2.3 und 2.1.6, Tab.2). Das Hauptinteresse bei der Analyse der *crn/clv*-Doppelmutanten richtete sich auf die Stammzellentwicklung. Um den Akkumulationsgrad der Stammzellen in den *crn/clv*-Einzel- und Doppelmutanten zu untersuchen, wurde die durchschnittliche Karpellenanzahl bestimmt (1.2.5).

In der F1-Generation waren alle Schoten der Pflanzen aus der *crn*-Kreuzungen mit den Null-Allelen *clv1-11* und *clv2-1* wildtypisch (= 2 Karpellen; Abb.21L und ohne Abb.). In der Kreuzung mit dem dominant-negativen Allel *clv1-4* zeigten dagegen bei 80% der F1-Pflanzen in den ersten ein bis drei Schoten eine erhöhte Karpellenanzahl (n = 10, DL), die später angelegten Schoten waren ebenfalls wildtypisch. Bei Wildtyp-Pflanzen wurde bei DL zu keiner Zeit eine erhöhte Karpellenanzahl beobachtet (n > 1000). Ob es sich bei der schwachen Erhöhung der Kapellanzahl bei den *crn/+ clv1-4/+* Pflanzen um eine dominante Interferenz oder um einen dominant-negativen Effekt von *clv1-4* handelt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, da derzeit keine Daten für heterozygote *clv1-4*-Einzelmutanten bei DL vorliegen.



Abb.21: *crn/clv*-Doppelmutanten. (A-D) Infloreszenzen von *crn*-, *crn/clv1-11*-, *clv1-11*- und *clv3-2*-Pflanzen (4 WnK, DL; Aufsicht). (E) Nahaufnahmen von (A-D). Die Infloreszenzmeristeme sind rot markiert. Sie sind teilweise von älteren Blütenprimordien verdeckt, das gilt insbesondere für *crn* und *clv3-2*. Das Infloreszenzmeristem von *crn/clv1-11* ist deutlich größer als bei den Einzelmutanten, aber kleiner als bei *clv3-2*. (I-K, M-R, U-X) Aufsicht auf die Schotenspitze von *crn* und *clv* Einzel- und Doppelmutanten (DL). Die Karpellanzahl bei den *crn*-Kontrollpflanzen war bei dem *crn/clv1-4*-Teilversuch (U) signifikant niedriger als bei den anderen Versuchen (I). (F) Habitus von *crn*, *crn/clv1-11* und *clv1-11*-Pflanzen (4 WnK, DL). (G) Nahaufnahme der Sprossachsen von (F). Die Sprossachse von *crn/clv1-11* ist stärker verdickt. (H) *crn*, *crn/clv1-11* und *clv1-11*-Schoten. (L) Alle Schoten von *crn/+ clv2-1/+* Pflanzen sind wildtypisch (links Habitus; rechts: Nahaufnahme). (S) Zwei karpellige *crn/clv1-4*-Schote mit einem großen "valveless" Bereich (wie in (W) durch die Pfeilspitzen markiert). (T) Fehler in der Phylotaxis (Pfeilspitze) treten bei *crn/clv1-4*-Pflanzen häufiger auf als bei den Einzelmutanten. Maßstab: Alle = 1 mm, außer E = 500 µm und F,L = 10 mm. Die Infloreszenzmeristeme von crn/clv1-11-Doppelmutanten sind im Vergleich zu den Einzelmutanten additiv vergrößert, bleiben jedoch deutlich kleiner als bei clv3-2-Mutanten (n > 10; Abb.21A-E). Die additive Vergrößerung der crn/clv1-11-Infloreszenzmeristeme spiegelt sich auch in der verstärkten Fasziierung der Sprossachse wider (Abb.21F,G). Auch bei den Blütenmeristemen kommt es zu einer additiven Vergrößerung, was zu Veränderungen der crn/clv1-11-Schoten führt. crn/clv1-11-Schoten sind kürzer und aufgrund der Anlage eines fünften Wirtels an der Spitze verdickt (Abb.21H). Die durchschnittliche Karpellenanzahl der crn/clv1-11-Schoten ist mit 5,3 signifikant höher als bei den Einzelmutanten mit 3,9, jedoch signifikant kleiner als bei den clv3-2 mit 6,1 (Tab.16,17; Abb.21I-K,R). Somit verstärkt der Funktionsverlust von CRN und CLV1 die Akkumulation der Stammzellen in den Spross- und Blütenmeristemen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten, erreicht jedoch ebenfalls nicht den Grad eines Komplettverlusts des CLV3-Signals.

Auch in den *crn/clv1*-Doppelmutanten mit den dominant-negativen Allelen *clv1-1* und *clv1-4* kommt es ebenfalls zur additiven Vergrößerung der Sprossmeristeme (ohne Abb.) und zu der daraus resultierenden stärkeren Verdickung der Sprossachse, die sich auch in der Zunahme von Phyllotaxisfehlern widerspiegelt (Abb.21T). Die Karpellenanzahl bei *crn/clv1-1* war jedoch mit 4,5 signifikant kleiner als bei *crn/clv1-11* (5,3 Ka). Dies überrascht, da das dominant-negative *clv1-1*-Allel einen signifikant stärkeren Schotenphänotyp (4,2 Ka) als das *clv1-11*-Null-Allel (3,9 Ka) in den jeweiligen Einzelmutanten bewirkt (Tab.16,17; jeweils p < 0,001). Neben einer kleineren Stammzellpopulation könnte der "valveless"-Phänotyp eine Rolle bei einer verringerten Karpellenanzahl spielen. Die Unterschiede zwischen *crn/clv1-1* und *crn/clv1-11* im prozentuellen Anteil der partiell "valveless" Schoten (6,7% gegenüber 1,7%) war jedoch zu gering, um die Karpellenanzahl signifikant zu veringern. Die Karpellenanzahl spiegelt somit in diesem Versuch vermutlich unverfälscht die Größe der Stammzellpopulation wider. In den *crn/clv1-4*-Doppelmutanten trat der partiell "valveless"-Phänotyp dagegen verstärkt auf (Abb.21S,W; >10% der Schoten).

Die additive Vergrößerung der Spross- und Blütenmeristeme in *crn/clv1*-Doppelmutanten legt eine redundante Rolle von *CLV1* und *CRN* in der Weiterleitung des *CLV3*-Signals nahe. Der schwächere Phänotyp bei den *crn/clv1-1*-Doppelmutanten (eingeschränkt gilt das auch für *crn/clv1-4*) lässt sich vermutlich durch den dominant-negativen Charakter des *clv1*-Allels erklären (siehe Diskussion).

Die pleiotropen Phänotypen von *crn*- und *clv2-1*-Einzelmutanten sind in all ihren Aspekten sehr ähnlich. Beide Mutanten haben eine durchschnittliche Karpellenanzahl von 3,9 (Tab.16). Die Karpellenanzahl der *crn/clv2-1*-Doppelmutanten unterscheidet sich mit 3,8 nicht signifikant (p = 0,96) von den Einzelmutanten. Somit sind *crn* und *clv2*, im Gegensatz zu *crn* und *clv1* Mutanten, in beide Richtungen epistatisch (Tab.16,17; Abb.21I,M,N). Das legt nahe, dass *CRN* und *CLV2* Komponenten desselben Signalweges sind, der unabhängig von *CLV1*, das *CLV3*-Signal weiterleiten. Die durchschnittliche Karpellenanzahl ist bei crn/clv3-2-Doppelmutanten mit 6,0 nicht signifikant (p = 0,83 bzw. 0,94) unterschiedlich zu 6,1 bei clv3-2-Einzelmutanten (Tab.16,17; Abb.21I,Q,R). Daher ist clv3-2 epistatisch über crn, und CLV3 ist somit vermutlich der einzige putative Ligand bei der *CRN*-abhängigen Repression des Stammzellenschicksals.

Bereits die stärkere Ausprägung des Schotenphänotyps in *clv3*-Null-Allelen im Vergleich zu der in *clv1*-Null-Allelen legt die Existenz mindestens eines weiteren CLV3-bindenden Rezeptors nahe. Die Analysen der genetischen Interaktionen der *crn/clv*-Doppelmutanten legen nahe, dass die Kontrolle des Stammzellenschicksals durch *CLV3* über mindestens zwei unabhängige Signalwege erfolgt. In diesem Szenario kann der putative Ligand CLV3 sowohl an der CLV1-Rezeptorkinase, wie auch an eine aus CRN und CLV2 gebildete heterodimere Rezeptorkinase binden.

	Ka Ø	+/-	Ka>4 %	N
crn	3,9	0,1	0	60
clv1-11	3,9	0,1	0	40
clv1-1	4,2	0,1	20	40
clv2-1	3,9	0,1	0	40
clv3-2	6,1	0,2	98	40
<i>- clv3-</i> 2 kl. Pfl.	6,1	0,2	100	23
<i>- clv3-2</i> n. Pfl.	6,0	0,2	94	17
crn clv1-11	5,3	0,1	88	200
- Linie 02.14	5,4	0,1	95	100
- Linie 05.23	5,2	0,1	80	100
crn clv1-1	4,5	0,1	45	100
crn clv2-1	3,8	0,1	0	100
crn clv3-2	6,0	0,2	92,5	40
crn	3,4	0,1	0	58
clv1-4	3,9	0,1	0	49
crn clv1-4	4,4	0,2	42	84

Tab.16: Durchschnittliche Karpellenanzahl bei *crn/clv*-Einzel- und Doppelmutanten. Die Bestimmung der durchschnittlichen Karpellenanzahl pro Schote der homozygot *crn/clv*-Doppelmutanten und der Kontrollpflanzen erfolgte, mit Ausnahme des Teilversuchs mit *crn/clv1-4*, an parallel unter DL gewachsenen Pflanzen. Es wurden jeweils die ersten drei bis fünf Schoten einer Pflanze ausgewertet. Die aufgeführten durchschnittlichen Karpellenanzahlen wurden auf signifikante Abweichungen hin untersucht (siehe Tab.17 und 7.3.4, Tab. 21). Die Karpellenanzahl der *crn*-Kontrollpflanzen bei dem *crn/clv1-4*-Teilversuch war mit 0,5 Karpellen signifikant (p < 0,001) niedriger als im dem Versuch mit den anderen *crn/clv-Doppelmutanten*. Diese Abweichung schränkt die Vergleichbarkeit der beiden Teilversuche stark ein. Auch für die Vergleichbarkeit der Karpellenanzahl von den auf einer Platte gewachsenen *clv3-2*- und *crn/clv3-2*-Linien gab es aufgrund der großen Variabilität in der Pflanzengröße Bedenken. Die Unterteilung in kleine (kl.) und normal große (n.) *clv3-2* Pflanzen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied und die beiden Gruppen wurden daraufhin vereinigt. Das gleiche gilt für die beiden *crn/clv1-11*-Linien. Ka Ø: Durchschnittliche Karpellenanzahl pro Schote. +/-: +/- Standardfehler. Ka>4 %: Prozentualer Anteil der Schoten mit mehr als vier Karpellen. N: Anzahl der untersuchten Schoten.

Untergruppen Ka										
1 crn / clv1-11 / clv2-1 / crn clv2-1	3,8 - 3,9									
2 clv1-1	4,2									
3 crn clv1-1	4,5									
4 crn clv1-11	5,3									
5 clv3-2 / crn clv3-2	6,0 - 6,1									

Tab.17: Untergruppen bei *crn/clv*-**Einzel- und Doppelmutanten.** Die bei den *crn/clv*-Einzel- und Doppelmutanten gefundenen Unterschiede in der durchschnitlichen Karpellenanzahl wurden mittels ANOVA und des parameterfreien Kruskal-Wallis H-Tests auf Signifikanz getestet und die Untergruppen ohne signifikante Unterschiede mit dem LSD ("Least Significant Difference") Test identifiziert (Signifikanzgrenze: p = 0,05). Siehe Anhang 7.3.4, Tab.21. Ka: Spannbreite der durchschnittlichen Karpellenanzahl bei den Mitgliedern der jeweiligen Untergruppe.

3.3.3.11 crn/krf-Doppelmutanten und crn/krf/clv-Dreifachmutanten

korallenriff (krf) modifiziert den Phänotyp von *crn* Mutanten. Die beiden Mutationen wurden in der M2-Generation gemeinsam in den Supressorlinien 6/16 und 6/22 isoliert. Durch die Rückkreuzung mit L*er* konnte gezeigt werden, dass es sich um zwei ca. 1,3 cM auseinander liegende Genorte handelt (3.1.1.1). Bisher konnten keine *krf*-Einzelmutanten isoliert werden, da die Einzelmutante anscheinend keinen deutlich vom Wildtyp zu unterscheidenden Phänotyp besitzt.

In der vegetativen Phase bilden *crn/krf*-Doppelmutanten deutlich kleinere Rosettenblätter (ohne Abb.) und ihre Wurzeln sind signifikant kürzer als bei *crn*-Einzelmutanten (Abb.15B,E). Dieser leichte Zwergwuchs spiegelt sich auch in dem reduzierten Wachstum des Sprosses wider (Abb.22A). In der weiteren Entwicklung akkumulieren die undifferenzierten Zellen des Infloreszenzmeristems ähnlich dramatisch wie bei *crn*-Einzelmutanten bei 29°C (3.3.3.3). Die Größenzunahme des Infloreszenzmeristems variiert in der Anfangsphase jedoch beträchtlich zwischen den gleich alten *crn/krf*-Pflanzen (Abb.22D,E). Schließlich produziert das stark fasziierte Infloreszenzmeristem nur noch karpelloide Strukturen.

Um die dramatische Umgestaltung des Infloreszenzmeristems genauer zu untersucht wurden REM-Aufnahmen angefertigt (Abb.22G-I). Die für das Sprossmeristem typische Form eines meristematischen Domes ist nur noch an der Spitze eines eher kegelförmigen riesigen Meristems erhalten, das an seiner Basis einen Durchmesser von über 1000 µm hat (Abb.22G,H). An den sehr stark vergrößerten Flanken des Meristems sind unzählige Ausbuchtungen zuerkennen, die an Organprimordien erinnern (Abb.22G,H). Diese wachsen jedoch erst an der Basis des riesigen Meristemkegels zu karpelloidem Gewebe aus (Abb.22G). Zudem bestehen die Zellen der Ausbuchtungen aus sehr kleinen Zellen, die damit eher an undifferenziertes Gewebe erinnern (Abb.22I). Somit ist keine klare Aufteilung zwischen zentraler und peripherer Zone möglich: Interpretiert man die Ausbuchtungen an den Flanken des *crn/krf*-Meristems als Organprimordien, wäre



Abb.22: crn/krf-Doppelmutanten. (A) crn (A1.17) und crn/krf (A1.6) Pflanzen bei DL (4 WnK; DL). Das Wachstum ist bei crn/krf-Pflanzen deutlich reduziert. (B) Die F1-Pflanze der Kreuzung 6/16 x 6/22 (beide crn/krf) ist buschartig verzweigt (3 MnK; DL). (C) Vergleich der Seneszenz bei crn/krf, crn und Ler-Pflanzen (10 WnK, DL). Die Pfeilspitzen in (B,C) markieren die Akkumulation von karpelloiden Gewebe an den Sprossspitzen (siehe F). (D,E) Sieben Wochen alte crn/krf-Infloreszenzen (KT). Der Grad der Akkumulation von Stammzellen und karpelloidem Gewebe ist unterschiedlich weit fortgeschritten. Das Meristem in (E, Pfeilspitze) ist stark vergrößert, es haben sich erst wenige ektopische Karpellen gebildet; in (D, Pfeilspitze) hat dieser Prozess noch nicht begonnen (F) Im karpelloidem Gewebe terminierte crn-Infloreszenz, 9 WnK. (G-I) Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von crn/krf-Meristemen. (G) Das sehr stark vergrößerte crn/krf-Meristem, im Hintergrund, weist an seinen Flanken eine Vielzahl von Ausbuchtungen aus. Die karpelloiden Strukturen im Vordergrund, deutlich erkennbar an den stigmatischen Papillen, umgeben das Meristem. Ihr korallenartiges Aussehen war Anregung für die Namensgebung von korallenriff (krf). In der Nahaufnahme (I) von (H) wird deutlich, dass die Oberfläche der Meristemausbuchtungen aus sehr kleinen Zellen besteht und es sich daher vermutlich um undifferenzierte Zellen handelt. (*) markiert die Meristemspitze. Maßstab: A-C = 10 mm; D-F = 3 mm; G-I = 50 µm.

die periphere Zone stark vergrößert, wie es in den vergrößerten Sprossmeristemen von *mgoun (mgo)* Mutanten der Fall ist (Laufs et al., 1998a; Guyomarch et al., 2004). Andererseits könnten die Ausbuchtungen auch aus Verwerfungen durch die starke - in diesem Fall ungleichmäßig verteilte -Überproliferation von Stammzellen in einer stark vergrößerten zentralen Zone entstehen. Die letztere Möglichkeit ist jedoch die wahrscheinlichere, da auch in *crn*-Einzelmutanten die zentrale Zone allgemein stärker als die periphere Zone vergrößert ist. *crn/krf*-Doppelmutanten sind langlebiger als *crn*-Einzelmutanten oder Wildtyppflanzen. Vier MnK sind bei den buschartig verzweigten *crn/krf*-Pflanzen, trotz Abreifung einiger Sprossachsen, noch viele Pflanzenteile grün und es werden noch neue Seitentriebe gebildet (Abb.22B). Auch schon zwei Monate früher lässt sich deutlich das unterschiedlich schnelle Fortschreiten der Seneszenz bei *crn/krf-*, *crn-* und Wildtyp-Pflanzen beobachten. Zehn WnK sind die wildtypischen L*er* Pflanzen komplett abgereift, bei *crn* sind zumindest die älteren Sprossachsen abgereift, wogegen *crn/krf*-Pflanzen noch "knackiggrün" sind. Ein Teil dieses Phänomens beruht vermutlich auch auf der geringeren Fertilität der *crn/krf*-Pflanzen, hat aber vermutlich noch weitere in der *krf*-Mutation begründete Ursachen. Da die Akkumulation der Stammzellen in *crn-* und *clv*-Sprossmeristemen progressiv fortscheitet, könnte man annehmen, dass die Überproliferation von undifferenziertem und später von karpelloidem Gewebe in *crn/krf*-Mutanten, eine Folge der Langlebigkeit dieser Pflanzen ist.

Im *crn/clv1-11*-Hintergrund bewirkt *krf* aber bereits frühzeitig eine verstärke Akkumulation der Stammzellen. Vier WnK sind die *crn/krf/clv1-11*-Sprossmeristeme drei- bis fünffach größer als die von gleich alte *crn/clv1-11*-Mutanten (n > 10; Abb.23A,B). Bei der Bestimmung der Karpellenanzahl ergab sich, dass auch im *krf*-Hintergrund sich die *crn-* und *clv1-11*-Mutation additiv verstärken (Tab.18). Im Gegensatz zu der Karpellenanzahl von *crn/clv1-11*-Doppelmutanten (5,3 Ka; Tab.16 und 17) unterscheiden sich die von *crn/krf/clv1-11*-Dreifachmutanten (6,0 Ka) nicht signifikant (p = 0,75) von der der *clv3-2*-Kontrolle (5,9 Ka; Tab.18; Abb.23D-F,I). Somit hat im *crn/clv1-11*-Hintergrund *krf* einen additiven Effekt auf die Karpellenanzahl und somit auf die Blütenmeristemgröße. *crn*-Einzelund *crn/krf*-Doppelmutanten unterscheiden sich dagegen nicht signifikant von einander (p = 0,09; Tab.18).

krf hat keinen Einfluss auf die gegenseitige Epistase von *crn* und *clv2-1* in *crn/krf/clv2-1*-Dreifachmutanten, die jedoch zusätzlich das 35S::*CLV3*-Transgen trugen (Tab.18; Abb.23D,G,H). Die Überexpression von *CLV3* zeigt in *clv1-11*-Einzel-, *crn/krf*-Doppel- und *crn/krf/clv1-11*-Dreifachmutanten jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Karpellenanzahl (Tab.18).

	nic	ht trans	gen	35S::CLV3				
	Ka	±	N	Ka	±	Ν		
crn	3,75	0,08	63	-	-	-		
crn krf	3,52	0,10	105	3,64	0,06	78		
clv1-11	3,74	0,05	121	3,83	0,11	12		
clv2-1	3,36	0,15	36	-	-	-		
clv3-2	5,89	0,13	19	-	-	-		
crn krf clv1-11	6,00	0,15	15	5,93	0,89	14		
crn krf clv2-1	-	-	-	3,62	0,09	78		

Tab.18: Karpellenanzahl bei *crnlkrflclv*-Dreifachmutanten. Durchschnittlichen Karpellenanzahl pro Schote (Ka) bei *crnlkrflclv*-Dreifachmutanten und den entsprechenden einzel- und doppelmutanten Kontrollen unter DL. Zwischen den Karpellenanzahlen der nicht transgenen Mutanten und denen mit *35S::CLV3*-Transgen sind keine signifikanten Abweichungen festzustellen. +/-: +/- Standardfehler. N: Anzahl der untersuchten Schoten.

Die die Verstärkte Akkumulation von Stammzellen im Sprossmeristem und spätere Überproliferation von karpelloiden Gewebe bei *crn/krf*-Doppelmutanten erinnert stark an den Phänotyp von *crn*-Einzelmutanten bei 29°C. In soweit könnten diese vergleichbaren Phänotypen auch auf der Langlebigkeit der *crn/krf*-Pflanzen bzw. auf das durch die höheren Temeraturen verursachte schnellere Wachstum von *crn*-Mutanten beruhen. Dagegen spricht, dass im *crn/clv1-11*-Hintergrund die *krf*-Mutation schon in der frühen Entwicklung die Akkumulation von Stammzellen additiv fördert. Somit könnte *KRF* auch eine direkte Rolle bei der Kontrolle der Stammzellpopulation haben. Um zuklären, ob *KRF* unmittelbar mit dem *CLV*-Signalweg im Zusammenhang steht wäre die Isolierung von *krf*-Einzelmutanten und die Klonierung des *KRF*-Genes erforderlich. Für beide Vorhaben müsste aber der Phänotyp von *krf*-Einzelmutanten bekannt sein. Dieser könnte jedoch leicht dadurch ermittelt werden, in dem man *crn* in *crn/krf*-Doppelmutanten durch die transgene Wildtypkopie von *CRN* rettet (p*CRN*; 3.3.3.8).



Abb.23: *crn/krflclv1-11-* **und** *crn/krflclv2-1-Triplemutanten.* (**A**,**B**) Die Inflorezenzmeristeme von *crn/krflclv1-11* sind im Vergleich zu *crn/clv1-11* deutlich vergrößert, zudem ist die Meristemoberfäche unregelmäßiger (4 WnK; kontinuierlich DL). (**C**) Die stark fasziierten Sprossachsen von *crn/krflclv1-11-* Pflanzen (rechts) zeigen eine reduzierte Internodienstreckung ((*) markiert die Spitze des Hauptsprosses) und werden von den Seitentrieben übergipfelt. Rechts: *clv1-11-* Pflanze. 6 WnK, 2 Wochen nach Überführung von KZ zu LT. (**D-I**) Aufsicht auf die Schotenspitze von *crn-, krf-* und *clv-*Einzel- und Trippelmutanten (DL). (**J**) "valveless"-Schoten am Beispiel von *crn/krflclv2-1-*Trippelmutanten. Die Pistille sind an ihrem Ende wie bei hoch-karpelligen Schoten stark verdickt. Schwarze Pfeilspitze: Blütenboden; Pfeil: Basis der Karpellen bzw. oberes Ende des "valveless"-Bereichs; weiße Pfeilspitze: sehr kleines Karpell. (*): filamentöse Struktur, vermutlich eine nicht abgeworfene antherenlose Stame. Maßstab: (A,B,D-I) = 2 mm; (C) = 10 mm; (J) = 5 mm.

3.3.3.12 crn/wus- und crn/pol-Doppelmutanten und crn im LER+-Hintergrund

Die Analyse der *crn/clv*-Doppelmutanten legt nahe, dass *CRN* und *CLV2* Komponenten eines *CLV1* unabhängigen *CLV3*-Signalweges sind. Um diese Einordnung von *CRN* in das Modell der *CLV3* Signaltransduktion abzusichern, wurden Doppelmutanten mit zwei *wus*-Allelen (*wus-1* und *wus-4*) und *pol-1* etabliert, da *WUS* eines der Hauptziele (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000) und *POL* eine der Komponenten des *CLV3*-Signalweges sind (Song et al., 2006). *crn* sollte sich dabei bezüglich der genetischen Interaktion wie die *clv*-Mutanten verhalten (1.2.3 und 1.2.4). Ebenso wurden durch Kreuzungen *crn*-Mutanten im L*ER*+-Hintergrund erzeugt, da die *er*-Mutation den Phänotyp einiger *clv*-Allele partiell supprimiert (1.2.9)

Der *CLV3*-Signalweg kontrolliert über die Repression der *WUS*-Expression die Stammzellanzahl (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). In homozygoten *wus*-Mutanten wie auch *clv/wus*-Doppelmutanten wird die Stammzellpopulation nicht aufrechterhalten (Laux et al., 1996). In der F2-Generation der Kreuzung *crn* mit den beiden *wus*-Allelen waren von insgesamt 20 *wus*-artigen Pflanzen (= homozygot *wus*) drei homozygot für *crn*, darunter war eine homozygote *crn-wus-1*- und zwei *crn/wus-4*-Pflanzen (Abb.24 A-C). Auch bei den F3-Nachkommen von F2-Pflanze (n = 5) mit *crn* Phänotyp (*crn/crn wus-1/+*) segregierte der *wus*-Phänotyp 1:3 (31:94, n = 125, p = 0,96; Abb.24D-G). *WUS* ist somit wie die *clv*-Mutanten epistatisch über *crn*. Das legt nahe, dass *WUS* eines der Hauptziele des über *CRN* erfolgenden *CLV3*-Signalweges ist.

Die dominant-negative *pol-1*-Mutante supprimiert den Phänotyp von *clv1*-Mutanten (Yu et al., 2003). *POL* und sein redundantes Homolog *PLL1* aktivieren vermutlich die Expression von *WUS* und werden beide durch den *CLV*-Signalweg negativ reguliert (Song und Clark, 2005; Song et al., 2006). In der F2-Generation der Kreuzung *crn* mit *pol-1* wurden sowohl zwei *crn/crn pol-1/+* sowie eine homozygote *crn/pol-1*-Mutante identifiziert. Die für *pol-1* heterozygoten *crn*-Doppelmutanten zeigten mit 3,7 bzw. 3,4 Karpellen pro Schote keine deutliche Abweichung zu *crn*-Einzelmutanten. Bei der homozygoten *crn/pol-1*-Mutante war der *crn*-Karpellenphänotyp komplett supprimiert (= 2 Karpellen pro Schote). In ihren F3-Nachkommen segregierten die Pflanzen mit komplett supprimierten Schotenphänotyp 100:20 (n = 120), was jedoch signifikant (p < 0,001) von einer 3:1 Aufspaltung abweicht. Somit verhält sich in homozygoten *crn*-Doppelmutanten das *pol-1*-Allel rezessiv bei der partiellen Suppression (2,2 Ka; n = 600) des *crn*-Schotenphänotyps. Da *pol-1* sowohl *clv1*- wie auch *crn*-Mutanten supprimiert, wird das *CLV3*-Signal, welches vermutlich separat über CLV1 bzw. CRN und CLV2 weitergeleitet wird, oberhalb oder auf der Ebene von POL wieder vereinigt.

In der F2-Generation der Kreuzung *crn* mit L*ER*+-Wildtyp-Pflanzen wurde *crn*-mutante Pflanzen mit längeren Pedicels identifiziert (= hetero- oder homozygot für *ER*+). Die Schoten dieser Pflanzen zeigten ein deutlich schwächeren Phänotyp, als die *crn*-mutanten Pflanzen mit kurzen Pedicels (= homozygot für *er*; Bowman, 1993; Torii et al., 1996). Die genaue Karpellenanzahl wurde aber bisher

nicht bestimmt. Somit verstärkt die *er*-Mutation, wie es bei einigen *clv*-Allelen, den Phänotyp (Diévart et al., 2003).

Auch die Analyse der *crn*-Doppelmutanten mit *wus* und *pol* und *crn*-Mutanten mit *ER*+-Hintergrund legt nahe, dass *CRN* integraler Bestandteil des *CLV3*-Signalweges ist und oberhalb von *POL* und *WUS* in die Signalkaskade einzuordnen ist.



Abb.24: *crnlwus und crnlpol*-Doppelmutanten. (A,B) Homozygote *crnlwus-1*- und *crnlwus-4*-Pflanzen (42 TnK, LT). Die Pfeilspitze markiert das arretierte Sprossmeristem. Einige der Rosettenblätter haben Ausbuchtungen, die sich auch auf der Petiole befinden können (Pfeil). Die F2-Pflanzen wurden basierend auf ihren *wus*-Phänotyps und dem *crn*-CAPS-Marker identifiziert. (*) Für die DNA-Isolierung entferntes Rosettenblatt. (C) *wus-1-*, *crnlwus-1*- und *Ler*-Pflanzen (42 TnK). Die *wus-1*- und *crnlwus-1*-Pflanzen verharren in der vegetativen Phase. Die *Ler*-Pflanze dagegen hat einen Spross gebildet und befindet sich nahe am Ende ihrer Entwicklung. (D-G) F3-Generation einer *crnlcrn wus-1/*+ F2-Pflanze. Der *wus*-Phänotyp (D-F) segregierte 3:1. Die nicht *wus-1*-homozygoten Geschwisterpflanzen und die *crn*-Kontrollen (G) blühten zu diesem Zeitpunkt (vier WnK) bereits. (H) *crn*-Schoten im Vergleich zu *crnlpol-1*, mit komplett supprimierten *crn*-Phänotyp. Maßstab = 10 mm.

3.3.4 Eine weitere Suppressormutante, *curly leaf*

Die extrem zwergwüchsige Suppressormutante *18/3* produziert sehr kleine Rosettenblätter, die zudem häufig nach innen gerollt sind (Abb.25B). Der frühzeitig gebildete Spross mit seinen sehr kleinen Hochblättern und Blüten ist auffallend filigran (Abb.25E). Diese Merkmale erinnern an die von *clf*-Mutanten (Goodrich et al., 1997). CLF ist ein Polycomb-Gruppen (Pc-G) Protein, dass die Expression einer Reihe von Genen, einschließlich *AG* und *STM*, durch epigenetische Chromatin-Remodellierung supprimiert (Goodrich et al., 1997; Schubert et al., 2006).

Die 18/3-Mutanten blühen, unabhängig davon, ob sie das 35S::CLV3-Transgen tragen, bereits nach drei, spätestens nach vier Wochen (Abb.25E und ohne Abb.). Heterozygote 35S::CLV3/18/3-Pflanzen sind dagegen nicht von transgenen 35S::CLV3-Pflanzen mit Wildtyp-Hintergrund zu unterscheiden und blühen wie diese extrem spät (Abb.25F).

In der F2-Generation der Auskreuzung (*18/3* x L*er*) konnte eine 1:3 Aufspaltung des *clf*-artigen *18/3*-Phänotyps beobachtet werden (Tab.19). In den Pflanzen ohne *clf*-artigen Phänotyp segregierte der durch das *35S*::*CLV3* verursachte *wus*-artige Phänotyp ca. 9:8 (n = 198). Diese signifikante Abweichung von 3:1 (p < 0,001) spricht dafür, dass in ca. 19% aller transgenen Pflanzen das Transgen inaktiviert wurde (Tab.19). Bei den *18/3*-Mutanten (n = 92) blühten 97% vier WnK, wogegen bei den Pflanzen ohne *clf*-artigen Phänotyp noch keine blühte (KT). Das legt nahe, dass in den meisten transgenen *18/3*-Mutanten die *CLV3*-Überexpression supprimiert wurde, da eine Transgeninaktivierung in 96% der Pflanzen eher unwahrscheinlich ist (Annahme von ca. ³/₄ transgenen *18/3*-Mutanten). Somit verhält sich die *clf*-artige *18/3*-Mutation rezessiv und bewirkt anscheinend die Suppression der *CLV3*-Überexpression.

Die 18/3-Mutation wurde in die Nähe der *CLF*-Position auf dem Chromosom 2 zwischen den SSLP-Markern ciw3 und nga1126 kartiert (Abb.25P). Daraufhin wurde ein Komplementationstest durchgeführt, bei dem transgene 35S::*CLV3/18/3*-Pflanzen mit dem *clf*-2-Allel gekreuzt wurden. Die F1-Generation war nicht von homozygoten 18/3- bzw. *clf*-2-Einzelmutanten zu unterscheiden (Abb.25D), womit es sich bei 18/3 um ein *clf*-Allel handelt (*clf*-18/3). Transgene 35S::*CLV3/clf*-2/*clf*-18/3-Pflanzen blühen ebenfalls frühzeitig (ohne Abb.). Das legt nahe, dass die Suppression der *CLV3*-Überexpression nicht allel-spezifisch ist.

Bei genauerer Betrachtung der vegetativen Entwicklung zeigt sich jedoch, dass die transgenen 35S::*CLV3/clf-18/3*-Keimlinge neben den *clf*-typischen Merkmalen, auch additiv die von *wus* bzw. 35S::*CLV3* aufweisen (Abb.25A-C). Das Auftreten von tassenförmigen bzw. auf Filamente reduzierte Blättern spricht für den kurzfristigen Verlust der Stammzellen im vegetativen SAM. Erst in den Infloreszenzmeristemen von 35S::*CLV3/clf-18/3*-Pflanzen wird die Stammzellpopulation soweit stabilisiert, dass sich eine Sprossachse mit ihren lateralen Organen ausbilden kann (Abb.25E,G). In den kurzen Wurzel der 35S::*CLV3/clf-18/3*-Mutanten kommt es zu keiner Ausdifferenzierung des

Wurzelmeristems(Abb.25O). Somit wird zumindest partiel der *CLV3*-Überexpressionphänotyp in den Wurzeln supprimiert.

Unter KT wird der Zwergwuchs von *clf*-Mutanten teilweise supprimiert (Goodrich et al., 1997). Dies gilt jedoch nicht für die transgene *35S*::*CLV3/clf-18/*3-Pflanzen (Abb.25E). Daher beeinflusst die *CLV3*-Überexpression im *clf*-mutanten Hintergrund die Entwicklung von Organen, die normalerweise insensitiv für das *CLV3*-Signal sind.

Der Phänotyp der *clf-18/3*-Mutanten spiegelt die Auswirkungen der in ihnen fehlexprimierten Genen wider. Viele Hochblätter haben mit ihren ektopischen Ovulen und stigmatischen Parpillen einen karpelloiden Charakter (Abb.25G,H). Ähnliches gilt für die Sepalen, die teilweise wie Karpelle fusionieren und ebenfalls stigmatischen Parpillen ausbilden (Abb.25H,J-L). Zudem trägt die Sprossachse gelegentlich ektopische Stamen und Karpelle statt Blüten (Abb.25M). Diese homeötischen Transformationen lassen sich durch die Fehlexpression des Blütenorganidentitätsgen AG erklären, die bereits für andere *clf*-Allele beschrieben wurde (Goodrich et al., 1997). In seltenen Fällen ist die Karpellenanzahl in *clf-18/3*-Blüten erhöht (Abb.25J,K). Dieses spricht für eine vergrößerte Stammzelldomäne, die sich z.B. durch die Fehlexpression von *WUS* erklären könnte.

Bei der in der Mutagenese identifizierten Suppressormutante *18/3* handelt es sich um ein *clf*-Allel (*clf-18/3*). Die Suppression der *CLV3*-Überexpression kommt im Spross jedoch erst nach der Blühinduktion zum Tragen. *CLF* kontrolliert vermutlich direkt die Expression von *WUS* (Daniel Schubert und Rüdiger Simon, persönliche Mitteilung). Diese partielle Suppression könnte somit ihre Ursache in der ektopischen und wahrscheinlich von *CLV3*-unabhängigen *WUS*-Missexpression in *clf*-Mutanten verursacht werden.

			<i>clf</i> -Ph	änotyp		nicht <i>clf</i> °						gesamt		
	bl.	bl.%	n.bl.	n.bl.%	Ν	N%	wt	wt%	ÜE	ÜE%	Ν	N%	Ν	N%
Linie 1	24	100,0	0	0,0	24	22,2	46	54,8	38	45,2	84	77,8	108	100
Linie 2	17	100,0	0	0,0	17	22,4	21	35,6	38	64,4	59	77,6	76	100
Linie 3	20	90,9	2	9,1	22	28,6	25	45,5	30	54,5	55	71,4	77	100
Σ Linien	61	96,8	2	3,2	63	24,1	92	46,5	106	53,5	198	75,9	261	100
erwartet*		25,0		75,0		25,0		25,0		75,0		75,0		100

Tab.19: Segregation des frühzeitigen Blühens bei 35S::*CLV3/clf-18/3*-Pflanzen. Segregationsanalyse der F2-Generation der Kreuzung 35S::*CLV3/clf-18/3* x Ler (vier WnK, KT). Die Pflanzen mit *clf*-Phänotyp wurden nach dem Kriterium bereits blühend (bl. = Anzahl) oder nicht blühend (n.bl. = Anzahl) unterteilt. Die Pflanzen ohne *clf*-Phänotyp (nicht *clf*) wurden daraufhin untersucht, ob sie den *CLV3*-Überexpressionsphänotyp zeigten (ÜE) oder nicht (wt). Neben der absoluten Anzahl (bl.; n.bl.; N) wird der jeweilige prozentuale Anteil (bl.%; n.bl.%; N%) der jeweiligen Kategorie angegeben. gesamt: Anzahl aller untersuchten Pflanzen. (*): Erwartete Aufspaltung bei der Null-Hypothese: *clf* ist kein Suppressor der *CLV3*-Überexpression. (°) Alle nicht blühend.

3. Ergebnisse



Abb.25: clf-18/3 ist ein partieller Suppressor der CLV3-Überexpression. (A-C) 35S::CLV3/clf-18/3-Keimlinge haben einen additiven Phänotyp (2 WnK, KT). Wie bei bekannten cl-Allelen sind die Keimlinge extrem zwergwüchsig und die Blätter sind teilweise nach innen gerollt (B, weiße Pfeilspitze). Das vegetative SAM terminiert mit einem tassenförmigen Blatt (A; wie bei wus und 35S::CLV3) oder einem Filament (B,C). (D) clf-18/3/clf-2-Keimling (2 WnK, KT). (E) Der Zwergwuchs ist bei clf-18/3- und clf-2-Pflanzen unter KT teilweise supprimiert, jedoch nicht bei clf-18/3 mit 35S::CLV3. Alle Pflanzen blühen (4 WnK). (F) F1-Generation der Kreuzung 35S::CLV3/clf-18/3 x Col. 35S::CLV3/clf-18/3/+ Pflanzen blühen extrem spät. Von den drei Pflanzen hat nur eine einen Spross (*) ausgebildet (3 MnK, LT). (G) Die 35S::CLV3/clf-18/3-Pflanze terminiert in karpelloiden Strukturen mit Ovulen (schwarze Pfeilspitzen). (H) clf-18/3-Infloreszenz. Die Hochblätter tragen ebenfalls Ovulen (schwarze Pfeilspitze) und die Schoten sind teilweise von karpeloiden Sepalen umwachsen (weiße Pfeilspitze). (I,J) clf-18/3-Infloreszenzen. Die Sprossachse und die Pedicels sind regelrecht miteinander verknotet. (K) Nahaufnahme von (J). Fusionierte Sepalen mit stigmatischen Papillen (schwarze Pfeilspitze) umhüllen eine clv-artige Schote mit mehr Karpellen. (L) clf-18/3-Blüte, zwei fusionierte Sepalen mit stigmatischen Papillen (Pfeilspitze) umschließen eine Schoten-artige Struktur, ebenfalls mit stigmatischen Papillen (links). Nach der Öffnung der äußeren Hülle (rechts). (M) Terminierte clf-18/3-Infloreszenz. An der Sprossachse wurden einzelne Stamen (weiße Pfeilspitzen) und ein Pedicel mit einer unfusionierten Karpelle angelegt (schwarze Pfeilspitze). (N) An der Basis der Pedicels von clf-18/3 befinden sich häufig stigmatische Strukturen. (O) 35S::CLV3/clf-18/3-Wurzel (8 TnK). In der meristematischen Zone sind keine Wurzelhaare zu erkennen, was darauf hindeutet, dass auch in der Wurzel der CLV3-Überexpressionphänotyp supprimiert wird. (P) clf-18/3 wurde grob in die Nähe der bekannten Position von CLF auf Chromosom 2 kartiert. Maßstab: Alle = 5 mm, außer E,F = $10 \text{ mm und } O = 500 \mu \text{m}.$
4. Diskussion

Durch die intensive Erforschung vieler Arbeitsgruppen ist die *CLV3*-Signaltransduktion eine der am Besten untersuchten Signalwege in *Arabidopsis*. Dennoch sind noch viele mit diesem Thema verbundene Fragen unbeantwortet. Zielsetzung der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente war es, einige der offenen Fragen zu beantworten. So sollte im ersten Teil die Frage geklärt werden, ob *DRN* unmittelbar an der Kontrolle der *CLV3*-Expression beteiligt ist. Bei der Suche nach weiteren Zielgenen von *DRN* ergab sich zudem die Frage, ob *DRN* über die Abregulation der Jasmonsäuresynthese Zellstreckung, einem Hauptaspekt der Differenzierung, inhibiert. Im zweiten Teil wurden die Vorhersagen des *CLV3/WUS*-Modells mittels der induzierbaren Erhöhung der *CLV3*-Expression überprüft. Und im dritten Teil wurde nach weiteren Komponenten des *CLV3*-Signalweges gesucht.

4.1 Die Rolle DRNs in der Organisation des Sprossmeristems

Die konstitutive und die induzierte Überexpression von *DRN* bewirkt eine Reihe von morphologischen Defekten in meristematischen und nicht meristematischen Geweben, die vermutlich durch die Inhibition der Zellstreckung verursacht werden. Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren birgt grundsätzlich die Möglichkeit, dass ebenfalls nicht native Zielgene missreguliert werden. Da *DRN* im Wildtyp jedoch in der Stammzellregion von Spross- und Blütenmeristemen exprimiert wird (Kirch et al, 2003), könnte die Befähigung zur Inhibition der Zellstreckung, einem Aspekt der Differenzierung, eine natürliche Bewandtnis haben. Somit würde *DRN* zwei verschiedene Aufgaben zukommen, die Aktivierung und Festlegung von Expressionsmustern meristematischer Entwicklungsgene und die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands der Stammzellen (Abb.26A).

Der Hauptbeweggrund, sich innerhalb dieser Arbeit mit *DRN* zu beschäftigen, war seine mögliche Rolle bei der Aktivierung von *CLV3*. *CLV3* und *DRN* haben teilweise überlappende Expressionsmuster und werden an der Spitze der Spross- und Blütenmeristeme in der zentralen Zone exprimiert (Fletcher et al., 1999; Kirch et al., 2003). In *drn-D*-Mutanten kommt es durch die konstitutive Überexpression von *DRN* zur gemeinsamen Verschiebung der *CLV3* und der endogenen *DRN*-Expressionsdomäne, was ein Indiz dafür sein könnte, dass die *DRN*-Expression die von *CLV3* festlegt. Da *DRN* auch, aber nicht *CLV3*, an der Spitze von Blattprimordien exprimiert wird (Fletcher et al., 1999; Kirch et al., 2003), benötigt *DRN* vermutlich weitere stammzellspezifische Faktoren, um *CLV3* aktivieren zu können. Das wird dadurch bestätigt, dass ein Tag nach Beginn der *DRN*-Induktion die Expression von *CLV3* leicht erhöht ist, aber es zu keiner Ausdehnung der *CLV3*-Expressionsdomäne kommt. Experimente mit dem Translationsinhibator Cycloheximid legen nahe, das *DRN CLV3* Verschiebung der *CLV3*-Expressionsdomäne eine direkte Folge der Verschiebung der *DRN*-Domäne. Die vermutliche Abhängigkeit der *CLV3*-Aktivierung durch *DRN* von weiteren stammzellspezifischen Faktoren legt nahe, dass die in *drn-D CLV3*- und *DRN*-exprimierenden Zellen Stammzellcharakter haben.

CUC1 und CUC3 sind zwei weitere meristematische Entwicklungsgene die durch die DRN-Induktion hochreguliert wurden (Abb.26A). Die CUC-Gene sind als Aktivatoren der STM Expression unmittelbar an der Etablierung des embryonalen Sprossmeristems beteiligt (Aida et al., 1997; Hibara et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von STM durch die Induktion von DRNL abhängig von der direkten Aktivierung von CUC1 durch DRNL ist (Ikeda et al., 2006). drnund *drnl*-Mutanten verhalten sich additiv und ihr Phänotyp erinnert stark an *cuc*-Doppelmutanten, denen das Sprossmeristem fehlt (Aida et al., 1997; Vroemen et al., 2004; Chandler et al., 2007). Somit spielen DRN und DRNL eine Schlüsselrolle bei der Etablierung des Sprossmeristems in den sie redundant die Expression von CUC-Genen direkt aktivieren, die wiederum für die Aktivierung STM benötigt werden. Da sich die Expressionsdomänen von DRN und DRNL und den CUC-Genen nur in der frühen Embryogenese überschneiden (Aida et al., 1997; Kirch et al., 2003; Vroemen et al., 2004; Ikeda et al., 2006), ist die CUCI- und CUC3-Expression in der späteren Entwicklung vermutlich unabhängig von DRN und DRNL. Gegen eine nichtzellautonome Wirkung von DRN und DRNL auf CUC1 und CUC3 spricht, dass sie im vegetativen SAM und im Infloreszenzmeristem in Zellen exprimiert werden, die zu unterschiedlichen symplastischen Feldern gehören (Rinne und van der Schoot, 1998; Gisel et al., 1999).

Durch die *DRN*-Induktion werden einige der Syntheseenzyme des Phytohormons Jasmonsäure (JA) abreguliert, was nahe legt, dass die JA-Konzentration in den Pflanzen abnimmt. Das wird durch die Abregulation bekannter JA-Zielgene bestätigt. Die Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von JA fördert Zellstreckung (Ulleo et al., 2002). Da die Behandlung mit JA zur Ausdifferenzierung meristematischer Zellen und zur Termination von Sprossmeristem führt (Cenzano et al., 2003), könnte der Inhibition der JA-Synthese durch *DRN* eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation zukommen: Demnach würde *DRN* durch seine Expression in der zentralen Zone der Spross- und Blütenmeristeme die Abregulation des JA-Signals bewirken, und somit, durch die indirekte Inhibition der Zellstreckung, Stammzellen an ihrer Differenzierung hindern (Abb.26A).

Auch in *clv*-Mutanten beruht die Akkumulation von undifferenzierten Zellen auf eine Verzögerung der Differenzierung und nicht auf einer erhöhten Zellteilungsrate (Laufs et al., 1998b). Durch die induzierte *DRN*-Expression in den Stammzellen der Blütenmeristeme kommt es wie bei *clv*-Mutanten zur Bildung zusätzlicher Karpelle, obwohl in diesem Fall auch die erhöhte *WUS*-Expression eine Rolle spielen könnte (Abb.26A; Madlen Rast, Diplomarbeit 2006). Darüber hinaus erinnert die durch die JA-Behandlung verursachte Termination von Sprossmeristemen in weiteren Aspekten an die von *iCLV3*-Pflanzen (3.2.1). In beiden Fällen werden gegen Ende nur noch reduzierte Organe und

schließlich keine Primordien mehr angelegt (Cenzano et al., 2003; 3.2.1). Im Gegensatz zur endogenen *CLV3*-Expression geht die *DRN*-Expression durch die Induktion der *iCLV3* Pflanzen langsam, aber kontinuierlich verloren (Anhang: Abb.27). Das spiegelt vermutlich den langsamen Verlust der Stammzellen bzw. der *DRN* exprimierenden Zellen wider. Falls *DRN* im Meristem tatsächlich eine reprimierende Wirkung auf das JA-Signal hat, könnte sich dieses durch den langsamen Verlust von *DRN* verstärken. So zeigen die Genchip-Daten von *iCLV3* zunächst eine schnelle Erhöhung der Expression einiger JA-Syntheseenzyme. Nach 24 HnI geht diese jedoch wieder verloren. Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten ist unklar, ob JA auch in die durch den Verlust der *WUS*-Expression ausgelösten Differenzierung von Meristemzellen involviert ist und somit grundsätzlich in Differenzierungsprozesse im Meristem.

Wie stehen nun die Kontrolle der meristematischen Entwicklungsgene, die Verschiebung ihrer Expressionsmuster in tiefere Meristemregionen und die Akkumulation von kleinen, vermutlich undiffenzierten Zellen im Sprossmeristem von drn-D-Mutanten miteinander in Verbindung? Wenn die Umgestaltung des drn-D-Sprossmeristems auf der verminderten Differenzierung beruht, warum verschieben sich in clv-Mutanten nicht ebenfalls die Expressionsdomäne von DRN und CLV3 in tiefere Schichten? Ein bedeutender Unterschied zwischen drn-D- und clv-Mutanten besteht darin, dass in clv-Mutanten nur die Stammzellen in der zentralen Zone von verminderter Differenzierung betroffen sind und in der peripheren Zone die Organprimordien normal auswachsen können. In drn/drnl-Doppelmutanten sind die Expressionsmuster von DR5::GFP und PIN1 verändert, was darauf schließen läst, dass DRN und DRNL den Auxin-Transport oder die Auxin-Signaltransduktion kontrollieren. Andererseits werden DRN und DRNL an der Position der höchsten Auxin-Konzentration in Meristemen und Blattprimordien exprimiert (Kirch et al., 2003; Heisler et al., 2005). Somit währe eine autoregulatorische Kontrolle der DRN-Expression über Auxin denkbar. Der Auxin-Transport erfolgt im Meristem durch die gerichtete Lokalisation der PIN1-Auxin-Efflux-Transporter in der L1, der schwächer in den undifferenzierten Stammzellen exprimiert ist (Heisler et al., 2005). Da in drn-D, im Gegensatz zu den clv-Mutanten, auch die pheriphere Zone von der Inhibition der Zelldifferenzierung betroffen ist, könnte der Auxin-Transport in die zentrale Zone gestört werden. Zudem könnte auch der Abtransport des Auxin durch die morphologischen Veränderungen behindert sein. Falls es zu einer Verschiebung des Auxin-Maximums in tiefere Zellschichten kommt, könnte das ebenfalls die Verschiebung der endogenen DRN-Domäne und der von ihr abhängigen CLV3-Domäne bewirken. Da an der neuen Position das endogene DRN stark exprimiert wird und DRN wiederum, durch die Repression der JA-Synthese, Zellstreckung inhibiert, erklärt dies, warum die DRN exprimierenden Zellen besonders klein sind (Kirch et al., 2003). STM wird im Wildtyp an der Position des Auxin-Maximums in den Organprimordien nicht exprimiert (Heisler et al., 2005). Dazu passt, dass STM und DRN in drn-D-Mutanten nicht in denselben Zellen exprimiert werden (Kirch et al., 2003). Ohne weitere Untersuchungen bleibt die putative Abhängigkeit des DRN-Expressionsmuster von

Auxin und die Verschiebung der Auxin-Konzentration durch morphologische Veränderungen nur eine von vielen möglichen Begründungen, um die Veränderungen in *drn-D*-Sprossmeristem zu erklären.



Abb.26: Bildlegende nächste Seite.

Abb.26 Genetische Modelle der DRN-Induktion, der CLV3- und WUS-Regulation und molekulare Modelle putativer Rezeptorkomplexe des CLV3-Signals. (A) Die induzierte Überexpression des Transkriptionsfaktors DRN (dunkelblau) führt zu einer direkten Erhöhung der CLV3-, CUC1- und CUC3-Expression und eventuell der einiger ERF-Transkriptionsfaktoren. Die Erhöhung der WUS-Expression und die Repression der Jasmonsäure-Synthese (JA) durch DRN erfolgt vermutlich indirekt. Beides führt zur Inhibition der Differenzierung der Stammzellen (SZ). (B) Langfristige Störungen des CLV3/WUS-Regelkreises werden mit der Zeit durch weitere Faktoren (X) kompensiert. Die Kompensation könnte direkt auf den CLV3-Signalweg wirken oder von diesem unabhängig sein (?). (C) Orange: CRN konnte basierend auf die Doppelmutanten in die CLV3-Signalkaskade mit den bekannten Komponenten (schwarz) eingefügt werden. Hellblau und grün: Die genaue Einordnung von KRF und CLF ist dagegen unklar und wurden daher getrennt von der CLV3-Signalkaskade dargestellt. (D) Mögliche membranständige CLV3-Signal-Komplexe: Die Analyse der clv/crn-Doppelmutanten legt nahe, dass der CLV1-Rezeptor und der putative heterodimere CLV2-CRN-Rezeptor unabhängig von einander Rezeptorkomplexe bilden können, um nach der Bindung des CLV3-Peptides das CLV-Signal weiterzuleiten. Die dargestellte Annahme einer Rezeptordimerbildung und Transphosporylierung beruht auf eine angenommen Analogie zu tierischen Rezeptorkinasen (Cock et al., 2002). Falls es zur Rezeptordimerbildung kommt, könnte sie permanent (wie dargestellt, verbunden über Disulfid-Brücken) oder temporär (durch die Bindung des CLV3-Peptides initiiert) erfolgen. (E) Auch ein gemeinsamer Rezeptorkomplex von CLV1 und CLV2-CRN wäre denkbar. Der schwächere Phänotyp von crn/clv1-11 Mutanten zu clv3-2 legt die Existenz eines oder mehrere weitere CLV3-bindender Rezeptoren nahe. Ebenso könnte crn aber auch kein Null-Allel sein. (F) Molekulare Modelle zu der Aktivität des Stammzell-reprimierende CLV3-Signals in crn/clv-Einzel- und Doppelmutanten, gemessen an der durchschnittlichen Kapellenanzahl pro Schote (K). Zur Vereinfachung wurde auf die Einbeziehung möglicher weiterer CLV-Rezeptorkomplexe (E) verzichtet. Falls CLV2 und CRN eine heterodimere Rezeptorkinase bilden, würde dies erklären, warum es in crn/clv2-1-Pflanzen zu keiner weiteren Abnahme des CLV3-Signals durch den Funktionsverlust von CRN (eventuell durch den Verlust der Fähigkeit mit CLV2 zu assoziieren) auf Grund des Verlust des CLV2-Proteins (clv2-1 ist ein Null-Allel) kommt. Die gleich starken Karpellenphänotypen von crn- und clv1-11-Mutanten legt nahe, dass die Weiterleitung des CLV3-Signal über CLV1 und CLV2/CRN etwa zu gleichen Teilen erfolgt. Die getrennte Weiterleitung wird wiederum durch den verstärken CLV3-Signalverlust in crn/clv1-11 bestätigt (clv1-11 ist ein Null-Allel). Die stärkere Abnahme des CLV3-Signals in den dominant-negativen c/v1-1-Mutanten im Vergleich zu c/v1-11 wird vermutlich durch die Störung der Funktion von CLV2/CRN bewirkt. Der schwächere Phänotyp von crn/clv1-1-Mutanten zu crn/clv1-11 deutet auf eine Restfunktion der mutanten CLV1-1-Rezeptorkinase hin. (D-E) Blau: CLV1; Grün: CLV2; Rot: CLV3; Orange: CRN; Schwarz: RKx (putative weitere CLV3-bindende Rezeptorkinase).

4.2 Die Kompensation von Störungen in der wechselseitigen Regulation von *CLV3* und *WUS*

Das *CLV3/WUS*-Modell sagt eine schnelle und dynamische Reaktion auf die Veränderungen der *CLV3*- und *WUS*-Expression voraus, basierte zum Beginn meiner Arbeit aber nur auf die Untersuchungen der Mutanten und der konstitutiven Fehlexpression der Komponenten (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000; Waites und Simon, 2000; Clark, 2001). Daher sollte die Dynamik des *CLV3/WUS*-Rückkopplungskreislauf durch die induzierte Erhöhung der *CLV3*-Expression untersucht werden. Die meisten meiner Ergebnisse wurden in Müller et al. (2006) publiziert und sind in dieser Veröffentlichung ausführlich diskutiert (3.2.1). Daher konzentriert sich die folgende Betrachtung auf die mögliche Natur der zeitverzögerten Kompensation hoher *CLV3*-Expression, ohne alle Diskussionspunkte erneut aufzugreifen.

Die starke Erhöhung der *CLV3*-Expression während der Entwicklung bewirkt wie erwartet eine sehr schnelle Abregulation der *WUS*-Expression. In allen Spross- und in den meisten Blütenmeristemen ist *WUS* nach 24 HnI nicht mehr detektierbar. Somit geht die *WUS*-Expression verloren, bevor es zu morphologischen Veränderungen an der Meristemoberfläche kommt. Ebenso kommt es zu der vom Modell vorhergesagten schnellen Abregulation der endogenen *CLV3*-Expression. Insoweit konnten alle auf dem Modell beruhenden Annahmen bestätigt werden. Nach einem nach 24 HnI erreichten Minimum der endogenen *CLV3*- und *WUS*-Expression kommt es jedoch wieder zum Anstieg der Expression beider Gene. Da zu gleicher Zeit das induzierte *CLV3* weiterhin stark exprimiert wird und es somit zu keiner Transgeninaktivierung kommt, wird dass verstärkte *CLV3*-Signal kompensiert. Die Rettungsversuche von *clv3*-2 mit kontinuierlich schwächer oder stärker *CLV3* exprimierenden *CLV3*-Promotordeletionstransgenen legen nahe, dass dies auch für ein verringertes *CLV3*-Signal gilt: Die Meristemhomöostase toleriert über eine Spannbreite von ca. 30 bis 300% der Wildtyp-Expression kontinuierlich geänderte *CLV3*-Niveaus.

Der Kompensationsmechanismus scheint dennoch von einer Restfunktion des *CLV3/WUS*-Regelkreises zu sein, da bei dem Komplettverlust eines der Komponenten in *clv*- bzw. *wus*-Mutanten die Fähigkeit zur Kompensation verloren geht. Darüber hinaus kommt es bei einer Abnahme der *CLV3*-Expression auf 16% des Wildtyp-Niveaus nur noch zu einer partiellen Rettung. Auch nach Oben gibt es ein Limit für eine komplette Komplementation: Die Expression von fünf *CLV3* cDNA Kopien reduziert die Größe des Sprossmeristems um 20%, hat jedoch keinen Effekt auf die Blütenmeristeme (Lenhard und Laux, 2003). In dem *iCLV3*-Experiment konnte die *WUS*-Expression bei vermutlich viel höheren *CLV3*-Niveaus restauriert werden, womit es auch hier zumindest zur einer partiellen Kompensation kommt.

Wo und unter welchen Umständen kommt es nun zu einer Kompensation während der Entwicklung erhöhter *CLV3*-Expression? In allen Spross- und älteren Blütenmeristemen geht innerhalb von 24 HnI (*iCLV3*) die *WUS*-Expression verloren. In diesen älteren Meristemen konnte die sehr stabile *ALCR*-mRNA und somit auch das Protein akkumulieren und somit ist die *CLV3*-Expression schon zu Beginn der Induktion sehr hoch. Dennoch muss die Induktion über drei Tage aufrechterhalten werden, um einen Sprossmeristemarrest bei allen *iCLV3*-Pflanzen zu bewirken. Daher kann auch nach dem Verlust der *WUS*-Expression und dem Wegfall der erhöhten *CLV3*-Expression *WUS* wieder durch bisher unbekannte Faktoren angeschaltet werden. Diese Faktoren sind meristemständig, da im Laufe des Meristemverlusts die Fähigkeit zur Kompensation verloren geht.

Bei den während der Induktion entstehenden Blütenmeristemen erreicht die induzierte *CLV3*-Expression ebenfalls ein sehr hohes Niveau, dennoch bleibt die *WUS* Domäne wie im Wildtyp bis zum Stadium 6 erhalten. Auf Grund der Abhängigkeit von *iCLV3* (*CLV3*::ALCR alcA::*CLV3*) von der Aktivierung durch *WUS* konnte es in den neu entstehenden Blütenmeristemen zu keiner Akkumulation der *ALCR*-mRNA kommen und somit steigt die *CLV3*-Expression nur langsam mit der Zunahme von ALCR an. Daher steht dem Kompensationssystem mehr Zeit zu Verfügung, um auf die vorzeitige Abnahme der *WUS*-Expression durch die erhöhte *CLV3*-Expression zu reagieren und gegenzusteuern. Da aber durch die Kompensation die *WUS*-Expression ihre natürliche Stärke erreicht, erhöht sich die *CLV3*-Expression vergleichbar stark wie in den Blütenmeristemen, die vor der Induktion entstanden sind. Die *WUS*-exprimierenden Zellen reagieren auf die erhöhte *CLV3*-Expression nur noch wie auf das natürliche Niveau. Vergleichbares gilt für die während der Induktion entstandenen sekundären Sprossmeristeme und auch für den *clv3*-2-Komplementationsversuch mit den kontinuierlich stärker oder schwächer *CLV3*-exprimierenten *CLV3*-Promotordeletionstransgenen.

Grundsätzlich sind sowohl ein *CLV*-abhängiger, wie auch ein *CLV*-unabhängiger Kompensationsmechanismus denkbar (Abb.26B). Ein *CLV*-unabhängiger Mechanismus würde die Aktivität des *WUS*-Promotors regulieren, ohne auf die Komponenten des *CLV3*-Signalwegs zurückzugreifen. Würde dagegen der Kompensationsmechnismus direkt auf die Weiterleitung des *CLV3*-Signals wirken, wäre das Eingreifen auf unterschiedlichen Ebenen der Signalkaskade denkbar. Schon bei der post-translationalen Prozesszierung des *CLV3*-Proteins könnte die Menge der aktiven *CLV3*-Peptide reguliert werden (Kondo et al., 2006). Ebenso wäre eine Kompensation durch die Veränderung der Aktivität oder Anzahl der CLV3-bindenden Rezeptoren möglich. Interessanterweise bewirkt bereits der Ausfall einer der beiden CLV3-bindenden Rezeptoren *CLV1* oder *CLV2* die Suppression des *CLV3*-Überexpressionsphänotyps (Brand et al., 2000). Somit bilden die CLV3-bindenden Rezeptoren einen limitierender Faktor bei der Weiterleitung eines verstärken *CLV3*-Signals. Bei der Expressionsstärke der *CLV1*-mRNA konnte jedoch keine signifikante Veränderung auf Grund der erhöhten *CLV3*-Expression beobachtet werden, so dass auf dieser Ebene eher post-transkriptionele Veränderungen eine Rolle spielen würden. Diese Spekulationen lassen sich beliebig weiter, entlang der *CLV3*-Signalkaskade, bis zu der Kontrolle des *WUS*-Promotors fortsetzen.

Es ist vorstellbar, dass der Kompensationsmechanismus durch die Veränderung der Sensibilität der *WUS*-exprimierenden Zellen für das *CLV3*-Signal wirkt. Da die Kompensation vermutlich nur langsam erfolgen, könnte, trotz der globalen Verschiebung des *CLV3*-Signalniveaus bei entsprechender Verschiebung der Empfindlichkeit, der *CLV3/WUS*-Regelkreis weiterhin seine Funktion ausüben: Die schnelle Reaktion auf kurzfristige Schwankungen der Expression von *CLV3* oder *WUS*.

4.3 Suppressormutanten der *CLV3*-Überexpression

Trotz intensiver Forschung und des Auffindens einer Reihe von Komponenten bleiben viele Aspekte der Weiterleitung des *CLV3*-Signals Spekulation. Die bisherigen Daten legen jedoch nahe, dass einige der Komponenten des *CLV3*-Signalweges bisher unentdeckt geblieben sind. Suppressormutagenesen erwiesen sich schon häufiger als gutes Werkzeug, zielgerichtet neue Komponenten von Signalkaskaden aufzufinden. So wurde *pol-1* als Suppressor des *clv1* Phänotyps identifiziert (Yu et al., 2000). Die Überexpression von *CLV3* führt zum Verlust der *WUS*-Expression und in der Folge dem der Stammzellen (Brand et al., 2000). Somit sollten in einer Suppressormutagenese mit *355::CLV3*-Pflanzen alle Komponenten der *CLV3*-Signalkaskade auffindbar sein, sofern ihr Funktionsverlust nicht von redundanten Genen überdeckt wird oder zur Letalität führt. Das Auffinden von mehreren *clv1*- und *clv2*-Allelen und somit bereits bekannter Suppressoren (Brand et al., 2000) bestätigt die Effizienz der durchgeführten Mutagenese. Daher verwundert es, dass mit *CRN* nur eine neue Komponente des *CLV3*-Signalweges gefunden wurde.

4.3.1 CRN kontrolliert über die Repression von WUS das Stammzellschicksal

Bereits das Auffinden von *crn* als putative Suppressormutante der *CLV3*-Überexpression deutete daraufhin, dass es sich um eine der Komponenten der *CLV3*-Signalkaskade handeln könnte, die das Stammzellschicksal über die Repression von *WUS* negativ reguliert. Daneben waren die phänotypischen Gemeinsamkeiten von *crn* mit den *clv*-Mutanten offensichtlich.

Die Mehrzahl aller bei *crn*-Mutanten zu beobachtenden Defekte lässt sich, aus der Vergrößerung ihrer Spross- und Blütenmeristeme erklären. So können sich durch den größeren Umfang der *crn*-Meristeme an ihren Flanken mehr laterale Organe pro Zeiteinheit bilden. Bei den Rosettenblättern wird dieser Effekt vermutlich wegen der verfrühten Blühinduktion kompensiert, so dass sich die Blattanzahl im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht. Die fasziierten Sprossachsen tragen dagegen deutlich mehr Blüten, deren Phylotaxis gestört ist. Ebenso werden in den Blüten mehr Organe pro Wirtel angelegt, wobei die Karpellen am stärksten betroffen sind. Teilweise wird zudem ein fünfter Wirtel angelegt, was den Schoten ein keulenförmiges Aussehen verleit. All diese Phänotypen ähneln sehr den Defekten, die durch Mutationen in einen der drei *CLV*-Genen verursacht werden (Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Kayes und Clark, 1998). Die Stärke von *crn* entspricht der von *clv1*- und *clv2*-Null-Allelen. Die größte Ähnlichkeit besteht dabei mit *clv2*-Mutanten (siehe 4.3.2).

Wenn *CRN* im selben Signalweg wie die *CLV*-Gene wirkt, sollten die Expressionsmuster von *CLV3* und *WUS* in den *crn*-Mutanten den vergleichen Veränderungen unterliegen wie in *clv*-Mutanten. In den vergrößerten *clv*-Spross- und Blütenmeristemen dehnt sich die *WUS*-Domäne lateral aus. Da es durch die Unterbrechung des reprimierenden *CLV3*-Signals zu keiner Ausdehnung von *WUS* in die

weniger stark vergrößerte peripheren Zone oder tiefere Meristemschichten kommt, wird von *CLV3* nur die Größe, jedoch nicht die Form der *WUS*-Domäne festgelegt (Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). In der Folge kommt es durch die verstärkte *WUS*-Expression zur verzögerten Differenzierung der *CLV3*-exprimierenden Stammzellen, die deshalb akkumulieren. Im Gegensatz zu *WUS* dehnt sich die *CLV3*-Domäne auch in tiefere Regionen aus (Laufs et al., 1998b; Brand et al., 2000; Schoof et al., 2000). In den *crn*-Mutanten finden man nahe zu identische veränderte *CLV3*- und *WUS*-Expressionsmuster. Zusammen mit dem sehr ähnlichen Phänotypen der *crn*- und *clv*-Mutanten und die mit *clv1*- und *clv2*-Mutanten gemeinsame Eigenschaft der *crn*-Mutanten die *CLV3*-Überexpression zu supprimieren, sind starke Indizien dafür, das *CRN* wie *CLV1* und *CLV2* das *WUS*-reprimierende *CLV3*-Signal weiterleitet.

4.3.2 CRN könnte mit CLV2 eine heterodimere LRR-Rezeptorkinase bilden

CRN kodiert eine Rezeptorkinase, die wie CLV1 zu der Familie der LRR-Rezeptor- Serine/Threonin-Kinasen gehört, ohne jedoch eine extrazelluläre LRR-Domäne zu besitzen. Durch den Aminosäureaustausch in der Transmembrandomäne von CRN in crn-Mutanten von Glycin zu Glutamat kommt es laut in silico-Vorhersage zu einer Verkürzung und Verschiebung der Transmembrandomäne. Die Existenz nur eines bekannten Allel und die Art der crn-Mutation erschwert die Beurteilung der wildtypischen Funktion von CRN. Der Aminosäureaustausch in der Transmembrandomäne könnte sowohl einen dominant-negativen Effekt wie auch den teilweisen oder kompletten Funktionsverlust von CRN bewirken. Ein ähnlicher Aminosäureaustausch in der Transmembrandomänne des menschlichen FGFR3-Rezeptors von Alanin zu Glutamat vermindert die Dissoziation des aktivierten homodimeren Rezeptorkomplexes und bewirkt eine konstitutive Aktivität von EGFR3 (Li et al., 2005). Wäre dies ebenfalls bei dem mutanten CRN-Genprodukt der Fall, wäre CRN, ähnlich wie die BAM-Rezeptoren (DeYoung et al., 2006), Komponente eines positiv auf das Stammzellschicksal wirkenden Signalwegs sein. Ebenso könnte das mutierte CRN-Protein die Funktion des CLV1-Rezeptors und/oder eines bisher unbekannten CLV3-abhängigen Rezeptors beruhen, analog zum dominant-negative Charakter der starken clv1-Allele (Diévart et al., 2003). Demnach wäre eine Rolle für CRN bei der Weiterleitung des CLV3-Signals im Wildtyp eher unwahrscheinlich.

Falls eine dieser Überlegungen zutreffen würde, sollte *crn* dominant-negativ sein. Die *crn*-Mutante verhält sich jedoch rezessiv und ist durch eine einzelne genomische *CRN*-Kopie oder der Überexpression von *CRN* rettbar. Zudem hat die Überexpression der mutanten Version von *CRN* im Wildtyp oder in *clv*-Mutanten keinen Effekt. Somit handelt sich es beim *crn*-Phänotyp höchstwahrscheinlich um kein Artefakt eines speziellen Allels. Dennoch bleibt unklar, ob es sich bei *crn* um ein hypomorphes oder amorphes Allel handelt. Da in *crn*-Mutanten bei 29°C eine Verstärung

des Phänotyps zu beobachten ist, könnte durch die Temperaturerhöhung eine weitere Destabilisierung der mutierten Transmembrandomäne eintreten und dadurch eine mögliche Restfunktion von CRN verloren gehen.

In ihren pleiotropen Sprossphänotypen teilen *crn-* und *clv2-*Mutanten Merkmale, die das *clv1-11* Null-Allele nicht besitzt und so auf eine zusätzliche gemeinsame und von *CLV1*-unabhängige Funktion von *CLV2* und *CRN* hindeuten (3.3.3.4). Auch die Suppression der *CLV3-*Überexpression in *crn-* und *clv2-*mutanten Wurzel legt diesen Schluss nahe (3.3.3.6). In der Wurzel könnte die Funktion von *CRN* und *CLV2* in der *CLE-*abhängigen Repression der *WOX5-*Expression im QC, in dem *CRN* ebenfalls exprimiert wird, bestehen (Casamitjana-Martinez et al., 2003; Hobe et al., 2003; Fiers et al., 2005; Sarkar et al., 2007; Andrea Bleckman, persönliche Mitteilung). Zu dem sind *CRN* und *CLV2* in weiteren Pflanzenteilen detektierbar, in denen weder *CLV1* noch *CLV3* exprimiert sind (3.3.3.9; Jeong et al., 1999). Alleinig die Verstärung des Phänotyps von *crn* bei 29°C, die bei *clv1* und *clv2-*Mutanten nicht erfolgt, deutet darauf hin, dass *CRN* auch eine von *CLV2-*unabhängige Funktion bei der Repression des Stammzellschicksals hat.

Beruhend auf der Proteinstrukturvorhersage kodiert *CLV2* für einen LRR-Rezeptor ohne Kinasedomäne, *CRN* dagegen eine Rezeptorkinase ohne Rezeptordomäne. So entsteht der Eindruck, dass CRN und CLV2 einen dimeren Rezeptor bilden könnten, der parallel zu dem CLV1-Rezeptor das Stammzell reprimierende *CLV3*-Signal weiterleitet und zu dem in anderen Bereichen der Pflanze weitere Funktionen ausübt. Die erste These wurde anhand der genetischen Interaktion in *crn/clv*-Doppelmutanten überprüft (3.3.3.9; 4.3.3).

4.3.3 Genetische Interaktionen von crn: Einordnung in den CLV3-Signalweg

Das Modell des *CLV3*-Signalwegs beruht, neben der Untersuchung der Missexpression der Komponenten in verschiedenen genetischen Hintergründen, überwiegend auf der Analyse von Doppelmutanten. Die bisherigen Überlegungen legen nahe, dass *CRN* mit *CLV2* eine heterodimere Rezeptorkinase bilden könnten, die unter anderen das *WUS*-reprimierende *CLV3*-Signal in den Sprossund Blütenmeristemen weiterleitet. Daraus ergeben sich bestimmte Erwartungen für die genetische Interaktion von *crn* mit den Mutanten der bekannten Komponenten des *CLV3*-Signalwegs.

Wie erwartet verhalten sich sowohl *wus* wie auch *clv3* epistatisch über *crn* in *crn/wus*- bzw. *crn/clv3*-Doppelmutanten. Das legt nahe, dass die von *CRN*-abhängige Repression des Stammzellschicksals über *WUS* erfolgt und dazu die Aktivierung durch den putativen *CLV3*-Liganden benötigt (Abb.26C).

In *crn/clv2-1*-Mutanten verhalten sich beide Mutationen epistatisch. Somit wirken beide Proteine vermutlich im selben Signalweg und die Bildung eines heterodimeren Rezeptor wäre die einfachste, jedoch nicht die einzige mögliche Erklärung, um die gegenseitige Epistase zu erklären (Abb.26D,F).

crn/clv1-Doppelmutanten zeigen dagegen eine additive Verstärkung des Schotenphänotyps (erhöhte Karpellenanzahl), der jedoch nicht die Stärke des *clv3-2*-Null-Allels erreicht. Daraus lässt sich zweierlei schließen: Das *CLV3*-Signal scheint über zwei parallele Signalwege zu erfolgen, zum einen über CLV1 und zum anderen über die putative heterodimere CLV2/CRN-Rezeptorkinase (Abb.26C,D). Da beim Ausfall beider Signalwege nicht die Stärke des *CLV3*-Funktionsverlusts erreicht wird, könnte eine weitere *CLV3*-bindende Rezeptorkinase existieren (Abb.26E).

Eine weitere mögliche Erklärung für den schwächeren Phänotyp von *crn/clv1*-Doppelmutanten gegenüber *clv3-2* wäre, dass *crn* kein amorphes Allel ist. Dagegen spricht, dass *crn*, *clv2-1*, das ein Null-Allel ist, und *crn/clv2-1*-Mutanten bei 22°C keine signifikanten Abweichungen in ihrer durchschnittlichen Karpellenanzahl zeigen. Zudem sind *clv1-4/clv2-1*-Doppelmutanten ebenfalls schwächer als *clv3-2*, aber auch wie die dominant-negativen *clv1-4*-Einzelmutanten (Kayes und Clark, 1998). Falls sich herausstellen sollte, dass *clv1-11/clv2-1*-Null-Allel-Doppelmutanten ebenfalls nicht die Stärke von *clv3-2* erreichen, wäre das ein starker Indiz für die Existenz eines weiteren *CLV*-Rezeptors und zugleich für den amorphen bzw. zumindest stark hypomorphen Charakters von *crn*, auch ohne die Isolierung eines *crn*-Null-Allels.

Der im Vergleich zu den *clv1*-Null-Allelen stärkere Phänotyp von dominant-negativen *clv1*-Allelen beruht wahrscheinlich auf der Störung der Funktion der putativen heterodimeren CLV2/CRN-Rezeptorkinase (Abb.26F; Diévart et al., 2003). Die im *crn*-Hintergrund schwächere additive Akkumulation der Stammzellen in den *crn/clv1*-Doppelmutanten mit dominant-negativen *clv1*-Allelen offenbart somit vermutlich eine Restfunktion der intermediären dominant-negativen *clv1*-Allelen, wie *clv1-1* (Abb.26F).

Die Suppression des *crn*-Phänotyps durch *pol-1*, das als Suppressor des *clv1*-Phänotyps isoliert wurde, komplettiert das Modell der getrennt über *CLV1* und *CLV2/CRN* erfolgenden *CLV3*-Signalweiterleitung, die somit oberhalb oder auf der Ebene von POL und PLL1 wieder zusammengeführt wird (Abb.26C).

4.3.4 *krf* als Enhancer des *crn*-Phänotyps

Im Laufe der Entwicklung kommt es bei *crn/krf*-Doppelmutanten zu einer verstärken Akkumulierung der Stammzellen des Sprossmeristems, die schlieβlich zur Überproliferation von karpelloidem Gewebe führt. Beides sind keine neomorphen Phänotypen, da diese auch selten bei *clv3-2-*Mutanten und häufig bei *crn*-Einzelmutanten bei 29°C zu beobachten sind. Zudem führt die Missexpression von *WUS* unter dem *APETALA1*-Promotor zu einer identischen Karpellenüberproliferation (Song et al., 2006). Demnach ist *krf* ein Enhancer des wichtigsten Merkmals von *crn*-Mutanten, der *WUS*-abhängigen Akkumulation der Stammzellen. Zusätzlich sind *crn/krf*-Doppelmutanten leicht zwergwüchsig.

krf-Einzelmutanten scheinen keinen vom Wildtyp deutlich zu unterscheidenden Phänotyp zu besitzen. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass *krf* wie die *crn*- und *clv*-Mutanten keulenförmige Schoten tragen. Durch die enge Kopplung der Genorte von *CRN* und *KRF* (ca. 1,3 cM) wäre bei der Kartierung nicht entdeckt worden, dass eigentlich zwei verschiedene Mutationen mit ähnlichen Phänotypen kartiert werden. Ein einfacher Weg den Phänotyp von *krf*-Einzelmutanten aufzuklären, wäre, die Funktion von *crn* in *crn/krf*-Doppelmutanten durch die wildtypische Kopie von *CRN* (p*CRN*) zu retten.

Prinzipiell sind verschiedene Wechselwirkungen zwischen *KRF* und *CRN* und somit dem *CLV3*-Signalweg denkbar. *KRF* könnte ebenfalls eine Komponente des *CLV3*-Signalwegs sein. Für den unwahrscheinlichen Fall, dass *crn* ein hypomorphes temperatursensitives Allel sein sollte (siehe 4.3.2), könnte *KRF* das mutierte CRN-Protein bzw. seine Restaktivität stabilisieren. Diese Fähigkeit würde *KRF* demnach in *crn*-Einzelmutanten bei 29°C verlieren. Chaperone sind in der Stabilisierung von membranständigen Proteinen bei dem vesikulären Transport von ihrem Syntheseort im *endoplasmatischen Reticulum* zur Zellmembran beteiligt (Gething und Sambrook, 1992). Mit SHEPERD ist ein Chaperon bekannt, dass für die Etablierung des bzw. eines der *CLV*-Rezeptorkomplexe benötigt wird (Ishiguro et al., 2002). Wäre KRF auch an der korrekten Faltung des wildtypischen CRN-Proteins beteiligt, sollten *krf*-Mutanten ebenfalls keulenförmige Schoten haben.

KRF könnte auch eine direkte Funktion bei der Weiterleitung des *CLV3* Signals besitzen. *KRF* wäre demgemäβ bei 22°C partiell redundant zu *CLV1* und *CRN*, da die *krf*-Mutation den Phänotyp von *crn/clv1*-Doppelmutanten verstärkt. Die oben erwähnte Verstärkung des *shd*-Phänotyps bei höheren Temperaturen kann nicht in der Mutation selbst begründet sein, da es sich bei *shd* um ein Null-Allel handelt (Ishiguro et al., 2002). Somit könnte KRF eine CLV3-bindende Rezeptorkinase sein, die ihre Funktion bei höheren Temperaturen verliert und wodurch möglicherweise sowohl der Phänotyp von *crn-*, wie auch der von *shd*-Mutanten verstärkt wird. Wenn *KRF* eine Komponente des *CLV3*-Signalwegs sein sollte, müsste *KRF*, um den Zwergwuchs von *crn/krf*-Doppelmutanten zu erklären, eine zusätzliche *clv3*-unabhängige Rolle bei der Kontrolle des Pflanzenwachstums besitzen.

KRF könnte aber auch eine von *CRN* und den *CLV* Genen unabhängige Funktion haben. Aus den Überlegungen zu dem durch die *DRN*-Überexpression verursachten Phänotyp geht hervor, dass verminderte Zellsteckung Meristemzellen daran hindern könnte sich zu differenzieren. Sollte der Zwergwuchs von *crn/krf*-Doppelmutanten ebenfalls auf reduzierter Zellstreckung, statt auf verminderten Zellteilungsraten beruhen, könnte das auch den verstärkten Phänotyp im Sprossmeristem bewirken. Somit könnte in *krf*-Mutanten z.B. eine Komponente einer der zellsteckungsfördernden Phytohormon-Signalwege betroffen sein und so indirekt die Akkumulation von undifferenzierten Zellen im Meristem von *crn*-Mutanten fördern. Die ähnlichen Phänotypen von *crn/krf*-Doppelmutanten und *crn* bei 29°C hätten demnach verschiedene Ursachen.

4.3.5 *CLF*, ein *clv*-unabhängiger Suppressor der *CLV3*-Überexpression?

Eine der als putativer Suppressor der *CLV3*-Überexpression identifizierten Mutanten stellte sich als Allel des Polycomb-Gruppen (Pc-G) Genes *CLF* heraus (Goodrich et al., 1997), *clf-18/3*. Die genauere Analyse ergab aber, dass es in der vegetativen Phase zu keiner Suppression der *CLV3*-Überexpression kommt, da die transgenen *35S*::*CLV3/clf-18/3*-Pflanzen additiv den Phänotyp von *clf-* und *wus*-Mutanten bzw. 35S::*CLV3*-Pflanzen vereinen. Es kommt jedoch zu keiner Verzögerung der für *clf*-Mutanten typischen verfrühten Blühinduktion (Goodrich et al., 1997) und der gebildete Spross zeigt keine Merkmale des *CLV3*-Überexpressionsphänotyps (Brand et al., 2000). Zudem zeigen die *35S*::*CLV3/clf-18/3*-Wurzeln keinen Meristemarrest, der normalerweise in *35S*::*CLV3*-Pflanzen zu beobachten ist (Hobe et al., 2003). Somit wird der *CLV3*-Überexpressionphänotyp partiell supprimiert.

Es ergeben sich verschiedene Erklärungen für die partielle Suppression der *CLV3*-Überexpression: Zum einen könnte es in transgenen 35S::*CLV3/clf-18/3*-Mutanten zu einer *WUS*-unabhängigen Sprossentwicklung kommen, wie sie zeitverzögert in *wus*-Mutanten erfolgt. Transgene 35S::*CLV3/clf-18/3*-Mutanten blühen jedoch viel früher als *wus*-Mutanten oder auch der Wildtyp. Eher ist anzunehmen das *WUS* im Lauf der Entwicklung der 35S::*CLV3/clf-18/3*-Pflanzen unabhängig von der Repression durch *CLV3* aktiviert wird.

Gegen eine direkte Integrierung von *CLF* in den *CLV*-Signalweg sprechen vor allem die unterschiedlichen Aufgaben von Pc-G-Proteinen, die normalerweise langfristig Genexpressionsmuster statisch erhalten, im Gegensatz zum *CLV3/WUS*-Rückkopplungskreis, der schnell und dynamisch auf Veränderungen der *CLV3*- und *WUS*-Expression reagiert (3.2.1). Das Auffinden eines *clf*-Allels in der Suppressormutagenese der *CLV3*-Überexpression zeigt viel mehr und nicht ganz unerwartet, dass mittels dieser Strategie auch *clv*-unabhängige Repressoren der *WUS*-Expression identifiziert werden können.

5. Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Bei den höheren Pflanzen entstehen die meisten Organe postembryonal an den Flanken ihrer apikalen Meristeme, die einen Pool von totipotenten Stammzellen beinhalten. Die Organ-Neogenese ist abhängig von einem Gleichgewicht zwischen dem Erhalt und der Differenzierung der Stammzellen. In *Arabidopsis* wird das Stammzellschicksal in den Spross- und Blütenmeristemen von einem von *CLAVATA3* (*CLV3*) und *WUSCHEL* (*WUS*) gebildeten negativen Rückkupplungskreislauf kontrolliert. *CLV3* kodiert ein kleines sekretiertes Protein, das in den Stammzellen an der Spitze der Meristeme exprimiert wird und als putativer Ligand über die Rezeptoren *CLV1* und *CLV2* die *WUS*-Expression negativ reguliert. Der Transkriptionsfaktor *WUS* wird dagegen unterhalb der Stammzellen exprimiert und verhindert nicht-zellautonom die Differenzierung der *CLV3*-exprimierenden Stammzellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit drei Aspekten der *CLV3*-Signaltransduktion: Die Regulation der *CLV3*-Expression durch den Transkriptionsfaktor *DORNRÖSCHEN* (*DRN*), die Analyse der Dynamik des *CLV3*/WUS-Regelkreises und der Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten des *CLV*-Signalwegs.

Die Expressionsdomänen von *DRN* und *CLV3* überschneiden sich weitgehend. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die induzierte ubiquitäre Überexpression von *DRN* zu einer Erhöhung der *CLV3*-Expression, ausschließlich in den Stammzellen, führt. Da es zu keiner Ausdehnung der *CLV3*-Expression kommt, benötigt *DRN* weitere Faktoren, um *CLV3* aktivieren zu können. Die langfristige Überexpression von *DRN* bewirkt eine radikale Umgestaltung des Meristems, die weitgehend auf der Inhibition der Zellstreckung, die ein Merkmal der Differenzierung ist, beruht. Die Ergebnisse der Suche nach weiteren *DRN*-Zielgenen legen nahe, dass *DRN* über die Inhibition der Synthese des zellstreckungsfördernden Phytohormons Jasmonsäure zum Erhalt der Stammzellpopulation beitragen könnte.

Um die Dynamik des *CLV3/WUS*-Regelkreises zu untersuchen, wurde während der Entwicklung die *CLV3*-Expression in den Stammzellen erhöht. Wie vom Modell vorhergesagt kommt es zu schnellen Verlust der *WUS*- und endogenen *CLV3*-Expression in den Spross- und den Blütenmeristemen. Diese Abregulation erfolgt weit schneller als die durch veränderte Zellstreckungs- und Zellteilungsmuster verursachten morphologischen Veränderungen der Meristeme. In den während der erhöhten *CLV3*-Expression neu entstehenden Meristemen kommt es jedoch zur Restauration der *WUS*-Expression, was die Existenz eines Kompensationsmechanismus nahe legt.

Die Weiterleitung des CLV3-Signals ist abhängig von der Funktion der Komponenten des CLV3-Signalweges. Daher wurde zielgerichtet mittels einer Suppressormutagenese der CLV3Überexpression nach neuen Komponenten gesucht. Die Effizienz dieser Durchmusterung wurde durch das Auffinden mehrerer *clv1*- und *clv2*-Mutanten bestätigt. Eine weitere isolierte Suppressormutante, *coryne (crn)*, zeigt alle Merkmale einer *clv*-Mutante, einschließlich der durch Stammzellakkumulation vergrößerte Meristeme. *CRN* kodiert eine Rezeptorkinase ohne Rezeptordomäne, *CLV2* dagegen einen LRR-Rezeptor ohne Kinasedomäne. Beide Proteine könnten somit eine heterodimere LRR-Rezeptorkinase bilden. Durch die Analyse von Doppelmutanten konnte *CRN* in den *CLV*-Signalweg eingeordnet werden. Demnach wird das *WUS*-reprimierende *CLV3*-Signal über zwei getrennte Signalwege weitergeleitet, wobei der eine *CLV1* und der andere *CRN* und *CLV2* beinhaltet.

5.2 Summary

Most organs of higher plants develop postembryonically on the flanks of their apical meristems which contain pools of totipotent stem cells. The organ neogenesis is dependent of a balance between maintenance and differentiation of stem cells. In *Arabidopsis*, stem cell fate in the shoot apical and floral meristems is controlled by a negative feedback loop that includes *CLAVATA3* (*CLV3*) and *WUSCHEL* (*WUS*). *CLV3* encodes a small secreted protein that is expressed in the stem cells on the tip of the meristems. The putative *CLV3* ligand limited the expression of *WUS* via the receptors *CLV1* and *CLV2*. However, the transcription factor *WUS* is expressed underneath the stem cells and prevents non cell autonomously the differentiation of the *CLV3* expressing stem cells. This thesis deals with three aspects of *CLV3* signal transduction: The control of *CLV3/WUS* feedback loop and the identification and characterization of new components of the *CLV* signal pathway.

The expression domains of *DRN* and *CLV3* overlap mainly. In this thesis it could be shown that the induced ubiquitous overexpression of *DRN* results in an increase of *CLV3* expression, exclusive in the stem cells. Since there is no expansion of the *CLV3* expression, *DRN* needs other factors to activate *CLV3*. The long-term overexpression of *DRN* results in a radical reorganisation of the meristem. This based mainly on the inhibition of cell expansion, which is a criteria of differentiation. The results of the search for further *DRN* target genes suggest that *DRN* could cause maintenance of the stem cell population via the inhibition of the synthesis of the cell expansion providing phytohormone jasmonat.

To test the dynamic of the *CLV3/WUS* feedback loop, the *CLV3* expression was increased in the stem cells during development. As from the model predicted, the shoot apical and floral meristems loose the *WUS* and endogenous *CLV3* expression rapidly. This downregulation is faster than the morphological changes through alteration in cell expansion and cell division patterns. In the arising meristems during higher *CLV3* expression, the *WUS* expression can restore. This implicated the existence of a mechanism of compensation.

The signal transduction of *CLV3* depends on the function of the components of the *CLV3* signal pathway. Therefore new components were purposeful searched by a suppressor screen of *CLV3* overexpression. The efficiency of the screen was confirmed by the finding of several *clv1* and *clv2* mutants. Another isolated suppressor mutant, *coryne* (*crn*), presents all characteristics of *clv* mutants, including bigger meristems through stem cell accumulation. *CRN* encodes a receptor-kinase without receptor domain and *CLV2* encodes a LRR-receptor with kinase-domain. Hence both proteins could build a heterodimeric LRR-receptor-kinase. Based on the analyses of double mutants *CRN* could integrate in the *CLV* signal pathway. Therefore the *WUS* repressing *CLV3* signal is transmitted via two distinguished signal pathways, one of them containing *CLV1* and the other one *CRN* and *CLV2*.

6. Literatur

Aida, M., , Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. und Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ seperation: an analysis of the *cup-shaped cotydon* Mutant. *Plant Cell* 9, 841-57.

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

Alting-Mees, M.A. und Sorge, J.A. (1992). pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods in Enzymol.* **89**, 483-495.

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

Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1998). *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by Infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris Sci Vie* **316**, 1194-1199.

Barton, M.K. und Poethig, R.S. (1993). The formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wildtype and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* **119**, 823-831.

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

Borghi, Lorenzo, Dissertation (2005). Institut für Genetik, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

Bowman, J. L. (1993). Arabidopsis: an Atlas of Morphology and Development. New York: Springer-Verlag.

Brand, Ulrike, Dissertation (2002). Zur Rolle von *CLAVATA3* bei der Regulation des Stammzellschicksals im Sproßmeristem von *Arabidopsis thaliana*. Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln.

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

Brand, U., Hobe, M. und Simon, R. (2001). Functional domains in plants shoot meristems. *BioEssays* 23, 134-141.

Casamitjana-Martinez E., Hofhuis H.F., Xu J., Liu C. M., Heidstra R. und Scheres B. (2003). Root-specific *CLE19* overexpression and the soll/2 suppressors implicate a *CLV*-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Curr Biol* **13**, 1435–1441.

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

Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.H., Sung, Z.R. und Goodrich J. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* 131, 5263–5276.

Cenzano, A., Vigliocco, A., Kraus, T. und Guillermina A. (2003). Exogenously Applied Jasmonic Acid Induces Changes in Apical Meristem Morphology of Potato Stolons. *Annals of Botany* **91**, 915-919.

Clark, S.E. (2001). Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Rev Mol Cell Biol* **2**, 297-418.

Clark, S.E., Running, M.P. und Meyerowitz, E.M. (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397-418.

Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z. und Meyerowitz, E.M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOTMERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 1567-1575.

Clark, S.E., Running, M.P. und 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. und 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.

Cock, J.C. und McCormick, S. (2001). A Large Familiy of Gens That Share Homology with *CLAVATA3. Plant Physiol* **126**, 939-942.

Cock, J.M., Vanoosthuyse V. und Gaude T. (2002). Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 230–236.

Crone, W. und Lord, E.M. (1993). Flower development in the organ number mutant *clavata1-1* of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* **80**, 1419-1426.

Delaporta, S.L., Wood, J. und Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: version 2. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-22.

Deveaux, Y., Peaucelle, A., Roberts, G.R., Coen, E., Simon, R., Mizukami, Y., Traas, J., Murray, J.A., Doonan, J.H., und Laufs, P. (2003). The ethanol switch: a tool for tissue-specific gene induction during plant development. *Plant J* 36, 918-930.

Devoto, A. und Turner, G. (2003). Regulation of Jasmonate-mediated Plant Responses in *Arabidopsis. Annals of Botany* **92**, 329-337.

DeYoung B.J., Bickle K.L., Schrage K.J., Muskett P., Patel K. und 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.

Diévart A., Dalal M., Tax F.E., Lacey A.D., Huttly A., Li J. und Clark S.E. (2003). *CLAVATA1* dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development. *Plant Cell* **15**, 1198-1211.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. und Laux, T. (1996). The SHOOT *MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* **10**, 101–113.

Fiers M., Golemiec E., van der Schors R., van der Geest L., Ii K.W., Stiekema W. und Liu C.M. (2006). The CLV3/ESR motif of CLV3 is functionally independent from the non-conserved flanking sequences. *Plant Physiol* 141, 1284-1292.

Fletcher, J.C. (2000). The *ULTRAPETALA* gene controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis. Development* **128**, 1323-1333.

Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R. und Meyerowitz, E.M. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283, 1911-1914.

Gething M.J. und Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**(6355):33-45.

Gisel, A., Barella, S., Hempel, F.D. und Zambryski, P.C. (1999). Temporal and spatiaol regulation of symplastic trafficking during development in *Arabidopsis thaliana* apices. *Development* 126, 1879-1889.

Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E. M. und Coupland G. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis. Nature* **386**, 44–51.

Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. und Laux, T. (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131, 657-68.

He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F. und Gan S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physol* 128, 876-884.

Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. und Mullineaux, P.M. (2000). pGreen: a versatiale and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42(6), 819-32.

Hibara, K., Takada, S. und Tasaka, M. (2003). *CUC1* gene activates the expression of SAMrelated genes to induce adventious shoot formation. *Plant J* **36**, 687-696.

Hobe, Martin, Dissertation, 2004. Kontrolle der Expression des UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) Gens in Arabidopsis thaliana. Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln. Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U. und 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.

Ikeda, Y., Banno, H., Niu, Q.-W., Howell, S. und Chua, N.-H. (2006). The ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2 gene of Arabidopsis regulates CUP SHAPED COTYLEDON 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. Plant Cell Physiol **47**, 1443-1456.

Irish, V.F. (1991). Cell lineage in plant development. *Curr Opin Genet Dev* 1(2):169-73.

Ito Y., Nakanomyo I., Motose H., Iwamoto K., Sawa S., Dohmae N. und Fukuda H. (2006). Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science*, **313**,842-845.

Ishiguro, S., Watanabe, Y., Ito., N., Nonaka, H., Takeda, N., Sakai, T., Kanaya, H. und Okada, K. (2002). SHEPHERD is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. *EMBO J* 21, 898-908.

Jackson, D.P. (1991) In: Bowles, D.J., Gurr, S.J. und MacPherson, (Hrsg). Molecular Plant Pathology: A practical Approach. *Oxford University Press*, England.

Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P. und Tsiantis M. (2005). KNOX action in Arabidopsis is mediatedby coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* 15,1560-1565.

Jeong, S. und Clark, S.E. (2004). Photoperiod regulates flower meristem development in Arabidopsis thaliana. *Genetics*.

Jeong, S., Trotochaud, A.E. und 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, 1925-1933.

Kayes, J.M. und Clark, S.E (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis. Development* 125, 3843-51.

Kirch, T., Simon, R., Grünewald, M. und Werr, W. (2003). The DORNRÖSCHEN/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 Gene of Arabidopsis Acts in the Control of Meristem Cell Fate and Lateral OrganDevelopment. Plant Cell 15, 694-705. Koizumi, K., Naramoto, S., Sawa, S., Yahara, N., Ueda T., Nakano, A., Sugiyama M. und Fukuda, H. (2005). VAN3 ARF–GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development* 132, 1699-1711.

Koncz, C. und Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene size controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.

Kondo T., Sawa S., Kinoshita A., Mizuno S., Kakimoto T., Fukuda H. und Sakagami Y. (2006). A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* 313, 845-848.

Kwiatkowska, D. (2004). Surface growth at the reproductive shoot apex of *Arabidopsis thaliana* pin-formed 1 and wild type. *J Exp Bot* 55, 1021–1032.

Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., und Traas, J. (2004). MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* **131**, 4311–4322.

Laufs, P., Dockx, J., Kronenberger J. und Traas, J. (1998a). *MGOUN1* and *MGOUN2*: two genes required for primordium initiation at the shoot apical and floral meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 1253-1260.

Laufs, P., Grandjean, O., Jonak, C., Kiêu, K. und Traas, J. (1998b). Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1375-1389.

Laux, T., Mayer, K.F.X., Berger, J. und Jürgens, G. (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 87-96.

Lease K.A., Wen J., Li J., Doke J.T., Liscum E. und Walker J.C. (2001). A mutant *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein beta subunit affects leaf, flower, and fruit development. *Plant Cell* 13(12), 2631-41.

Leibfried, A., To, J.P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J. und Lohmann J.U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**,1172-1175.

Leyser, H.M.O. und Furner, I.J. (1992). Characterization of three apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **116**, 397-403. Li, E., You, M. und Hristova K. (2006). FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J Mol Biol* **356**(3), 600-12.

Li Y., Darley C.P., Ongaro V., Fleming A., Schipper O., Baldauf S.L. und McQueen-Mason S.J. (2002). Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol* **128**, 854-864.

Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.L. und Barton, M.K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of Arabidopsis. *Nature* 379, 66-69.

Lorenzo O., Piqueras R., Sanchez-Serrano J.J. und Solano R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonatepathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165–178.

Lucas W.J., Bouche-Pillon S, Jackson D.P., Nguyen L., Baker L., Ding B. und Hake S. (1995a).Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 270(5244), 1980-3.

Lucas H., Feuerbach F., Kunert K., Grandbastien M.A. und Caboche M. (1995b). RNA-mediated transposition of the tobacco retrotransposon Tnt1 in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 14(10), 2364-73.

Lukowitz W., Gillmor C.S. und Scheible W.R. (2000). Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol.* **123**(3),795-805.

Lloyd, A.M., Schena, M., Walbot, V., und Davis, R.W. (1994). Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: Patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**, 436–439.

Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K. und 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.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. und Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95, 805-815.

McQueen-Mason S.J., Durachko D.M. und Cosgrove D.J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. *Plant Cell* 4,1425-1433. **McQueen-Mason S.J. und Cosgrove D.J. (2000).** Disruption of hydrogenbonding between plant-cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6574-6578.

Medford,J., Elmer,J.S. und Klee,H.J. (1991). Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristem. *Plant Cell* **3**, 359-370.

Mezitt L.A. und Lucas W.J. (1996).

Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids.Mezitt LA, Lucas WJ. *Plant Mol Biol* **32** (1-2), 251-73.

Müller, Ralf, Diplomarbeit (2002). Zur Regulation des Stammzellschicksals durch Signalpeptide in Brassicaceae. Institut für Genetik, Universität zu Köln.

Müller R., Borghi L., Kwiatkowska D., Laufs P. und Simon R. (2006). Dynamic and compensatory responses of *Arabidopsis* shoot and floral meristems to *CLV3* signaling. *Plant Cell* 18,1188-1198.

Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R. und Dobbie Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative *real-time* RT-PCR. *Biotechniques* 33(3), 514.

Mussig C., Fischer S. und Altmann T. (2002). Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol* **129**(3):1241-51.

Ni J. und Clark, S.E. (2006). Evidence for Functional Conservation, Sufficiency, and Proteolytic Processing of the CLAVATA3. *Plant Physiol* 140, 726–733.

Ohta M., Matsui K., Hiratsu K., Shinshi H., und Ohme-Takagi M. (2001). Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression. *The Plant Cell* 13, 1959–1968.

Parthier, B. (1990). Jasmonats-hormonal regulators or stress factors in leaf senescence. *Journal of Plant Groth Regulation* **9**, 57-63.

Poethig, S. (1989). Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genet* **5**, 273–277

Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J. R., Drews, G.N. und 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. Rast, Madlen, Diplomarbeit (2006). Charakterisierung konditionaler Entwicklungsmutanten von *Arabidopsis thaliana*. Institut für Genetik, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

Reddy, G.V. und Meyerowitz, E.M. (2005). Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the Arabidopsis shoot apex. *Science* **310**, 663-667.

Reeves, P. H., und G. Coupland (2000). Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 37-42.

Rinne, P.L.H. und van der Schoot, C. (1998). Symplasmic fields in the Tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* **125**, 1477-1485.

Salter, M.G., Paine, J.A., Ridell, K.V., Jepson, I., Greenland, A.J.,Caddick, M.X. und Tomsett, A.B. (1998). Characterisation of the ethanolinducible alc gene expression system for transgenic plants. *Plant J* 16, 127–132.

Sanders P.M., Lee, P.Y., Biesgen, C., Boone, J.D., Beals, T.P., Weiler, E.W. und Goldberg R.B. (2000). The *Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12, 1041-1061.

Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra R. und Laux T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811-814.

Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., *et al.* (2001). Monitoring of Methyl Jasmonateresponsive Genes in Arabidopsis by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. *DNA Research* **8**, 153–161.

Satina, S. (1940). Demonstrations of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* bymeans of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer J Bot* 27, 895-905.

Satina, S. und Blakeslee, A.F. (1941). Periclinal chimeras in *Datura* in relation to development of the carpel. *Amer J Bot* **30**, 453-462.

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

Schubert S., Primavesi L., Bishopp A., Gethin Roberts G., Doonan J., Jenuwein T. und Justin Goodrich J. (2006). Silencing by plant Polycombgroup genes requires dispersed trimethylation of Histone H3 at lysine 27. *EMBO J* 25, 4638–4649.

Sieburth, L.E. und Meyerowitz, E.M. (1997). Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-65.

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

Song, S.K. und Clark, S.E. (2005). POL and related phosphatases are dosagesensitive regulators of meristem and organ development in Arabidopsis. *Dev Biol* **285**, 272-284.

Song, S.-K., Lee M.M. und 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. und Simon, R. (2006). Plant stem cell niches. *Int J Dev Biol* 49.

Steeves, T.A. und Sussex, I.M. (1989) The structure of the shoot apex. In: Patterns in plant development, edn 2. *Cambridge University Press*, 1989, 46-61.

Stone, J.M., Trotochaud, A.E., Walker, J.C. und Clark, S.E. (1998). Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol* 117, 1217-1225

Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M. (2001). The *CUPSHAPED COTYLEDON1* gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128, 1127–1135.

Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W. und Comai, L. (1995). The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121, 2723-2735. **Tilney-Basset, A.R.E. (1986).** Plant Chimeras (London, Hrsg.: Arnold, E.).

Torii, K. U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R. F. und Komeda, Y. (1996). The Arabidopsis *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8, 735-746.

Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. und Clark, S.E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires *CLAVATA3* for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rhorelated protein. *Plant Cell* **11**, 393-405.

Überlacker, B., Klinge, B. und Werr, W. (1996). Ectopic expression of the maize homeobox genes *ZmHox1a* or *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* **8**, 349-62.

Ulloa R.M., Raices, M., MacIntosh, G.C., Maldonado, S. und Tellez-Inon M.T. (2002). Jasmonic acid affects plant morphology and calcium-dependent protein kinase expression and activity in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* 115, 417–427.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P und Scheres, B. (1995). Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**,62-65.

Vaughn, J.G. (1952). Structure of the angiosperm inflorescence apex. *Nature* 171, 751-752.

Vaughn, J.G. (1955). The morphology and growth of the vegetative and reproductive apices of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Capsella bursa-pastoris (L.) Medic. and Anagallis arvensis L.. *Journ Linn Soc Bot* LV.

Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A. und de Vries, S.C. (2003). The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis. Plant Cell* **15**, 1563–1577.

Waites, R. und Simon, R. (2000). Signaling Cell Fate in Plant Meristems: Three Clubs on One Tousle. *Cell* **103**, 835-838.

Williams L., Grigg S.P., Xie M., Christensen S. und 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(16):3657-68. Williams, R.W., Wilson, J.M. und Meyerowitz, E.M. (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway. *Proc Nat Acad Sci USA* 94, 10467-10472.

Wu .X, Dabi T., und Weigel D. (2005). Requirement of Homeobox Gene *STIMPY/WOX9* for *Arabidopsis* Meristem Growth and Maintenance. *Current Biology* **15**, 436–440.

Xu W., Campell, P. Vargheese, A.K. und Braan (1996). The *Arabidopsis XET*-related gene family: environmental and hormonal regulation of expession. *Plant J* 9 (6), 879-889.

Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. und Xie, D. (2002). The SCF^{COII} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis. Plant Cell* 14, 1919-1935.

Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A. und Ori N. (2005). Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol*, 15:1566-1571.

Yokoyama R., Takahashi T., Kato A., Torii K.U. und Komeda Y. (1998). The *Arabidopsis ERECTA* gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. *Plant J* 15(3), 301-10.

Yu, L. P., Miller, A. K. und Clark, S. E. (2003). *POLTERGEIST* encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identityat *Arabidopsis* shoot and flower meristems. *Curr. Biol.* **13**, 179-188.

Yu, L. P., Simon, E. J., Trotochaud, A. E. und Clark, S. E. (2000). *POLTERGEIST* functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development* 127, 1661-1670.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung				
AGI	Arabidopsis Genome Initiative / AtBB Sequence Map				
ANOV	ANOVA Varianzanalyse				
AS	Aminosäuren				
BAR	BASTA [®] -Resistensgen				
Вр	Basenpaare				
Col	Columbia, Ökotyp von Arabidopsis thaliana				
DEX	Dexamethason				
DL	Dauerlicht				
DNA	Desoxyribonucleinsäure				
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus				
сM	Centi-Morgan				
cDNA	komplimentäre DNA				
cRNA	komplimentäre RNA				
E. coli	Escherichia coli				
ER	Endoplasmatische Reticulum				
GFP	Grün fluoreszierendes Protein				
GUS	β-Glucuronidase				
h	Stunden				
Hrsg.	Herausgeber				
HnI	Stunden nach Induktionbeginn				
JA	Jasmonsäure				
Ka	Karpellenanzahl pro Schote				
Kan	Kanamycin				
kDa	Kilodalton				
KT	Kurztag (16 h Licht / 8 h Dunkel)				
Kb	Kilobasen				
kDa	Kilodalton				
L1(2,3)	Klonale Schichten (layer) im SAM				
lat.	lateinisch				
Ler	Landesberg <i>erecta</i> , Ökotyp von Arabidopsis thaliana				
L <i>ER</i> +	Landesberg (ERECTA+), Ökotyp von Arabidopsis thaliana				

LRR	Leucin-reiche Wiederholungen (leucin rich repeats)				
LSD	Least Significant Difference (Test), eine <i>post hoc</i> Methode				
LT	Langtag (16 h Licht / 8 h Dunkel)				
ME	gemittelte Expression (mean expression)				
mm	Millimeter				
mM	Millimolar				
MNE	gemittelte normalisierte Expression (mean normalized expression)				
MnK	Monate nach Keimung				
mod.	Modifiziert				
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure				
MW	Mittelwert				
n.d.	nicht detektiert				
PCR	Polymerase-Kettenreaktion				
R.	Restriktion				
RNA	Ribonucleinsäure				
RT-PC	R reverse Transkription-Polymerase- Kettenreaktion				
SAM	Sprossapikalmeristem				
S.O.	siehe oben				
s.u.	siehe unten				
Tab.	Tabelle				
TnK	Tage nach Keimung				
TnI	Tage nach Induktion				
W(A)M Wurzelapikalmeristem					
WnK	Wochen nach Keimung				
WnI	Wochen nach Induktionbeginn				
Wt	Wildtyp				
μg	Mikrogramm				
μl	Mikroliter				
μm	Mikrometer				
°C	Grad Celsius				

7.2 Anlagen zu 3.2: Konsequenzen der *CLV3*-Induktion für die Expression von *DRN*



Abb.28: Abnahme der *DRN*-Expression durch die kontinuierliche *CLV3*-Induktion. Die *DRN* Expression wurde mit dem Haushaltsgen *Cytochrom b5* normalisiert. Gemittelte Normalisierte Expression in % (MNE %); ± Standardfehler.

7.3 Anlagen zu 3.3: Suppessormutagenese der *CLV3*-Überexpression

7.3.1 Suppressormutanten mit keulenförmigen Schoten

	N (T2-Pools)	N (T2-Pflanzen)	Pflanzen (Linien)
clv-1 -Allele	5	17	2/3, 2/4, 2/5, 2/7, 2/8, 2/9, 2/12, 2/13, 2/14, 4/6, 4/8, 4/9, 4/11,
			6/27, 25/8, 29/9, 29/10
clv-2-Allele	2	2	5/2, 24/3
crn-Allele	1*	2*	6/16*, 6/22*

Tab20.: Suppressormutanten mit keulenförmigen Schoten (M2-Generation) In der M2-Generation wurden die Samen mehrerer M1-Pflanzen gemischt und gemeinsam auf jeweils einer Schale analysiert (Pools). Die Pflanzen mit keulenförmigen Schoten eines Pools können somit von einer oder verschiedenen M1-Pflanzen abstammen. Die identifizierten Suppressormutanten und ihre Nachkommen (Linien) wurden mit der Poolnummer und einer fortlaufenden individuellen Nummer versehen. Die Linien mit keulenförmigen Schoten wurden einen Komplementationstest durch die Kreuzung mit *clv1-4* und *clv2-1* unterzogen. (*): Die beiden Pflanzen (Linien) 6/16 und 6/22 des Pools 6 tragen dieselbe Punktmutation und stammen daher vermutlich von derselben M1-Pflanze ab.

7.3.2 Genomische Sequenz von CRN (At5g13290, Col)

___RM_C_1_»

taaagatgca	taggcttgcg	gacataaaaa	ttccggagct	atgtttcatc	gttgctttca	cggtctgaag	70
agccaatcaa	cactaaagaa	ggacctctaa	tggtctctag	caagtttagc	ccccaattaa	gtattgtatt	140
gatgtttttg	tgatggatgg	atataggctg	catattggga	aattatagtg	tattgtattg	tgtcgtgttg	210
tgtgtatgtg	ggactatagc	atcctgagtt	tgtcatgtcc	agacgttgta	acttgtaagc	aattacttat	280
ggttttgttc	acttcgtatt	aacgtattta	atttgtggct	cgattttggt	tttgaatctg	tgtcaaaact	350
aagataattt	acgtgttaaa	ccaggcccaa	gtttgaaagt	taattgtcaa	ttttcagacc	agagtacata	420
ttggtccact	tattcccatt	acattcatag	ttttgagtct	tttgataata	gtgttaccat	ttcaattagg	490
ctaatctttt	ttcaacccaa	gatatttta	taaaaaggaa	tgtggttcaa	atcggaaaac	aagacctaac	560
tttgaataaa	agcactacag	cataaagctt	ttacctttaa	caaaaaaaat	ataataattt	tttacaagga	630
aaaagaagag	aaagcaatta	ttctcagaca	aacaaaggaa	ccacttttgt	aggtgtagta	gtaatctcac	700
acgctaagac	aaaagtgcac	aaattctcga	gactctcttc	tatccaacgg	tccatatctc	actaaccgca	770
tctaaataac	ggacaagatc	ttcttttggc	ttcagctctc	tttagtcttt	accttccctc	aagctcggta	840
ctcgatgtct	tgctttcggc	cactcatgaa	agcaacgaga	gcttcccctt	tcatccgcct	acgtggctat	910
gggacccagt	ctaaccacga	ccacctgaca	tcgtgggccc	cactgtaagg	cgggaacccc	attttttt	980
ggctgtaagt	aacggattct	cggtcatgct	tttttgtgag	gatagagaga	gagactgaga	gagagagaga	1050
gtgtgtcacg	gtctcgcaga	tactgtgtat	tgaaaagaga	gttctagaga	gagagtgtgt	tatgtgtgtg	1120
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtt	tggttactgg	gattaattga	gctgaaacag	tttggatagt	1190
tttqtttqtt	ctqtttcatc	tttcaaccac	aqatataqta	atattqtqaa	aacccctcat	tqaaqtttqt	1260
tctctqctct	ctctttttqq	gtttagcact	qaqttttqqq	qtttatttcq	agacataccc	atacaaaqtt	1330
tgatactttt	qtqtcccccc	ttatcaaqaa	aattqtqqqq	ttttttttt	tttttaataa	qcttccttta	1400
aattttcaat	ttttatttq	qaqqaaaaqa	qtqaqaattt	cagataagaa	tctatgagcc	aatgatattc	1470
taattcatct	tcttcqtqaa	gattttgagt	tgaattccat	tttccttttt	atcttaataa	tttctcattq	1540
qttttctcqa	qaatatttqt	gattttgaga	qaaqaqqctt	cactotaoca	ttgaaaaagt	cttaaacttt	1610
	<u></u>	RM	C 5 »				
tctgtgtctt	tttatgtaag	ctttgaacag	cttcaccttt	ctgggttttc	tcagattgtg	tctaatcttg	1680
aaaaaccttt	tattcgtaga	agcagca ATG	AAGCAAAGAA	GAAGAAGAAA	TGGATGTAGT	AGTAGCAACA	1750
CTATCTCTCT	ACTCTTATTA	TTCTTCTTAG	TCTTCTTTTC	AAGAACAAGC	ACAAGTACAA	GTTGTCGTAG	1820
AAGAACTGTT	AAACACTTAT	CCACAACTTC	AACATCATCT	ACACCACTTG	AATCAAGAAT	CACTTCCAAG	1890
GTTATTGTGA	TTAGTATCGT	CTCAGGGATT	TTAACAGGGT	TGGTTTCAGC	TTTGGTGTTA	GCTTTCTTGG	1960
				«_RM_C_	_4		
TTCGTAGCAT	TGTCAAATTC	ATGAAACAGA	CGCCAATTCT	CAAAGGTCCA	GTGGTGTTTT	CTCCTAAGAT	2030
TACTCCTAAA	TCTCTCCACG	CAGCTCTCAG	TAATGGTATT	CAGTTGCTTG	GCTCTGACCT	TAATGGTAAA	2100
TACTATAAGA	TGGTTCTTGA	TAATGGTCTA	GTGGTTGCAG	TCAAGAGACT	AGGCTCACTT	GAAGGAGTTG	2170
GTTCACCAGA	AAGTAGTAGT	AGCAAGTCGG	TTAAGAGAAG	GTTGCAGAAG	GAACTTGAGC	TTCTTGCTGG	2240
GTTAAGGCAT	AGGAACCTTA	TGAGTTTACG	AGCTTATGTT	CGCGAATCTG	ATGAGTTCTC	TCTGGTCTAT	2330
GATTACATGC	CTAATGGTAG	CCTTGAGGAT	GTGATGAATA	AAGTTAGAAC	GAAAGAGGTA	GAGCTTGGAT	2400
GGGAGATTAG	GCTTAGAGTT	GCAGTTGGAA	TTGTGAAAGG	GCTTCAGTAT	CTTCATTTCA	GTTGTGAGAC	2470
CCAGATTCTT	CATTATAACC	TGAAACCTAC	AAATGTGATG	TTGGATTCTG	AGTTTGAGCC	TCGGCTTGCT	2540
GATTGTGGAT	TGGCCAAGAT	CATGCCTAGT	TCACACACAG	CGGTATCTTG	CTACTCTGCC	CCTGAGTCCT	2610
CTCAAAGTAA	CAGgtgcttc	aaatatcaac	accatagcct	ttgagttaac	tcctttttca	tctcttttac	2680
taacacggta	atgcaaatcc	ttgtgacagA	TACACAGACA	AAAGCGACAT	ATTCAGCTTT	GGGATGATAT	2750
TGGGTGTTCT	TTTAACCGGA	AGAGACCCGA	CCCACCCGTT	CTGCGAAGAG	TCTGCAAGCG	GAGGTAGCTT	2820
AGGACAGTGG							
GAGGAAGTGG	CTGAAACATT	TACAACAGTC	TGGGGAAGCA	CGAGAAGCAT	TAGATAAGAC	TATTCTTGGA	2890
CAGACCGGCC	CTGAAACATT AGGAAGACGA	TACAACAGTC AATGTTAATG	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA	CGAGAAGCAT TCACCATCAT	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT	TATTCTTGGA GACTTTCCGG	2890 2960
	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact	2890 2960 3030
	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG <u>c</u>	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact	2890 2960 3030
<u>tacatgtatc</u>	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT aaaacctctg	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taaaaccaat	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ ccagacatct	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C caatatattc	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt	2890 2960 3030 3100
<u>tacatgtatc</u> attcttgcta	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT aaaacctctg gtaactggtt	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taaaaccaat taactttgat	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ <u>ccagacatct</u> cacgcaaatg	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG caatatattc ttggtcttac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa	2890 2960 3030 3100 3170
<u>tacatgtatc</u> attcttgcta aggtagccag	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT <u>aaaacctctg</u> gtaactggtt aagttcccgt	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taaaaccaat taactttgat tcctaaacgt	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ <u>ccagacatct</u> cacgcaaatg aggacaacaa	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C caatatattc ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240
<u>tacatgtatc</u> attcttgcta aggtagccag	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT <u>aaaacctctg</u> gtaactggtt aagttcccgt	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC <u>taaaaccaat</u> taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ <u>ccagacatct</u> cacgcaaatg aggacaacaa	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C <u>caatatattc</u> ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact <u>ttttttcttt</u> aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240
<u>tacatgtatc</u> attcttgcta aggtagccag cagaaggaat	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT <u>aaaacctctg</u> gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taaaaccaat taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC <u>«_RM_C_</u> <u>ccagacatct</u> cacgcaaatg aggacaacaa aggacaacaa	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C <u>caatatattc</u> ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288
<u>tacatgtatc</u> attcttgcta aggtagccag cagaaggaat	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT <u>aaaacctctg</u> gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taacaccaat taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C ccagacatct cacgcaaatg aggacaacaa agcaataagc	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG c caatatattc ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact <u>ttttttcttt</u> aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288
tacatgtatc attettgeta aggtagecag cagaaggaat nnnnnnnnn	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT <u>aaaacctctg</u> gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa Nicht kodiere	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taacaccaat taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ ccagacatct cacgcaaatg aggacaacaa agcaataagc nschließlich Int	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag ttgtcgag	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C <u>caatatattc</u> ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288
tacatgtatc attettgeta aggtagecag cagaaggaat nnnnnnnnnn nnnnnnnnn	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT aaaacctctg gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa Nicht kodiere <u>Unt</u> ranslatier	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC taacaccaat taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca ende Region, ei te <u>R</u> egion (UTF	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ ccagacatct cacgcaaatg aggacaacaa agcaataagc nschließlich Int {) der vorherge	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag ttgtcgag	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C caatatattc ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288
tacatgtatc attettgeta aggtagecag cagaaggaat nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT aaaacctctg gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa : Nicht kodiere : <u>Unt</u> ranslatier : Kodierende F	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC <u>taaaaccaat</u> taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca ende Region, ei te <u>R</u> egion (UTF Region der vorf	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ ccagacatct cacgcaaatg aggacaacaa agcaataagc nschließlich Int R) der vorherge nergesagten mi	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag ttgtcgag	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG C caatatattc ttggtcttac atgaacgtac	TATTCTTGGA GACTTTCCGG <u>ccaacgtact</u> <u>ttttttcttt</u> aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288
tacatgtatc attettgeta aggtagecag cagaaggaat nnnnnnnnnn nnnnnnnnn NNNNNNNNN ATGNNTAG	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT aaaacctctg gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa Nicht kodiere <u>Unt</u> ranslatier Kodierende F Start und Sto	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC <u>taaaaccaat</u> taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca ende Region, ei te <u>R</u> egion (UTF Region der vorh opp der Transla	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ ccagacatct cacgcaaatg aggacaacaa agcaataagc nschließlich Int R) der vorherge hergesagten mation	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag ttgtcgag	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG c caatatattc ttggtcttac atgaacgtac (nach TAIR: At	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa atactacact	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288
tacatgtatc attettgeta aggtagecag cagaaggaat nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn NNNNNNNNNN ATGNNTAG NNNNNGNNN	CTGAAACATT AGGAAGACGA TTCAAGTGAT aaaacctctg gtaactggtt aagttcccgt acaaagaaaa Nicht kodiere <u>Unt</u> ranslatier Kodierende F Start und Sto Vorhergesag	TACAACAGTC AATGTTAATG GAGCTTGTCC <u>taaaaccaat</u> taactttgat tcctaaacgt «_RM_C_2_ acacagatca ende Region, ei te <u>R</u> egion (UTF Region der vorh opp der Transla te Transmemb	TGGGGAAGCA GCTTTAAGAA ACATGCTTAC «_RM_C_ <u>ccagacatct</u> cacgcaaatg aggacaacaa agcaataagc nschließlich Int R) der vorherge nergesagten ma tion randomäne mit	CGAGAAGCAT TCACCATCAT ACAACTGCAC 3 gcagttgcat gtacaaaaaa gcagtgcttg ttgtcgag ttgtcgag ron sagten mRNA RNA der Position de	TAGATAAGAC CTGCCTTTCT AGCTTT TAG <u>caatatattc</u> ttggtcttac atgaacgtac (nach TAIR: At	TATTCTTGGA GACTTTCCGG ccaacgtact ttttttcttt aacagtcgaa atactacact 5g13290.1)	2890 2960 3030 3100 3170 3240 3288

Die für die Klonierung bzw. für die Genotypbestimmung benutzten Oligonukleotide wurden eingezeichnet.

7.3.3 Stärke der CRN-Expression in den 35S::CRN-Pflanzen



Abb.28: Expressionsstärke von *CRN* **in einigen 35S::***CRN***-Linien in der T2-Generation.** Die *CRN* Expression wurde mit dem Haushaltsgen *Cytochrom b5* normalisiert. Gemittelte Normalisierte Expression in % (MNE %); ± Standardfehler.

7.3.4 Ergänzung zur statistischen Auswertung der crn/clv-Doppelmutanten

Bei der aus Auswertung der durchschnittlichen Karpellenanzahlen der *crn/clv*-Doppelmutanten wurden Unterschiede innerhalb einer Linie eines Versuchs (bei *clv3-2* verschieden große Pflanzen), zwischen den unabhängigen Versuchen (bei den *crn* Kontrollen) und zwischen den Linien eines Versuchs wurde mittels ANOVA und den parameterfreien Kruskal-Wallis H-Test auf Signifikanz getestet. Die Signifikanztests erfolgten in verschiedenen Vergleichsgruppen. Bei signifikanter Abweichung innerhalb einer Vergleichsgruppe mit mehr als zwei Variabellen wurden die signifikant abweichenden Untermengen mit dem LSD ("Least Significant Difference") Test identifiziert und anschließend die Vergleichsgruppe ohne die LSD-Ausreißer erneut auf Signifikanz getestet (Tab.21).

Bei dem Vergleich der unterschiedlich gewachsenen *clv3-2-*Pflanzen, unterteilt in kleine und normal große Pflanzen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied und die beide Gruppen wurden daraufhin vereint. Somit zeigen *clv3-2-*Pflanzen keine Veränderung der Karpellenanzahl aufgrund von Umwelteinflüssen veränderten Pflanzengrößen wie sie zuvor für *crn* und *clv2-1* beobachtet wurden (ohne Daten). Die durchschnittliche Karpellenanzahl der *crn-*Kontrollpflanzen bei *crn/clv1-4* ist mit 0,5 Karpelle signifikant niedriger als bei den des anderen Teilversuchs (Tab.16 und 17). Das legt ebenfalls eine Abnahme der Karpellenanzahl von *clv1-4* und *crn/clv1-4* im Vergleich zu den anderen

crn/clv-Einzel- und Doppelmutanten nahe. Das wir dadurch erhärtet, dass bei den *clv1-4*-Kontrollen keine fünf oder höher karpelligen Schoten beobachtet wurden, die bei dominant-negativen *clv1*-Allelen bei Dauerlicht normalerweise auftreten (Tab.16). Daher wurde bei der Aufstellung der Untergruppen, deren jeweiligen Mitglieder keine signifikanten Unterschiede in den Tests zeigten, die Daten des *crn/clv1-4*-Teilversuchs außen vor gelassen (Tab.17).

				LSD Ausreißer
	Vergleichgruppen	ANOVA	H-Test	(signifikants Schwelle p = 0,05)
V0	alle Linien	p < 0,001	p < 0,001	-
V1	crn (verschiedene Versuche)	p < 0,001	p < 0,001	-
V2	<i>clv3-</i> 2 (Vergleich gr. und kl. Pflanzen)	p = 0,79	p = 0,83	-
V3	crn, clv1-11, clv1-1, clv2-1	p = 0,001	p = 0,001	clv1-1
V4	crn clv1-11 clv2-1	p = 0,96	p = 0,96	-
V5	<i>crn/clv1-11</i> (beide Linien) <i>crn/clv1-1</i>	p < 0,001	p < 0,001	crn/clv1-1
V6	crn/clv1-11 (beide Linien)	p = 0,11	p = 0,07	-
V7	<i>clv3-2, crn/clv1-11</i> (beide Linien), <i>crn/clv3-2</i>	p < 0,001	p < 0,001	<i>clv</i> 3-2 und <i>crn/clv</i> 3-2 in einer Untergruppe
V8	<i>crn/clv1-11</i> (beide Linien), <i>crn/clv1-1, crn clv2-1</i>	p < 0,001	p < 0,001	<i>clv1-1</i> und <i>clv2-1</i> in zwei verschiedenen Untergruppen
V9	<i>crn, clv1-11, crn/clv1-11</i> (beide Linien)	p < 0,001	p < 0,001	<i>crn /clv1-11</i> (beide Linie) in einer Untergruppe
V10	crn/clv1-1, crn/clv1-1	p = 0,001	p = 0,001	<i>clv1-1</i> und <i>crn/clv1-1</i> in zwei verschiedenen Untergruppen
V11	crn, clv2-1, crn/clv2-1	p = 0,74	p = 0,81	-
V12	crn, clv3-2, crn/clv3-2	p = 0,001	p = 0,001	crn
V13	clv3-2, crn/clv3-2	p = 0,83	p = 0,94	-
V14	crn, clv1-4, crn/clv1-4	p = 0,001	p = 0,001	<i>clv1-4</i> und <i>crn/clv1-4</i> in zwei verschiedenen Untergruppen

Tab.21: Vergleichsgruppen und Signifikantstest bei crn/clv-Einzel- und Doppelmutanten.

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubter Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 07.05.2007

Ralf Müller

Danksagung

Für die hervorragende Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und die Möglichkeit diese im Institut für Genetik durchzuführen, möchte ich mich bei Prof. Dr. Rüdiger Simon herzlich bedanken. Seine große Hilfsbereitschaft, Unterstützung und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Prof. Dr. Georg Groth möchte ich für seine freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Genetik, insbesondere der Arbeitsgruppen Simon und Schubert für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Umgang auch außerhalb des Labors.

Darüberhinaus möchte ich Dr. Yvonne Stahl, Dr. Marina Bureau, Dr. Marcel Lafos und Dr. Daniel Schubert für ihre freundschaftliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen danken. Andrea Bleckmann, Dr. Lorenzo Borghi und Madlen Rast danke für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten. Besonderer Dank gilt den jenigen, die freundlicherweise Teile meiner Arbeit Korrektur lasen, insbesondre Helge Pallakies für sein Bemühen, meine Arbeit grammatikalisch vor der dunkelen Seite der Macht zu bewahren.

Carin Theres danke ich herzlich für ihre große Unterstützung bei der Kartierung von *CRN* und Silke Winter für ihre Hilfe bei einigen RNA-*in situ*-Hybridisierungen. Rebecca Kloppenburg danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit als Laborbank-Nachbarin.

Dr. Martin Hobe von der Firma *Intavis* danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung einer wichtigen RNA-*in situ*-Hybridisierung.

All meinen Freunden danke ich für ihre moralische und sonstige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Darüberhinaus danke ich Vera Betz für ihre Hilfe bei der Formatierung und Daniel Schümmer für die Endkorrektur dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinen beiden Geschwistern und meiner Grossmutter Hedwig Fasel, der diese Arbeit gewidmet ist, für ihre moralische Unterstützung danken.